



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Determinación de compuestos polifenólicos y  
contribución al estudio etnobotánico de la planta  
chilchahua (*Tagetes nelsonii* Greenm)**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de:**

**QUÍMICO**

**Presenta:**

**EDITH BIBIANA DÍAZ GUTIÉRREZ**

**ASESORA : M. en C. BRÍGIDA DEL CARMEN CAMACHO ENRÍQUEZ**

**COASESORA : DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México**

**2016**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

**Determinación de compuestos polifenólicos y contribución al estudio etnobotánico de la planta chilchahua (Tagetes nelsonii Greenm).**

Que presenta la pasante: **Edith Bibiana Díaz Gutiérrez**  
Con número de cuenta: **408098700** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura de Química**

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Mayo de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en Ed. Victoria Oralia Hernández Palacios	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Brigida del Carmen Camacho Enriquez	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Judith García Arellanes	

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

IHM/cga\*

## **Este trabajo está dedicado a:**

*Mis raíces los tzotziles, herederos del Bats'i k'op, quienes me enseñaron sus conocimientos acerca de las plantas medicinales y la cosmovisión de la vida.*

*A las generaciones venideras.*

*A mi familia.*

“...El alma humana es una caja de donde siempre puede saltar un payaso haciéndonos mofas y sacándonos la lengua, pero hay ocasiones en que ese mismo payaso se limita a mirarnos por encima del borde de la caja, y si ve que por accidente, estamos procediendo según lo que es justo y honesto, asiente aprobadoramente con la cabeza y desaparece pensando que todavía no somos un caso perdido.”

El hombre duplicado (fragmento)

José Saramago

## **Agradecimientos**

### **A la vida**

*Por darme la oportunidad de ser testigo de tu sorprendente creación, porque a través de ti he conocido a Dios, que siempre ha estado conmigo.*

### **A mi mamá Manuela**

*Por todo tu apoyo incondicional, educarme con mucho amor y confiar en mí, me has dado tus sabios consejos que me guiaron en este camino, me has enseñado con tu ejemplo lo que es valentía, generosidad y perseverancia, no me alcanzará el tiempo para agradecerte todo lo que he aprendido de ti, gracias por estar a mi lado, eres mi maestra de la vida. Te admiro y quiero que sepas que este logro también es tuyo. Te amo.*

### **A mi papá Lorenzo**

*Por darme todo tu apoyo y cariño, entregarme parte de tu tiempo, cuidarme, heredarme esa fuerza propia de tu sangre que hoy tengo en mis venas y me resguardan en momentos de flaqueza, gracias por enseñarme tus experiencias, contagiarme de tu alegría y tu entusiasmo por el conocimiento. “La gente muere verdaderamente cuando se le olvida”, por eso, te llevaré siempre en mi memoria. Te amo.*

### **A mi hermanita Emma**

*Gracias por acompañarme en las frías madrugadas en compañía de los libros, las estrellas, o las interminables charlas, gracias por ser mi cómplice en las aventuras, travesuras y las incontables carcajadas, por ser la energía insurrecta y por dejarme aprender de tus nobles hazañas. En ti encontré a la mejor amiga del mundo. Me emociona saber lo que nos falta por vivir y recuerda traer sillas pequeñas (muy pequeñas) por si se requiere cruzar el río. Te amo.*

### **A mi abuelita Rosa**

*K'olabal la k'elun  
Taj k'anot tajek.*

### **A Daniel**

*Llegaste a la familia con tus sueños en las manos dispuesto a hacerlos realidad. Admiro tu perseverancia, vas por buen camino y sé que lo vas a lograr. Gracias por tu apoyo y por ser nuestro hermanito. Te quiero mucho.*

### **A mis tíos Díaz**

*Por el apoyo que me dieron cuando más lo necesité. Muy especialmente a mi tío Eulogio, y tía Juany por sus consejos y ayudarme a convencerme de emprender el vuelo en uno de los días más difíciles de mi vida.*

### **A mi primo Wilfrido**

*Gracias por tu ayuda, compañía y por encaminarme en el inicio de este viaje universitario.*

### **A mi tía Marcela y mis primos Ruth, Jonathan y Faby**

*Agradezco su apoyo y sus consejos así como la constante preocupación de mi bienestar y las gratas convivencias familiares, tengo tantos recuerdos con ustedes y siempre evoco esos momentos para alegrarme el corazón. No sin mencionar a la causa de mis alegrías, Jade, te quiero mucho.*

### **A mi familia de Yabteclum: tíos y primos**

*Aunque no podamos platicar mucho, me siento muy orgullosa de pertenecer a la gran familia, gracias por su cariño y consejos.*

### **A Miguel Ángel**

*“Sagrado el canto y sagrado el credo  
de la montaña donde nací  
sagrado el encuentro primero,  
allí donde te conocí...”*

*Has sido mi compañero y amigo de este largo recorrido, he tenido la fortuna de conocerte y que te convirtieras en mi familia en un extraño lugar. Tu compañía ha sido una dicha en esas interminables horas de estudio y soledad, estoy muy agradecida por tu incondicional apoyo y todo el cariño que me demuestras con tus actos. Te amo.*

### **A mis amigos**

*“Las huellas de los que caminaron juntas, nunca se olvidan”*

*Proverbio africano*

*Gracias por su amistad y por las tantas horas de estudio que tuvimos juntos, por las risas, las frustraciones y por regalarme las mejores anécdotas de esta etapa de mi vida: Israel, Omar, Martín, Pedro, Bob, Itzel, Nancy, Giovanni, Yair, Raquel, Mayla, Anahí, Mara, Jessica, Jazmín, Javier, Lalo, David, Sandra, Ariana, Yanmei, Octavio, Mónica.*

***A la Universidad Nacional Autónoma de México***

*Por darme la oportunidad de pertenecer a una de las mejores universidades de este país,  
por abrirme las puertas del conocimiento.*

*¡Orgullosamente FESC-UNAM!*

***A mis asesoras***

*La M. en C. Brígida del Carmen Camacho Enríquez por la confianza que depositó en mí al brindarme el acceso de realizar la tesis con su grupo de investigación, su ayuda académica y por tomarse el tiempo en revisar este trabajo.*

*A la Dra. Gabriela Vargas Martínez, por permitirme trabajar en su laboratorio, las facilidades de uso de los equipos, por sus conocimientos otorgados y su apoyo en la mejora de este trabajo. También agradecer las enseñanzas de vida, y las experiencias compartidas que han significado mucho para mí.*

***A los profesores que integran mi jurado:***

*M en Ed. Victoria Oralía Hernández Palacios, Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo y M. en C. Judith García Arellanes por su tiempo invertido en la revisión y mejora de este trabajo.*

***A todos mis profesores***

*Por su valiosa enseñanza.*

***Al Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas,***

*Por permitirme el acceso a sus instalaciones y poder investigar en su acervo bibliográfico toda la información referente a la chilchahua, así como poder entrevistar a sus colaboradores.*

# CONTENIDO

---

1	RESUMEN .....	11
2	INTRODUCCIÓN .....	12
3	OBJETIVOS .....	13
3.1	Objetivo general .....	13
3.2	Objetivos particulares .....	13
4	MARCO TEÓRICO .....	14
4.1	Chilchahua ( <i>Tagetes nelsonii</i> Greenm) .....	14
4.1.1	Localización y nombres .....	14
4.1.2	Descripción .....	14
4.1.3	Información taxonómica .....	15
4.1.4	Usos y aplicaciones .....	16
4.2	El género <i>Tagetes</i> .....	16
4.2.1	Descripción .....	16
4.2.2	Distribución geográfica .....	18
4.3	Principales componentes fitoquímicos y actividad farmacológica del género <i>Tagetes</i> ...	19
4.4	Compuestos fenólicos .....	21
4.4.1	Flavonoides .....	21
4.4.2	Actividad biológica .....	23
4.5	Tamizaje fitoquímico preliminar .....	23
4.6	Tipos de extracción .....	24
4.7	Electroforesis capilar .....	25
4.7.1	Instrumentación .....	25
4.7.2	Principios de separación .....	26
4.8	Espectroscopia de fluorescencia .....	28
4.8.1	Teoría de la fluorescencia molecular .....	28
4.8.2	Instrumentación .....	29
5	HIPÓTESIS .....	31
6	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	32
6.1	Registro etnobotánico .....	32
6.2	Materia vegetal .....	33
6.2.1	Recolección, separación y secado .....	34
6.3	Materiales .....	35



6.4	Equipos.....	36
6.5	Tamizaje fitoquímico.....	37
6.6	Molienda.....	38
6.7	Humedad.....	38
6.8	Tamaño de partícula.....	38
6.9	Planeación de los experimentos para encontrar las mejores condiciones de extracción de polifenoles.....	39
6.10	Obtención del extracto etanólico.....	40
6.10.1	Extracción por maceración dinámica.....	40
6.10.2	Extracción asistida por ultrasonido.....	40
6.11	Separación e identificación de polifenoles por electroforesis capilar.....	40
6.12	Identificación de compuestos fenólicos presentes en la chilchahua.....	41
6.13	Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría de fluorescencia.....	42
6.13.1	Preparación de los sistemas.....	42
6.13.2	Determinación de la longitud de onda óptima:.....	42
6.13.3	Cinética de reacción Tb-quercetina.....	43
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
7.1	Revisión bibliográfica de <i>Tagetes nelsonii</i> G.....	44
7.1.1	Sinonimia popular.....	47
7.2	Registro etnobotánico.....	47
7.2.1	Descripción geográfica del área de estudio.....	47
7.2.2	Estudio etnobotánico.....	48
7.2.3	Reconocimiento de la planta.....	49
7.2.4	Obtención.....	50
7.2.5	Nombres populares.....	51
7.2.6	Uso medicinal.....	51
7.2.7	Partes utilizadas.....	52
7.2.8	Modo de preparación y vía de administración.....	52
7.2.9	El conocimiento popular.....	54
7.2.10	El rescate de la medicina tradicional.....	54
7.3	Identificación botánica del material vegetal.....	55
7.4	Tamizaje fitoquímico.....	55
7.5	Molienda.....	58

7.6	Selección de las mejores condiciones para la extracción de los polifenoles .....	59
7.6.1	Perfil electroforético .....	61
7.6.2	Selectividad del método.....	63
7.7	Identificación cualitativa de compuestos fenólicos presentes en la planta chilchahua ( <i>Tagetes nelsonii</i> G.) .....	63
7.8	Análisis fluorimétrico .....	65
7.8.1	Elección del pico de emisión máximo para la cuantificación de flavonoides totales por fluorimetría.....	65
7.8.2	Cuantificación de flavonoides totales .....	69
7.9	Estudio cinético del complejo terbio-quercetina.....	70
8	CONCLUSIONES .....	72
9	PROSPECTIVAS.....	73
10	REFERENCIAS.....	74
11	ANEXO .....	79
11.1	Documentación etnobotánica.....	79
11.2	Electroferogramas de los compuestos polifenólicos identificados.....	85
11.3	Cuantificación de flavonoides totales .....	92
11.4	Determinación del orden de reacción.....	94
11.5	Pruebas reactivas del tamizaje fitoquímico .....	95
11.6	Identificación taxonómica de la planta .....	97

## ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector de arreglo de diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Campo eléctrico
EC	Electroforesis capilar
EQ	Equivalente de quercetina
FEO	Flujo electroosmótico
g	Gramo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
kV	kilovoltios
L	Litros
M	Molaridad
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
OH	Hidroxilo
OMe	Metoxilo
ppm	Partes por millón
Q	Quercetina
Rep	Repetición
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
S	Sonicación
T	Tiempo
Tb	Terbio
UA	Unidad analítica
UV	Ultravioleta -Visible
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramos

# 1 RESUMEN

---

La República Mexicana alberga una alta diversidad tanto biológica como cultural de las riquezas naturales, en muchos estados existen aún grupos étnicos que poseen un gran conocimiento empírico del uso de los recursos biológicos. Sin embargo aún son limitados los estudios científicos que respalden tal información a pesar de que hoy en día se han abierto ramas de la ciencia dedicadas al estudio de los productos naturales.

El presente trabajo integra la investigación etnobotánica y científica de la especie vegetal *Tagetes nelsonii* Greenm.

El estudio etnobotánico fue realizado en seis localidades de la región Altos del estado de Chiapas en donde es posible encontrar ejemplares de la planta. La finalidad del estudio consistió en realizar un registro que documente el conocimiento popular de dicha especie.

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio fitoquímico preliminar que reconoció los grupos químicos presentes en la planta, así como la optimización del método de extracción de polifenoles. Posteriormente se determinó el perfil polifenólico mediante la técnica de electroforesis capilar (EC), con ello se pudo identificar seis compuestos polifenólicos presentes en la especie *Tagetes nelsonii* G; la identidad se confirmó aplicando un enriquecimiento al perfil electroforético con estándar, observando un aumento en la señal analítica de la muestra y su respectiva comparación de los espectros de absorción.

La cuantificación de los flavonoides totales se realizó por medio de una curva de calibración con patrón externo (quercetina como referencia estándar) utilizando una técnica espectrofluorométrica, cuyo desarrollo se basó en la formación de un complejo fluorescente de quercetina con terbio. Adicionalmente se hizo un estudio de la cinética de degradación tanto del complejo terbio-flavonoide, como de la muestra vegetal.

Los resultados obtenidos del contenido de flavonoides totales en la planta fueron comparados con referencias encontradas de fuentes vegetales de antioxidantes, con la finalidad de poder llegar a conclusiones sobre la riqueza de polifenoles contenida en esta especie vegetal y su importancia como antioxidante natural.

## 2 INTRODUCCIÓN

---

La favorecida ubicación geográfica de la República Mexicana, le ha otorgado la categoría de ser uno de los países con mayor diversidad biológica, con alrededor de 30000 especies de plantas superiores, que representa el 10% de la flora mundial, de esta cifra, 5000 especies se utilizan en la medicina tradicional mexicana, según reportes de Viveros (2013). La mayoría de estas plantas se encuentran en el sureste de México, en los estados de Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.

En la región sureste de México, específicamente en el estado de Chiapas habitan actualmente diversos grupos étnicos, como son los tzotziles, tzeltales, tojolabales, choles, mames, zoques, canjobales, por mencionar sólo algunos, los cuales tienen su propia cultura curativa, donde el común denominador son las plantas medicinales.

La especie *Tagetes nelsonni* Greenm, es una planta endémica de la región sur de México, específicamente, de las zonas montañosas de Chiapas y Guatemala, en donde popularmente se le conoce con el nombre de chilchagua o chik chawa (Espinoza, 2009).

*Tagetes nelsonni* Grenm., no cuenta con información de su composición química. El conocimiento de sus propiedades medicinales es meramente empírico y transmitido de generación en generación por los habitantes de la región.

Se cree que dichas propiedades medicinales son atribuidas a los polifenoles presentes, ya que estos compuestos son metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan en funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis protéica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente. En el cuerpo humano, los polifenoles exhiben una amplia gama de efectos biológicos, debido a sus acciones antioxidantes, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarréicas, antiúlcéricas, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras (Larrea, 2012).

Una característica de los polifenoles es que en su estructura química poseen grupos cromóforos que son detectables en la región ultravioleta-visible, sus espectros de absorción son particularmente característicos y proporcionan información para dilucidar la estructura molecular y realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas.

Existen diversas técnicas instrumentales analíticas que se emplean para la determinación de compuestos fenólicos, entre éstos se encuentran: la espectrofotometría UV-Visible, electroforesis capilar, espectrofotometría de fluorescencia, técnicas cromatográficas, entre otras. De tal manera que existen estudios realizados por Granados (2014) y Shaghghi M. (2009) cuya determinación de polifenoles se realizaron por técnicas de electroforesis capilar y fluorescencia respectivamente.

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de polifenoles de la planta chilchahua (*Tagetes nelsonii* Greenm) mediante la técnica de electroforesis capilar, así como cuantificar los flavonoides presentes por espectrofotometría de fluorescencia para contribuir en el estudio fitoquímico de sus componentes.

### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un registro etnobotánico del conocimiento y usos de la planta chilchahua (*Tagetes nelsonii* Greenm) a través de un estudio de campo para documentar los usos tradicionales de la especie en la región de Los Altos de Chiapas.
- Examinar un ejemplar completo de la planta por un biólogo calificado del Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala - UNAM para su correcta identidad botánica.
- Determinar cualitativamente la presencia metabolitos secundarios en la planta chilchahua (*T. nelsonii* Greenm), mediante un tamizaje fitoquímico preliminar, para conocer los grupos fitoquímicos presentes.
- Desarrollar una metodología para encontrar las mejores condiciones de extracción de polifenoles de la planta chilchahua a través de variación de factores como método de extracción, disolventes y tamaño de partícula que permitan posteriormente su separación por electroforesis capilar e identificar los compuestos polifenólicos presentes.
- Calcular la concentración de flavonoides totales, por medio de la espectrofluorometría utilizando una curva de calibración para relacionar esta cantidad con especies del mismo género.

## 4 MARCO TEÓRICO

---

### 4.1 CHILCHAHUA (*Tagetes nelsonii* Greenm)

#### 4.1.1 Localización y nombres

Chilchahua es el nombre común de la especie *Tagetes nelsonii* G; nativa de la región sur de México, específicamente de las zonas montañosas de Chiapas (figura 4.1), aunque también se han encontrado ejemplares de la planta en la región suroccidental de Guatemala (Espinoza, 2009).

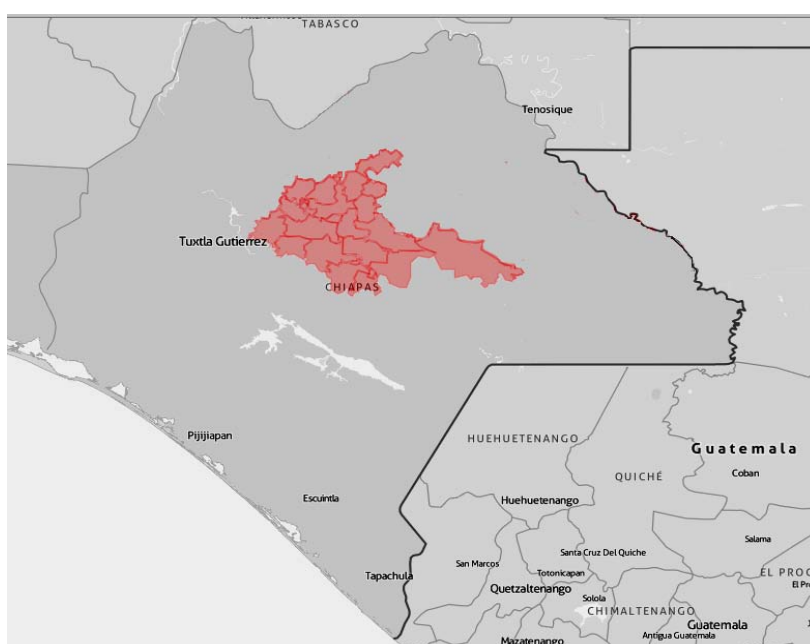


Figura 4.1 Distribución geográfica de la especie *Tagetes nelsonii* G. en el estado de Chiapas (Elaborado por Edith Bibiana Díaz Gutiérrez).

En la zona Altos del estado de Chiapas se conoce a esta planta con el nombre de chilchahua o chilchagua (De la Cruz, Guzmán, & Viveros, 2014). En Guatemala es conocida como chik chawa (Espinoza, Cruz, & Trujillo, 2013).

#### 4.1.2 Descripción

*T. nelsonii*, es una planta perenne, con un periodo de floración entre los meses de julio y agosto, sin embargo, se ha visto que también florece en los meses de octubre y noviembre. Las flores forman racimos de 30 a 60 cabezas de color amarillo-naranja, con un follaje denso y un aroma característico. Alcanza una altura entre 90 a 120 cm; se desarrolla en condiciones hídricas y tierras arcillosas ácidas con exposición de lleno al sol y a temperaturas frías que van de - 10 a 4.5 °C (Espinoza, 2009).

### 4.1.3 Información taxonómica

La descripción botánica de la planta se realizó por primera vez por el botánico estadounidense Jesse More Greenman misma que fue publicada en la revista botánica *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* en 1903. (Tabla 4.1)

En 1976, L. Nash publicó la primera descripción gráfica de *T. nelsonii* G. indicando sus características específicas (Figura 4.2).

Tabla 4.1 Información taxonómica de la planta chilchahua (Extraído de Barajas, 2009).

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

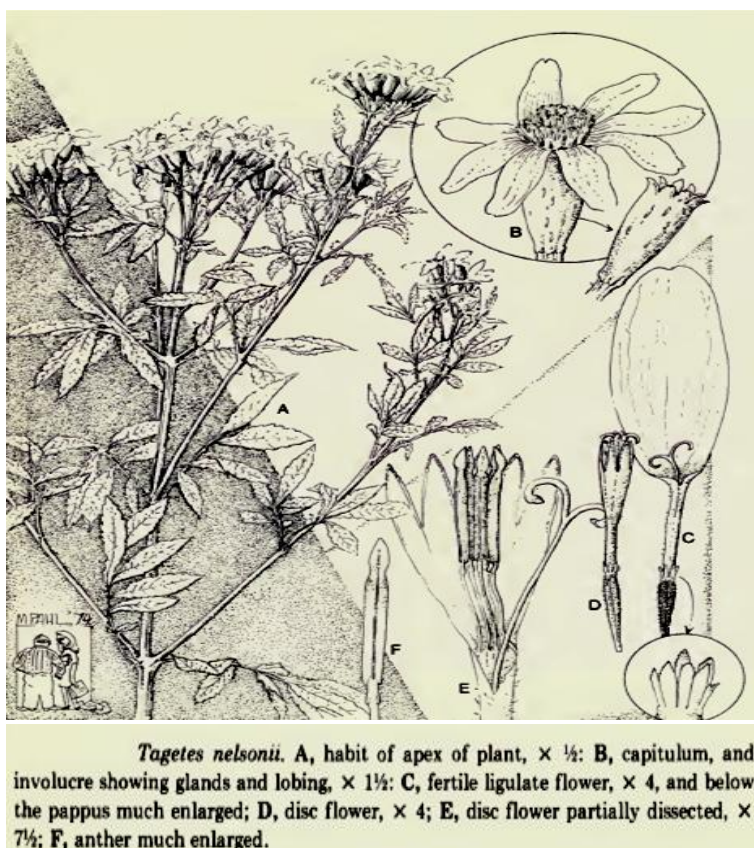


Figura 4.2 Descripción de *Tagetes nelsonii* G. realizada por L. Nash en 1976



#### 4.1.4 Usos y aplicaciones

La chilchahua no cuenta con datos reportados acerca de su composición química y es escasa la de su actividad farmacológica. El conocimiento de sus propiedades medicinales es meramente empírico y transmitido de generación en generación por los habitantes de la región.

Tradicionalmente esta planta es utilizada para aliviar síntomas comunes como la diarrea, fiebre, dolor de cabeza y malestares digestivos. (Espinoza, 2009)

Del mismo modo es empleado como antiparasitario y de forma más habitual se usa para el tratamiento contra la salmonelosis, debido a su actividad antimicrobiana (Viveros, 2013).

### 4.2 EL GÉNERO *TAGETES*

En estudios realizados por Serrato (2010), reportan que existen dos fuentes históricas importantes acerca del conocimiento y uso medicinal de algunas especies del género *Tagetes* en la época prehispánica, la primera descrita por Fray Bernardino de Sahagún en su obra “Historia General de las cosas de Nueva España” y la otra de Francisco Hernández de Toledo en “*Historia plantarum Novae Hispaniae*”, ambas escritas en el siglo XVI. El grupo náhuatl del centro de México, a través de las obras de Sahagún y Hernández legaron los principales antecedentes del género *Tagetes*, con los nombres en su lengua nativa de las plantas *yiauhitli*, *cempoalxochitl*, *macuilxochitl*, *tzitziquilitl*, *tepecempoalxochitl*, *tlapalcozatli*, *oquichtli*, *tlapaltecacayatl* y *zacaxochitlcoztic*, todas plantas aromáticas.

El género *Tagetes* cuenta con aproximadamente 55 especies ampliamente distribuidas en el territorio nacional, considerado posiblemente como el centro de origen y diversidad del género (Strother, 1977). Varias de sus especies se emplean como recurso terapéutico herbolario o como plantas ceremoniales y de ornato.

#### 4.2.1 Descripción

La familia Asteraceae reúne más de 23 500 especies repartidas en unos 1600 géneros, entre los que está *Tagetes* con alrededor de 55 especies distribuidas en el mundo. (Rondón, y otros, 2005).

Estudios realizados por Serrato (2010) adjudica que, del género *Tagetes* en México, el 60% son anuales y el 40% son perennes. La mayor parte de las especies anuales presentan condición ruderal viaria, es decir aparecen en hábitats muy alterados por la acción humana, como bordes de caminos, campos de cultivos o zonas urbanas. Las especies perennes generalmente son arbustivas y de condición silvestre, la mayoría crece en ambientes de

difícil acceso y con presiones ambientales para el crecimiento, llegando a ser endémicas algunas de ellas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Condición del género *Tagetes* en México, anuales y perennes (Compilado de Serrato, 2010).

Especies del género <i>Tagetes</i> de México	Condición
<b>Anuales o herbáceas</b>	
<i>T. coronopifolia</i>	Ruderal, Viaria, Silvestre
<i>T. elongata</i>	Ruderal, Silvestre
<i>T. erecta</i>	Domesticada, Cultivada
<i>T. eppaposa</i>	Ruderal, Silvestre/Endémica
<i>T. filifolia</i>	Ruderal, Viaria, Arvense, Silvestre
<i>T. foetidissima</i>	Ruderal, Silvestre
<i>T. jaliscensis</i>	Silvestre, Ruderal
<i>T. lunulata</i>	Ruderal, Viaria, Arvense
<i>T. micrantha</i>	Silvestre, Viaria, Ruderal
<i>T. minuta</i>	Silvestre, cultivada
<i>T. moorei</i> var <i>brevistilata</i>	Silvestre, Ruderal/Endémica
<i>T. oaxacana</i>	Silvestre/Endémica
<i>T. patula</i>	Domesticada, Cultivada
<i>T. persicaefolius</i>	Silvestre, Ruderal
<i>T. pringlei</i>	Silvestre, Ruderal
<i>T. remotiflora</i>	Ruderal, Viaria
<i>T. subulata</i>	Silvestre, Ruderal
<i>T. subvillosa</i>	Silvestre, Ruderal
<i>T. tenuifolia</i>	Silvestre, Ruderal
<i>T. terniflora</i>	Silvestre, cultivada
<i>T. triradiata</i>	Silvestre, Ruderal
<b>Perennes</b>	
<i>T. arenícola</i>	Silvestre, Ruderal/Endémica
<i>T. hatwegii</i>	Silvestre
<i>T. lacera</i>	Silvestre/Endémica
<i>T. lemmonii</i>	Silvestre, Ruderal/Endémica
<i>T. linifolia</i>	Silvestre
<i>T. lucida</i>	Ruderal, Arvense, Semicultivada, Silvestre
<i>T. moorei</i>	Silvestre/Endémica
<i>T. mulleri</i>	Silvestre/Endémica
<i>T. nelsonii</i>	Silvestre/Endémica
<i>T. parryi</i>	Silvestre/Endémica
<i>T. palmeri</i>	Silvestre
<i>T. stenophylla</i>	Silvestre

Las características generales de la especie *Tagetes*, radica en ser plantas herbáceas o perennes, aromáticas al estrujarse, con hojas opuestas, por lo común pinnadas con numerosas glándulas oleíferas traslúcidas; flores hermafroditas, lígulas generalmente

presentes, fértiles, sus corolas amarillas, anaranjadas, rojizas o blancas; ramas del estilo truncadas y peniciliadas en el ápice con apéndices cónicos cortos (Serrato, 2010).

## 4.2.2 Distribución geográfica

En toda la República Mexicana se encuentran especies de *Tagetes*, aunque no todas las especies se distribuyen en las mismas regiones ni en los mismos estados.

En 1996, Turner da a conocer la distribución geográfica de especies de *Tagetes* en la República Mexicana (Tabla 4.3), nótese que *Tagetes nelsonii* G. sólo se encuentra en el estado de Chiapas.

**Tabla 4.3 Especies del género *Tagetes*, distribuidas en la República Mexicana (Turner, 1996).**

Región/Estados	Especies
<b>Norte</b>	
Baja California	<i>T. filifolia</i> (a), <i>T. micrantha</i> (a), <i>T. subulata</i> (a), <i>T. lacera</i> (p), <i>T. lunulata</i> (a)
Sonora	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> (p), <i>T. micrantha</i> , <i>T. palmeri</i> (p), <i>T. lemmonii</i> (p), <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i> (a), <i>T. minuta</i> (a)
Chihuahua	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. pringlei</i> (a), <i>T. subulata</i>
Coahuila	<i>T. coronopifolia</i> (a), <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i>
Nuevo León	<i>T. lucida</i> , <i>T. mulleri</i> (p), <i>T. micrantha</i>
Tamaulipas	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. erecta</i>
Sinaloa	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i>
Durango	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. epapposa</i> (a), <i>T. foetidissima</i> (a), <i>T. elongata</i> (a), <i>T. remotiflora</i> (a), <i>T. erecta</i>
Zacatecas	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lucida</i>
<b>Centro Sur</b>	
San Luis Potosí	<i>T. erecta</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. parryi</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Aguascalientes	<i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. pringlei</i>
Guanajuato	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. subulata</i>
Nayarit	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i>
Jalisco	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i>
Colima	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Michoacán	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. triradiata</i>
Guerrero	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> ,
Oaxaca	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. oaxacana</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Veracruz	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Puebla	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. linifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Tlaxcala	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. linifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i>
México	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Morelos	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Hidalgo	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Querétaro	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. moorei</i> (a-sp-p), <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i>
<b>Sur-Sureste</b>	
Chiapas	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. nelsonii</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. tenuiflora</i>
Yucatán	<i>T. erecta</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Tabasco	<i>T. lucida</i>

Más adelante, en las investigaciones actualizadas por Serrato (2010), ubica las especies de *Tagetes* en el territorio mexicano, encontrando que al norte se tienen cinco especies perennes (tres de ellas son endémicas) y 12 anuales. En el sur existen 13 especies, una perenne (endémica) y 12 anuales que también se encuentran en la región centro-sur. En el

centro-sur convergen las cadenas montañosas más importantes de México: Sierras Madre Occidental, Oriental, del Sur y Eje Neovolcánico, conjugándose diversos climas, suelos, geología, relieve, diversidad ambiental asociada con especies endémicas a nivel local o de la región. (Figura 4.3)

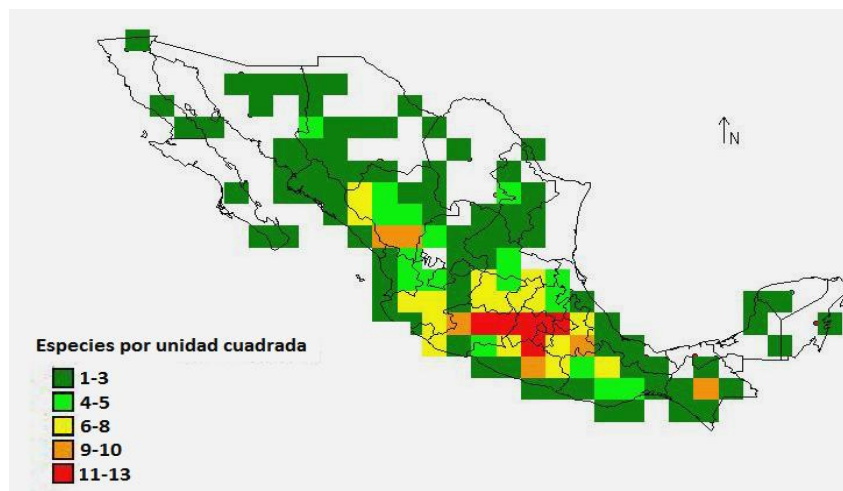


Figura 4.3 Estimación de la riqueza del género *Tagetes* en México (Serrato, 2010), los colores indican las especies por unidad cuadrada. Chiapas posee de 9 a 10 especies.

### 4.3 PRINCIPALES COMPONENTES FITOQUÍMICOS Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DEL GÉNERO *TAGETES*

La diversidad química está determinada genéticamente y estrictamente relacionada a las especies. Por lo que la composición química del género *Tagetes*, varía entre especies (Marotti, R, B, & I, 2004).

El contenido y cantidad de compuestos es afectado por factores como el hábitat de la planta, la etapa fenológica, las diferentes partes de las que se extrae, la composición del suelo y la fertilización mineral (Macías A & Galindo C., 2001), por lo que es común encontrar diferencias en el contenido de compuestos, aún entre plantas de la misma especie. Algunos de los compuestos encontrados en las especies del género *Tagetes* pertenecen a los grupos de alcoholes, éteres, aldehídos, acetonas, ésteres, carotenoides, flavonoides, tiofenos, terpenos y cumarinas (Marotti, R, B, & I, 2004).

Las propiedades biológicas de estas plantas afectan a diversos organismos, desde bacterias, virus, hongos, nemátodos, ácaros e insectos e inclusive otras especies de plantas (Serrato y Quijano, 1993).

Rai y Mares (2003) estudiando la presencia de aceites esenciales de 295 familias de plantas reportaron que las lactonas sesquiterpénicas son características de la *Asteraceae*. Al parecer, la variabilidad ambiental tiene que ver con la composición del aceite, al respecto.

Existen algunas especies del género que comparten compuestos químicos, mientras que otros compuestos sólo se encuentran en una sola especie (Tabla 4.4)

Tabla 4.4 Compuestos químicos con actividad fungicida, fungistática y nematocida del género *Tagetes* (Extraído directamente de Barajas, 2009).

Actividad / especie	<i>T. lucida</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. filifolia</i>	<i>T. minuta</i>	<i>T. patula</i>
Efecto fungicida	1,8-Cineol	1,8-Cineol	$\alpha$ -Tertienil	1,8-Cineol	Ácido cafeico
	Anetol	$\alpha$ -Tertienilo	Anetol	Ácido acético	Kaempferol
	Anisaldehído	Kaempferol	Anisaldehído	$\alpha$ -Tertienil	Ácido
	Cariofileno		Citral	$\beta$ -Felandreno	Cumárico
	Chavicol			Bornéol	Quercetin
	Herniarin			Cariofileno	
	Linalol			Ocimeno	
	Metil-eugenol			Citral	
	Mirceno			Geraniol	
	Tiofeno			Cimeno	
Efecto fungistático	Limoneno		Limoneno	Carvon	
	Metil-eugenol			Acido fórmico	
Efecto nematocida	1,8-Cineol	1,8-Cineol	$\alpha$ -Tertienil	1,8-Cineol	
	Chavicol	5-3-1	Citral	5-3-1 Butenil	
	Limoneno	Butenil	Limoneno	2-2'Bitienil	
	Linalol	2-2 Bitienil		$\alpha$ -Terpineol	
	Metil-eugenol	$\alpha$ -Tertienilo		$\alpha$ -Tertienilo	
	Metil-isoeugenol			Borneol	
	Tiofeno			Carvon	
				Citral	
				Geraniol	
				Limoneno	
				Acido palmítico	
				4-Terpinenol	
				Tiofeno	
			Timol		

El género *Tagetes* posee una actividad biológica muy versátil; Dixit (2013) reporta acción antimicrobiana, analgésica y larvicida; Escobar y colaboradores, (2009) reportan que los extractos de *T. terniflora*, y *T. minuta* contienen un flavonoide denominado quercetagetina que ha mostrado actividad contra bacterias tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *P. aureginosa*; la especie *T. patula* posee actividad antifúngica y antibacterial.

Los aceites esenciales obtenidos de *T. minuta* y *T. erecta* poseen actividad frente a larvas y adultos de *Anopheles stephensi* y *T. lucida* contra *S. aureus* y *Candida albicans*.

#### 4.4 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos polifenólicos son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura uno o varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas.

Los fenoles son moléculas que tienen un grupo OH (hidroxilo) unido a un átomo de carbono de un anillo bencénico. La estructura que se encuentra en todos los fenoles está representada en la figura 4.4. Cabe mencionar que esa molécula por sí sola no presenta actividad farmacológica.

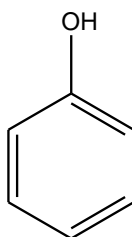


Figura 4.4 Estructura química del fenol.

Los polifenoles son antioxidantes naturales que juegan un papel importante en la defensa de las plantas contra microorganismos e insectos, ayudando a preservar su integridad continuamente amenazada por la exposición a factores ambientales tales como radiación UV y cambios bruscos de temperatura (Salinas V, 2011).

##### 4.4.1 Flavonoides

Los flavonoides se encuentran casi en cualquier vegetal superior, existen más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares. Su función en la planta es muy versátil; actúan como antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobianos, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos polinizadores, entre otros.

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A derivado de la cadena del policétido, un anillo B, derivado del ácido shikímico y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano, por lo que su esqueleto básico es una estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y el esqueleto recibe el nombre de flavano (Figura 4.5).

Generalmente la parte alquílica puede ser una cadena abierta, como es el caso de las chalconas, o bien formar un sistema heterocíclico denominado C; estructura que poseen la mayoría de los flavonoides. El grado de oxigenación varía en los anillos A y B, encontrándose generalmente en las posiciones 3',4',5', 5 y 7; y en el C en la posición 3.

Los principales grupos funcionales unidos al esqueleto hidrocarbonado son hidroxilo, metoxilo y metilendioxi. Los flavonoides pueden estar en forma libre o unidos a carbohidratos. Las polimerizaciones son frecuentes, hay muchos monómeros, algunos dímeros, pocos trímeros y tetrámeros; la mayoría son polímeros entre los cuales se encuentran los taninos condensados. La polimerización ocurre principalmente por uniones C-C y a medida que ésta aumenta, se intensifica el color (Marcano y Hase, 2002).

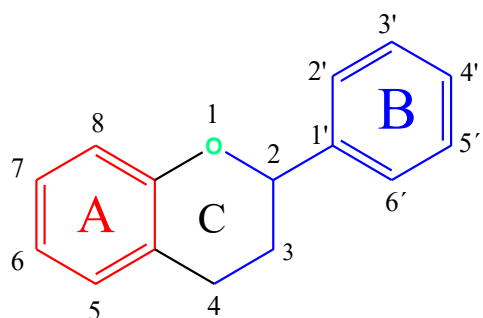


Figura 4.5 Núcleo de flavano.

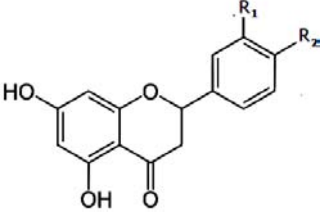
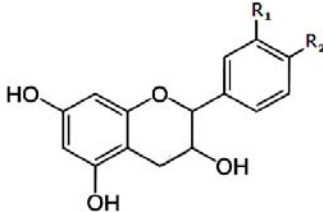
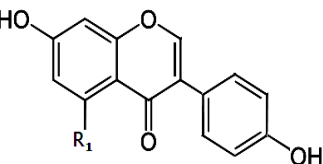
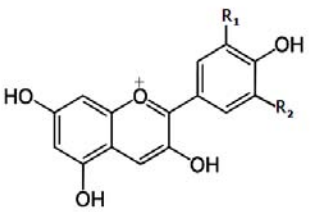
La clasificación de los flavonoides (Tabla 4.5) se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B (puede estar en el carbono 2 o en el 3 como es el caso de los isoflavonoides). Dentro de cada grupo existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar como los metilos, azúcares y ácidos orgánicos.

Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares son considerados compuestos polares, por lo que son moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, dimetilsulfóxido y agua (Romo de Vivar, 2006).

Tabla 4.5 Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides.

Tipo de flavonoide	Estructura	Ejemplo
Flavonoles		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rutina</li> <li>• Quercetina</li> <li>• Kaempferol</li> </ul>
Flavonas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luteolina</li> <li>• Apigenina</li> </ul>

Tabla 4.5. (Continuación) Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides.

<p><b>Flavanonas</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hesperetina</li> <li>• Naringenina</li> </ul>
<p><b>Flavanoles</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catequina</li> <li>• Epicatequina</li> </ul>
<p><b>Isoflavonas</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Daidzeína</li> <li>• Genisteína</li> </ul>
<p><b>Antocianinas</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cianidina</li> <li>• Delfinidina</li> </ul>

#### 4.4.2 Actividad biológica

Las funciones biológicas de los flavonoides dentro del organismo han sido establecidos claramente por Gil, Gómez & Trejos (2008), ellos reportan que este grupo de metabolitos posee varias funciones anticancerígenas, citotóxicas, antimicrobianas, antifúngicas, antiprotozoarias, antiinflamatorias y antioxidantes, del mismo modo Estrada (2012) agrega a la lista acciones de importancia farmacológica como la disminución de la fragilidad capilar, reducción del colesterol, protección y regeneración hepática, antitrombótico, antiulcérico, antiviral, cardiotónico, analgésico, antibacterial, antineoplásico, protección contra los efectos de los rayos UV, ansiolítico, incrementa la memoria, el aprendizaje y el funcionamiento cognitivo.

#### 4.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO PRELIMINAR

El tamizaje fitoquímico o *screening* fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta (alcaloides, cianogénicos, glicósidos cardiotónicos,



terpenoides, flavonoides, saponinas, cumarinas, aminas, taninos y lignanos) y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Sharapin, 2000).

El tamizaje fitoquímico consiste en realizar un extracto de la planta con disolventes apropiados que se difunden sobre el material vegetal y solubilizan los compuestos con polaridad similar (Prashant, 2011). Posteriormente se realiza la aplicación de reactivos que promueven la identificación de metabolitos secundarios a través de reacciones físicas y químicas mayoritariamente coloridas y de precipitación.

#### 4.6 TIPOS DE EXTRACCIÓN

La extracción es la técnica de separación de porciones activas de plantas y tejidos usando disolventes selectivos a través de procedimientos estandarizados.

Las técnicas generales de extracción de plantas medicinales incluyen maceración, infusión, percolación, digestión, decocción, Soxhlet, en contracorriente, utilizando energías alternas como microondas y ultrasonido (sonicación), y fluidos supercríticos. Para plantas aromáticas se utilizan técnicas como destilación por arrastre de vapor, hidrodestilación y enfleurage. Otras técnicas más recientes son el *Headspace* dinámico automático, microextracción en fase sólida, extracción de protoplastos, microdestilación, termomicrodestilación y destilación molecular (Prashant, 2011).

Los parámetros básicos que influyen en la calidad de un extracto son:

- Parte de la planta utilizada como material de partida
- Disolvente utilizado para la extracción
- Procedimiento de extracción

Los efectos fitoquímicos extraídos de plantas depende de:

- El origen y la naturaleza del material vegetal
- Grado de procesamiento
- Contenido de humedad
- Tamaño de partícula

Las variaciones en diferentes métodos de extracción que afectan a la composición y cantidad de metabolitos secundarios de un extracto dependen de:

- Tipo de extracción
- Tiempo de extracción
- Temperatura
- Naturaleza del disolvente (polaridad)
- Concentración de disolvente

## 4.7 ELECTROFORESIS CAPILAR

Electroforesis capilar (EC) es una técnica de separación e identificación de compuestos químicos, que se fundamenta en la migración de partículas o moléculas cargadas en un sistema cuando están bajo un campo eléctrico en presencia de un medio conductor usualmente acuoso (Heiger, 1997).

La EC se lleva a cabo en un capilar de sílice fundida de diámetro muy pequeño (10-200  $\mu\text{m}$ ). El uso de estos capilares tiene múltiples ventajas (Osatinsky, 2007):

- a) Los capilares son anticonvectivos en sí mismos, por lo tanto, no es necesaria la utilización de un gel soporte como medio.
- b) El calor generado al pasar la corriente eléctrica (efecto Joule), que daría lugar a problemas de gradientes de temperatura no uniformes (cambios locales de viscosidad), es fuertemente reducido, ya que la disipación de calor es muy efectiva.
- c) Pueden aplicarse altos voltajes consiguiéndose una reducción del tiempo de análisis y altas eficiencias.

La separación por EC es muy rápida, con una reproducibilidad que muestra coeficientes de variación (CV)  $< 2$ , siendo bastante precisa.

### 4.7.1 Instrumentación

El fenómeno de electroforesis se lleva a cabo al aplicar una diferencia de potencial entre 2 electrodos, lo cual genera un campo eléctrico dentro del tubo capilar lleno de una disolución tampón, o electrolito de separación (a pH constante) donde las moléculas se encuentren cargadas y pueda existir movilidad. Debido a que la pared del capilar muestra cargas y atrae a iones de carga contraria del buffer, esto hace que se genere una doble capa con la aparición de un flujo de disolución (Abrego R., 2015) llamado flujo electroosmótico (FEO).

Un sistema de electroforesis capilar (Figura 4.6), se compone principalmente de los siguientes elementos (Castillo R. R., 2002):

- Viales de entrada y salida: Colocados en los extremos del capilar para que este se llene del electrolito soporte, así como los electrodos.
- Sistema de inyección: que contiene la muestra momentáneamente y lo introduce al capilar.
- Capilar: Elaborado de sílice fundida, recubierto en el exterior de poliamida, cuenta con una abertura interna que va de 10 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tiene la función de puente entre los electrodos cerrando el circuito eléctrico.
- Sistema de refrigeración: Disipa el calor producido en el capilar

- Fuente de poder: Aplica la diferencia de potencial entre los electrodos para llevar a cabo la separación (voltaje de 0 a 30 kV, autoreversible).
- Sistema de detección: detecta la señal emitida por el sistema
- Registro de datos: Presenta los datos obtenidos del análisis (electroferograma).

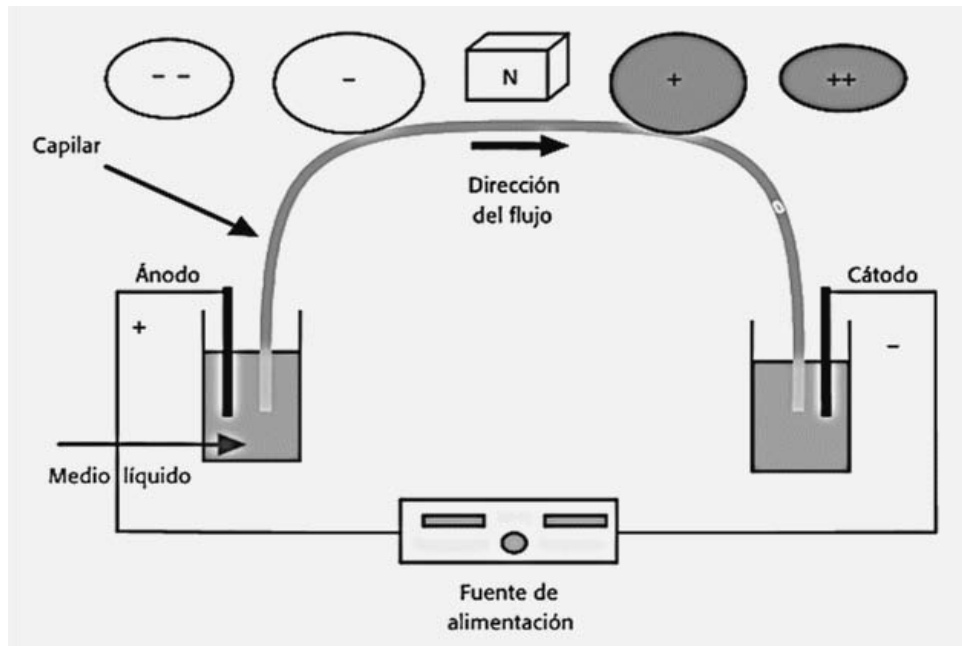


Figura 4.6 Esquema representativo del proceso de electroforesis capilar (Sierra A., Gómez R., Pérez Q., & Morante Z., 2010).

#### 4.7.2 Principios de separación

Si la muestra se coloca en el ánodo (extremo del capilar con carga positiva) y se aplica una diferencia de potencial entre los 2 electrodos separados por un electrolito (buffer), los iones de la muestra migrarán a través del tubo a diferentes velocidades y en diferentes direcciones, en función del tamaño del ion, de la magnitud y signo de la carga. Así los cationes migrarán hacia el cátodo mientras que los aniones migrarán hacia el ánodo y la velocidad de migración dependerá de la relación carga/masa. Para un mismo valor de carga, los iones de menor tamaño migrarán a mayor velocidad que los iones de mayor tamaño, y para un mismo tamaño, los iones con mayor carga migrarán más rápido que los iones con menor carga. Las moléculas neutras presentes en la muestra no poseen movilidad por lo que no se verán afectadas por el campo eléctrico.

Sin embargo, bajo la acción del campo eléctrico el tampón o electrolito de separación, por lo general, se moverá hacia el cátodo arrastrando con él a todos los componentes de la muestra que se encuentren dentro del capilar, esto se denomina flujo electroosmótico (FEO). De esta manera, los componentes neutros y los aniones también se moverán hacia el

electrodo negativo, aunque más despacio que los cationes (Figura 4.7) (Sierra A., Gómez R., Pérez Q., & Morante Z., 2010).

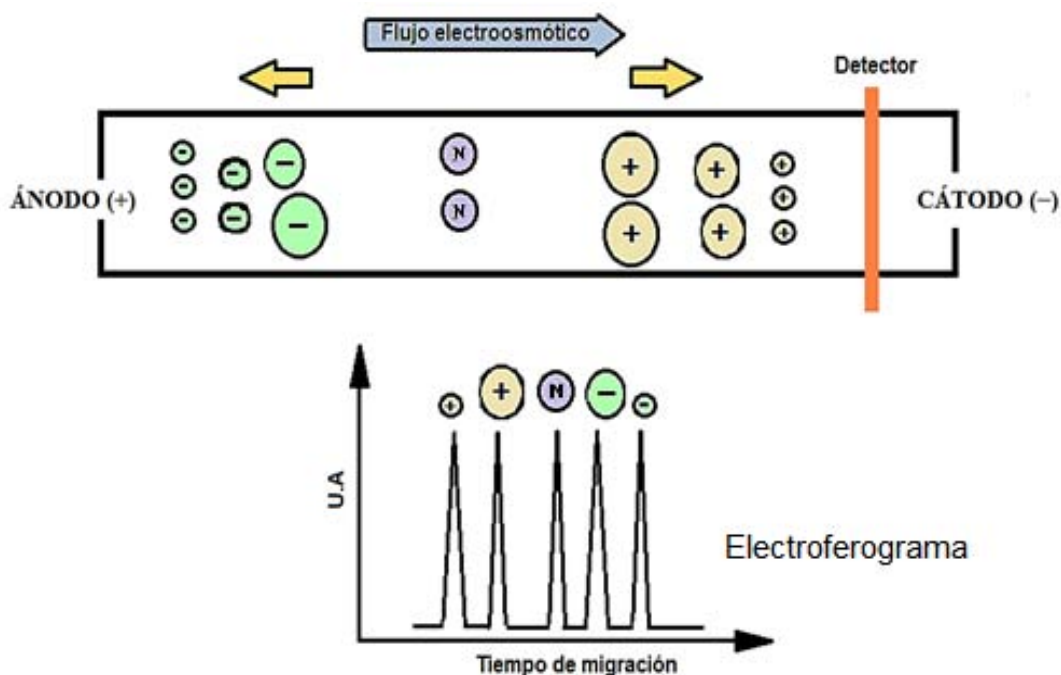


Figura 4.7 Representación general de la separación electroforética.

El flujo electroosmótico se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada (capilar de sílice). La superficie del capilar (con carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol a  $\text{pH} < 4$ ) con sus contraiones positivos del buffer, forma una doble capa eléctrica (Figura 4.8) con el consecuente flujo del disolvente hacia el cátodo (Cortés, 2015).

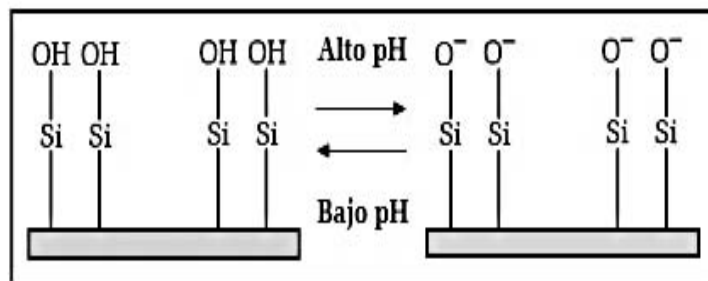


Figura 4.8 Equilibrio de los grupos silanol en la pared del capilar en función del pH (Cortés, 2015).

## 4.8 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un proceso de emisión de interés analítico basado en la excitación de átomos o moléculas por absorción de un haz de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, devolviendo su exceso de energía como fotones (Skoog, West, F., & James, 1997).

Algunos compuestos orgánicos presentan fluorescencia, de aquí la especificidad y utilidad de las técnicas fluorométricas. Algunos hidrocarburos aromáticos y heterociclos fusionados aromáticos son ejemplos de estructuras moleculares con fluorescencia natural. Para que una molécula produzca fluorescencia es necesaria una estructura molecular absorbente. En general puede esperarse que haya fluorescencia con moléculas que contienen un sistema altamente conjugado. Por lo menos un grupo dador de electrones como el grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) o el hidroxilo ( $\text{OH}$ ), debe formar parte del sistema conjugado. Los grupos que retiran densidad electrónica como el  $\text{COOH}$  o el  $\text{NO}_2$  reducen y en algunos casos impiden la fluorescencia (Ovalles, León, Calderón, & Buchheister, 2002).

La fluorescencia crece a medida que aumenta la rigidez molecular, es decir, una reducción de la vibración interna de la molécula. (Alfonso, 2003).

### 4.8.1 Teoría de la fluorescencia molecular

La figura 4.9, muestra el diagrama parcial de energía de una especie molecular hipotética. Se muestran tres estados de energía electrónicos  $E_0$ ,  $E_1$  y  $E_2$ , donde  $E_0$  es el estado fundamental y  $E_1$  y  $E_2$  son estados excitados, cada uno de éstos poseen varios subniveles vibracionales debidos a las deformaciones térmicas de la molécula, representados por los números 1, 2, 3 y 4. Así también se indica que cuando una molécula se expone a una banda de radiación visible  $\lambda_1$  hasta  $\lambda_5$ , se pueblan momentáneamente los cinco estados vibracionales del estado electrónico de relativamente baja energía  $E_1$ . De forma análoga, cuando la molécula se irradia con una banda de radiación ultravioleta, constituida de longitudes de onda más cortas de  $\lambda_1$  hasta  $\lambda_5$ , en poco tiempo se pueblan los cinco niveles vibracionales del estado energético de mayor energía  $E_2$  (Skoog, West, F., & James, 1997). La energía lumínica solamente puede ser absorbida cuando una molécula se mueve de un estado inferior a otro de superior energía. Este tipo de transiciones se representan en los diagramas de niveles de energía por líneas verticales. Si la molécula se halla en su estado no excitado (estado fundamental) y la energía absorbida es mayor que la necesaria para alcanzar el primer estado electrónico excitado, el exceso de energía puede resultar absorbido como energía de vibración, de modo que la molécula se encontrará en uno de los niveles de vibración que se muestran en la figura 4.9. Esta energía de vibración se disipa rápidamente por colisiones con las moléculas del disolvente (si la molécula excitada se encuentra en disolución) y la molécula desciende hasta el nivel de vibración inferior del estado electrónico.

El posterior retorno de la molécula al estado fundamental se produce emitiendo luz (fluorescencia) o bien a través de una transición no radiante. La luz emitida tendrá menos energía que la absorbida, debido a que parte de ella se ha perdido en el descenso al nivel de vibración inferior, o lo que es lo mismo, tendrá una longitud de onda mayor. Es decir, la luz fluorescente siempre tiene una longitud de una mayor que la excitante (Harris C., 2003).

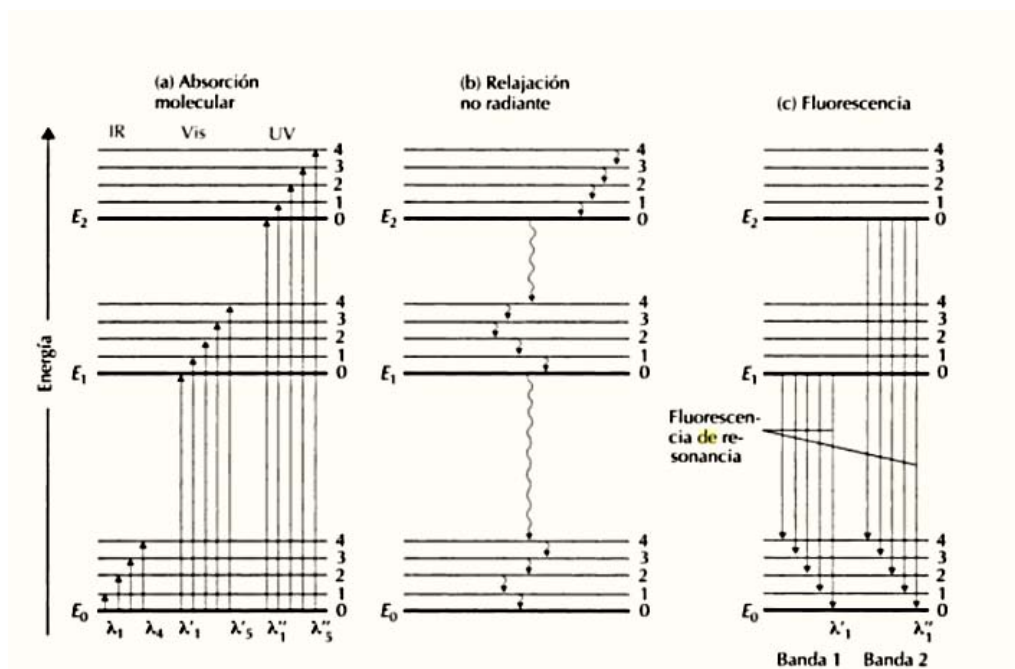


Figura 4.9 Diagrama de niveles de energía mostrando algunos de los cambios que ocurren en una especie molecular (Skoog, West, F., & James, 1997).

#### 4.8.2 Instrumentación

En la figura 4.10, se presenta el esquema típico de un aparato para la medición de fluorescencia. Un rayo de luz de elevada intensidad atraviesa un monocromador para seleccionar la longitud de onda de excitación (es decir, una longitud de onda eficientemente absorbida por el compuesto fluorescente). El haz de luz excitadora atraviesa, a continuación, una cámara que contiene la muestra. Para evitar la detección del rayo incidente se aprovecha el hecho de que la fluorescencia se emite en todas direcciones, y se mide ésta únicamente desde el ángulo recto respecto al rayo incidente.

En la técnica se selecciona una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{EX}$ ) mediante el monocromador, y se observa la luminiscencia a través del segundo monocromador, colocado de ordinario a  $90^\circ$  respecto a la luz incidente. Si se mantiene la longitud de onda de excitación fija, y se registra la radiación emitida, se obtiene el espectro de emisión (Freifelder, 2003).

Un espectro de emisión es la representación de la intensidad de emisión frente a la longitud de onda. Un espectro de excitación se obtiene variando la longitud de onda de excitación, y midiendo la luz emitida a una longitud de onda determinada de emisión ( $\lambda_{Em}$ ).

La espectroscopía de fluorescencia ofrece límites de detección más bajos que los de la espectrometría de absorción. Puede medirse una cantidad de 1.1  $\mu\text{g/L}$  y mantenerse la linealidad hasta los 10,000  $\mu\text{g/L}$ . El método es aplicable a la determinación cuantitativa de sustancias fluorescentes (Alfonso, 2003).

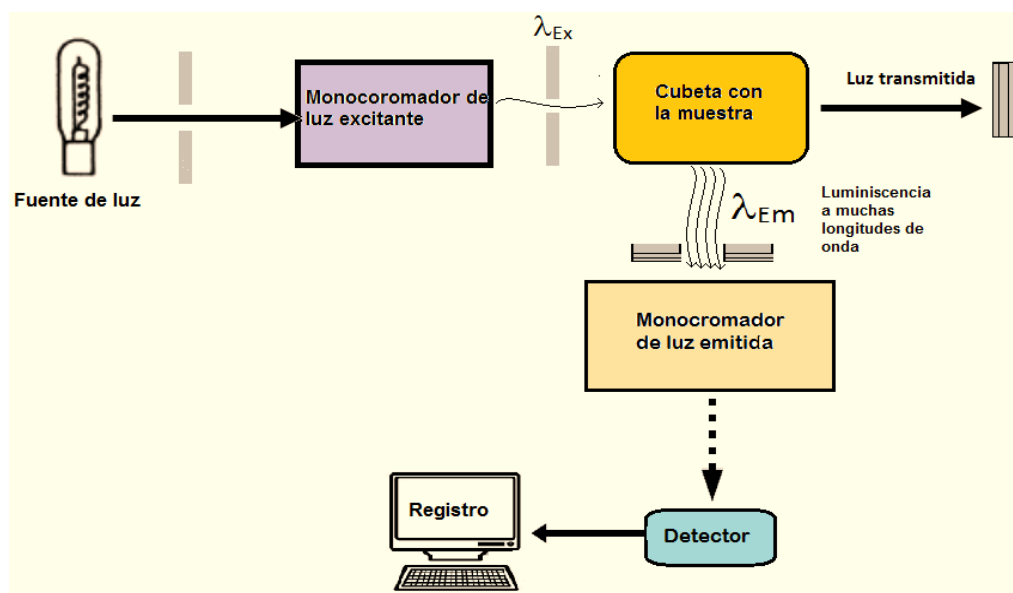


Figura 4.10 Esquema general de los componentes básicos de un espectrofotómetro de fluorescencia.

Algunos iones de lantánidos trivalentes en un medio acuoso a temperatura ambiente tienen fluorescencia, debido principalmente a la transición del nivel 4f, sin embargo, estas especies mantienen una fluorescencia débil por sus absorptividades molares bajas y pobres rendimientos cuánticos. Sin embargo, cuando estos iones, en particular  $\text{Eu}^{3+}$  y  $\text{Tb}^{3+}$  forman quelatos con ligandos que tienen una amplia e intensa banda de absorción su fluorescencia puede ser marcadamente mejorada. El cambio de energía intramolecular de una molécula orgánica en estado excitado por su nivel de resonancia, seguido por la energía de emisión de los lantánidos son responsables de la excitación del ion lantánido complejoado mejorablemente fluorescente. Si no es eficiente la transferencia de energía intramolecular, los niveles superiores de emisión del ion son excitados de manera más eficaz mediante esta técnica que por la forma directa, produciendo una mejora en la fluorescencia en varios órdenes de magnitud. Este fenómeno ha sido denominado fluorescencia sensibilizada de lantánidos, que es de notable interés para la determinación de trazas de iones lantánidos y una variedad de compuestos de importancia médica. (Shaghaghi, Jamshid, & Abolghasem, 2008).

## 5 HIPÓTESIS

---

Si la planta chilchahua (*Tagetes nelsonii* Greenm) tiene importantes beneficios curativos según lo reportado por la sabiduría popular, entonces es probable que esta especie contenga como constituyentes bioactivos varios polifenoles.



## 6 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 6.1 REGISTRO ETNOBOTÁNICO

El procedimiento llevado a cabo para obtener la información etnobotánica de *Tagetes nelsonii* Greenm, consistió primeramente en realizar una revisión bibliográfica, reconocimiento de la zona, indagación y conexión con personas clave dentro de la comunidad.

Para obtener la muestra se entrevistaron personas al azar en las calles, caminos, plazuelas, mercados, y casas de cinco municipios y una comunidad rural de la región Altos del Estado de Chiapas. Algunas de estas personas servían de conexión para localizar curanderos, hierberos y personas dedicadas a la venta de productos naturales y orgánicos.

Se les aplicó una entrevista semiestructurada (Anexo 11.1K), que coadyuvó a obtener datos de reconocimiento, nombres populares, usos medicinales, partes utilizadas, modo de preparación, cantidad y vía de administración de la planta. Cabe mencionar que varias entrevistas fueron hechas con el apoyo de un traductor local del castellano a la lengua tzotzil y viceversa, de tal forma que pudiera existir una comunicación amena y efectiva.

Localidades entrevistadas (Figura 6.1):

- San Cristóbal de las Casas: Centro histórico y mercado principal “José Castillo Tielmans”
- San Andrés Larrainzar
- San Pedro Chenalhó
- Yabteclum
- Aldama
- San Juan Chamula

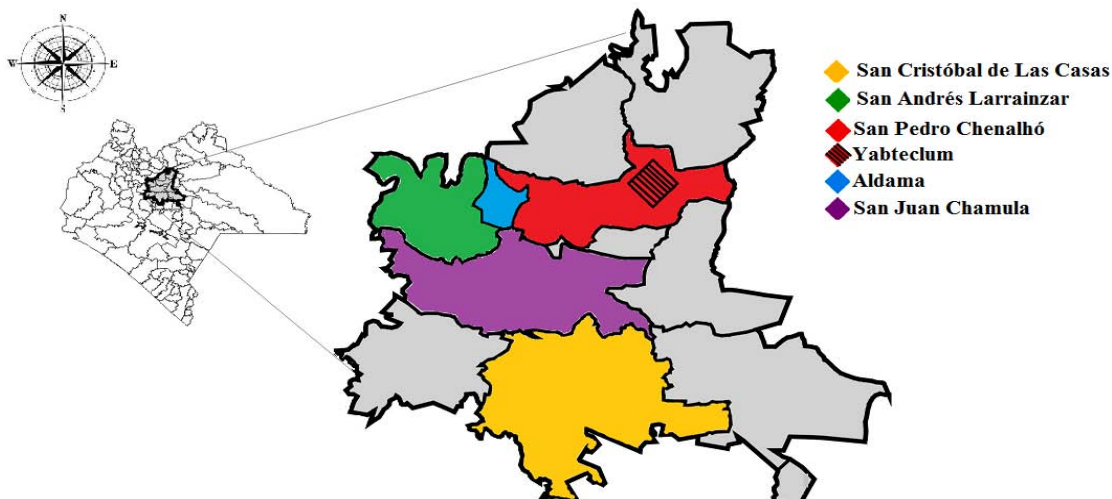


Figura 6.1 Localidades entrevistadas de la región Altos del estado de Chiapas [Mapa elaborado por Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.

## 6.2 MATERIA VEGETAL

La planta chilchahua silvestre (Figura 6.2) fue recolectada en la periferia de la zona denominada “Arcotete”, ubicada en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas.

Especificaciones de la zona:

Altitud: 2119 msnm

Latitud: 16°44'43" N

Longitud: 92°34'38" O

Región fisiográfica: Altiplanicie Central

Clima predominante: Templado húmedo con lluvias en verano. Temperatura máxima anual promedio de 32°C y el rango de temperaturas mínimas oscila entre -3°C y 11 °C.



Figura 6.2 Ejemplar de la planta chilchahua, recolectada en San Cristóbal de las casas, Chiapas. A, ejemplar completo; B Hojas; C y D, Flores amarillas dispuestas en racimos. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.

### 6.2.1 Recolección, separación y secado

La recolección debe llevarse a cabo con cuidado, garantizando la integridad de la planta, es decir, que ella o sus partes están protegidas contra la pérdida de principios activos, por lo que es muy importante conocer cómo es que se lleva a cabo el acopio del material vegetal. La chilchahua fue recolectada manualmente en el atardecer de la estación de verano del 27 de julio del 2014.

Las hojas y tallos se recolectaron en etapa de prefloración y las flores cuando éstas se encontraban totalmente abiertas; por lo que el material vegetal se dividió en hoja, tallos y flores.

La planta se secó naturalmente a la sombra durante una semana, protegida de la luz y el polvo (Figura 6.3).

Se apartaron dos ejemplares completos de la planta y se secaron entre hojas de papel secante y utilizando una prensa para su identificación botánica.



Figura 6.3 Separación y secado de *T. nelsonii* a) Flores, b) Hojas, c) Tallos [Fotografías tomadas en el Laboratorio de fitoquímica y farmacognosia L3-324 FESC-UNAM, 8 de agosto de 2014] Archivo de autor.

## 6.3 MATERIALES

### Reactivos

Tamizaje Fitoquímico	Determinación de polifenoles por electroforesis capilar	Cuantificación de flavonoides por espectrofluorimetría
<p>Disolventes</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetato de Etilo (Fermont)</li> <li>• Cloroformo (Fermont)</li> <li>• Etanol (Fermont)</li> <li>• Hexano (Fermont)</li> </ul> <p>Soluciones</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 10%</li> <li>• Etanol- agua (70:30)</li> <li>• FeCl<sub>3</sub> (Sigma- Aldrich)</li> <li>• H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fermont)</li> <li>• HCl (Fermont)</li> <li>• NaNO<sub>2</sub> (J. J Baker)</li> <li>• NaOH (Fermont)</li> </ul> <p>• Virutas de magnesio</p> <p><b>Reactivos de identificación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido Silicotungstico</li> <li>• Baljet</li> <li>• Börntrager</li> <li>• Felhing</li> <li>• Dragendorff</li> <li>• Hager</li> <li>• Keede</li> <li>• Liebermann-Burchard</li> <li>• Ninhidrina</li> <li>• Rosenthaler</li> <li>• Shinoda</li> <li>• Sudan</li> </ul>	<p>• Buffer de Boratos: A partir de Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub>*10H<sub>2</sub>O (J. J Baker) 50 mM, pH=9.4</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Etanol (Fermont)</li> <li>• NaOH (Fermont)</li> <li>• Mezcla de etanol-agua (50:50), (70:30) y (30:70)</li> <li>• Agua desionizada (18.2MΩ)</li> </ul> <p><b>Estándares (Sigma- Aldrich)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• (-)-Epicatequina</li> <li>• Ácido ascórbico</li> <li>• Ácido clorogénico</li> <li>• Apigenina</li> <li>• (+)-Catequina hidratada</li> <li>• Kaempherol</li> <li>• Quercetina hidratada</li> <li>• Rutina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloruro de Terbio hexahidratado (Sigma- Aldrich)</li> <li>• Quercetina hidratada (Sigma- Aldrich)</li> <li>• Tris(hidroximetilamino) metano (Sigma- Aldrich)</li> </ul>

## 6.4 EQUIPOS

- Equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter Capillary. Electrophoresis System con detector de arreglo de diodos (DAD) y cartucho con apertura No.8 (800 µm) (Fullerton, CA, USA), 32 Karat, Software.
- Espectrofotómetro de Fluorescencia RF-5301PC, Shimadzu Scientific Instruments, Inc. (Columbia, MD USA). Personal Fluorescence Software, Version 2.00.
- Agitador magnético Mirak™ Digital Thermolyne SP 72725.
- Balanza analítica BOECO (Alemania).
- Baño de ultrasonido Transsonic T570 Elma® (Alemania).
- Centrifuga Allegra™ 21, BeckmanCoulter (Fullerton, CA. USA).
- Desionizador Milli-Q™ Millipore, (MA USA).
- Termobalanza OHAUS®, MB45 (USA).
- pH-metro sensION™ + PH31 Hach (Italia).
- Picadora clásica 1, 2,3, Moulinex®.
- Tamices (Malla No.: 40, 50, 60, 80, 100, 120).



## 6.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico permitió determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal *Tagetes nelsonii* Greenm.

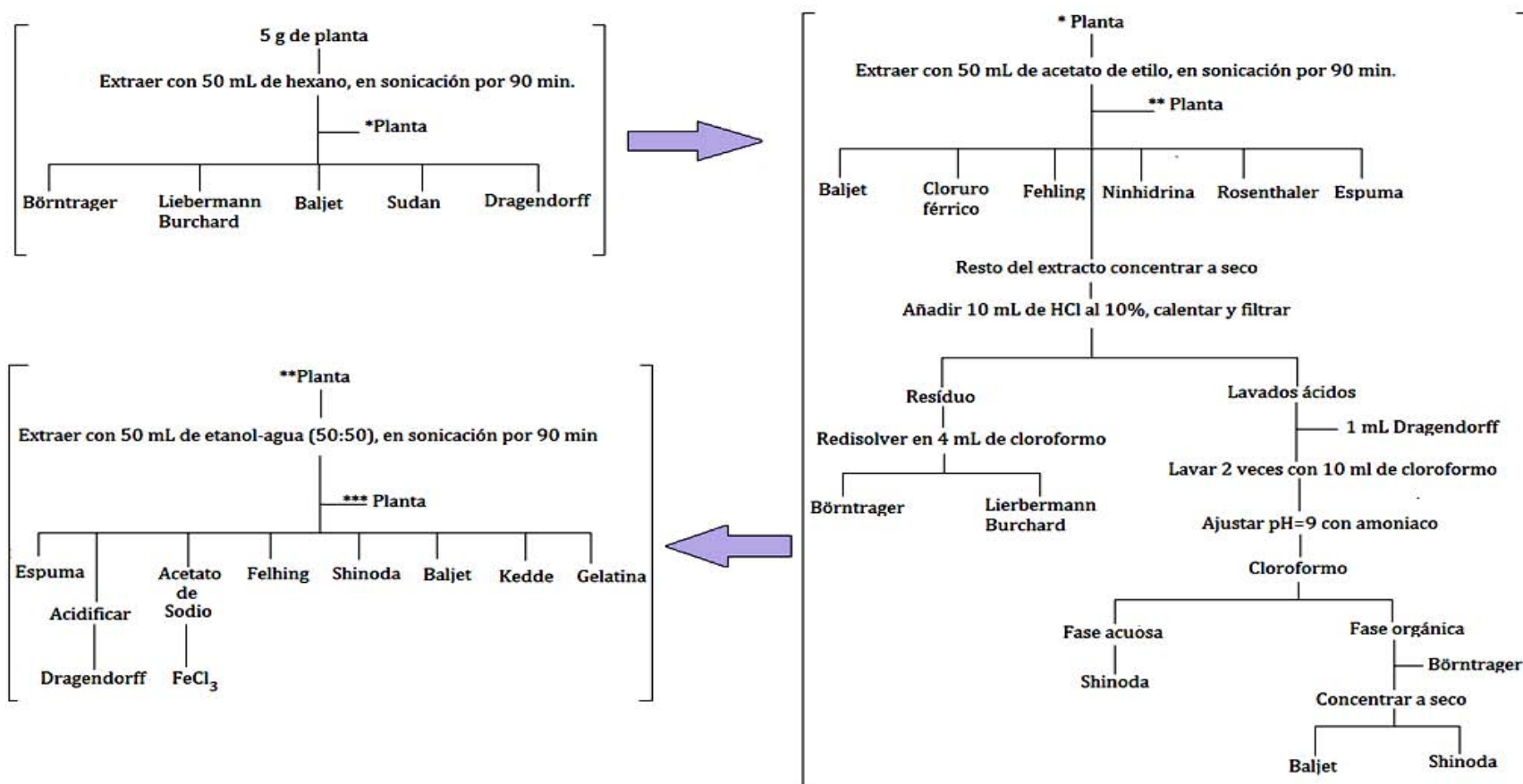


Figura 6.4 Marcha fitoquímica para la determinación presuntiva de los metabolitos presentes en *Tagetes nelsonii* G.

## 6.6 MOLIENDA

Se realizó la molienda de la parte aérea de la chilchahua en una picadora clásica 1, 2, 3 marca Moulinex® (Figura 6.5), bajo las condiciones mostradas en la Tabla 6.1:

Tabla 6.1 Condiciones de molienda de la chilchahua (*Tagetes nelsonii* G).

Muestra	Tiempo de molienda	Partes de la planta
A	1 minuto	Hojas, flores y tallos
B	3 minutos	Hojas, flores y tallos

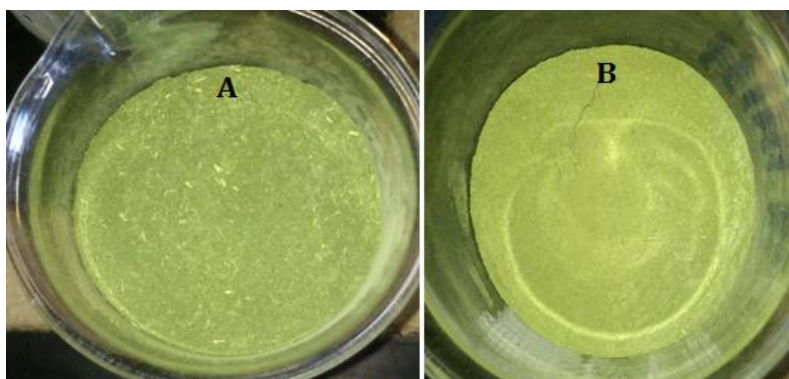


Figura 6.5 Molienda de *Tagetes nelsonii* G. A (1 min), B (3 min).

## 6.7 HUMEDAD

La humedad se determinó en una termobalanza pesando 0.519 g de muestra **A** y 0.513 g de muestra **B**.

La humedad se determinó automáticamente por el equipo después de un tiempo de 10 minutos.

## 6.8 TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se seleccionaron 5 tamices (Mallas No.: 40, 60, 80, 100, 120).

Dichos tamices fueron apilados de abajo hacia arriba comenzando con la malla 120 hasta la malla 40.

Se pesó 2.00 g de la muestra **A** poniéndolo sobre la malla 40.

En seguida se colocaron todos los tamices apilados sobre un vibrador mecánico y se puso en marcha durante 5 minutos.

Se repitió el procedimiento pesando 2.06 g de la muestra **B**.

## 6.9 PLANEACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS PARA ENCONTRAR LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

Para obtener las mejores condiciones para la extracción de los polifenoles, se planeó un diseño experimental factorial completo  $2^3$ . La tabla 6.3 muestra los diez experimentos obtenidos con ayuda del software Design expert®, para un análisis a fondo de factores como: el proceso de extracción, tamaño de partícula y composición hidroalcohólica, con el fin de obtener los modelos experimentales más representativos. Cabe mencionar que dicho software se utilizó únicamente para obtener todas las combinaciones experimentales de acuerdo a las 3 variables introducidas (a 2 niveles) siendo:

**6.2 Factores y niveles utilizados en el diseño experimental  $2^3$**

Factores	Nivel (+1)	Nivel (-1)
Composición del disolvente (% de etanol en agua)	70	30
Tipo de extracción	maceración	sonicación
Tamaño de partícula (No. malla)	40	60

Cabe aclarar que del diseño  $2^3$  se obtienen 8 experimentos, mas 2 repeticiones del punto central por lo que suman 10 experimentos. Cada experimento fue sometido al análisis por electroforesis capilar y los resultados obtenidos se discuten en los siguientes apartados.

**Tabla 6.3 Experimentos propuestos del diseño  $2^3$  obtenido con el software Design expert®.**

Experimento	Etanol -Agua %	Tipo de extracción	No. Malla	Acrónimos
01	50	Sonicado	50	<b>50S50</b>
02	70	Sonicado	60	<b>70S60</b>
03	30	Sonicado	60	<b>30S60</b>
04	70	Macerado	60	<b>70M60</b>
05	30	Macerado	60	<b>30M60</b>
06	30	Macerado	40	<b>30M40</b>
07	70	Macerado	40	<b>70M40</b>
08	30	Sonicado	40	<b>30S40</b>
09	70	Sonicado	40	<b>70S40</b>
10	50	Macerado	50	<b>50M50</b>



## 6.10 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

### 6.10.1 Extracción por maceración dinámica

Se pesó 1.0 g de la muestra molida de chilchahua, en seguida se adicionó 10 mL de etanol. Se selló con papel Parafilm® y se dejó macerando con agitación durante 12 horas, protegiéndolo de la luz para evitar la degradación de los compuestos presentes en la planta. Posteriormente se trasvasó el extracto a tubos de centrifuga de polisulfona y se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos.

El sobrenadante se filtró a través de acrodiscos milipore de 0.45 µm de tamaño de poro, y finalmente el filtrado fue sometido al proceso de separación por electroforesis capilar.

### 6.10.2 Extracción asistida por ultrasonido

Se pesó 1.0 g de la muestra molida de chilchahua, a continuación se adicionó 10 mL de etanol, se selló con papel Parafilm® y se sometió a sonicación por un periodo de 90 minutos. Posteriormente se trasvasó el extracto a tubos de centrifuga de polisulfona y se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos.

El sobrenadante se filtró a través de acrodiscos millipore de 0.45 µm de tamaño de poro, y finalmente el filtrado fue sometido al proceso de separación por electroforesis capilar.

## 6.11 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENOLES POR ELECTROFORESIS CAPILAR

### Características del capilar para electroforesis:

- **Capilar:** Capilar de sílice fundida con recubrimiento externo de poliimida.
- **Diámetro interno:** 50 µm.
- **Longitud total:** 52.0 cm.
- **Longitud al detector:** 41.5 cm.
- **Cartucho con apertura:** #8
- **Equipo de detección:** DAD 200 nm

En la tabla 6.4, se resume el procedimiento llevado a cabo, cuyas condiciones se mantuvieron durante la separación e identificación de compuestos fenólicos.

Tabla 6.4 Metodología utilizada en la separación de polifenoles por electroforesis capilar.

<b>Acondicionamiento del capilar nuevo</b>						
No.	Acción	Medida	Valor (psi)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Solución
1	Lavado	Presión	20	3	25	Agua desionizada
2	Lavado	Presión	20	10	40	NaOH 0.1 M
3	Lavado	Presión	20	2	25	NaOH 0.1 M
4	Lavado	Presión	20	3	25	Agua desionizada
5	Lavado	Presión	20	10	25	Buffer Boratos 50 mM
<b>Lavado de inicio de día</b>						
No.	Acción	Medida	Valor (psi)	Tiempo (min)		Solución
1	Enjuague	Presión	20	2		Agua desionizada
2	Enjuague	Presión	20	10		NaOH 0.1M
3	Enjuague	Presión	20	2		Agua desionizada
4	Enjuague	Presión	20	10		Buffer Boratos 50 mM
<b>Separación de compuestos fenólicos (Detección a 200 nm)</b>						
No.	Acción	Medida	Valor	Tiempo		Solución
1	Enjuague	Presión	40 psi	15 min		Buffer Boratos 50 mM
2	Inyección	Presión	0.5 psi	5 s		Muestra
3	Espera	-----	-----	0.5 s		Buffer Boratos 50 mM
4	Separación	Voltaje	27 kV	30 min		Buffer Boratos 50 mM
<b>Lavado final de día</b>						
No.	Acción	Medida	Valor	Tiempo		Solución
1	Lavado	Presión	20 psi	3 min		Agua desionizada
2	Lavado	Presión	20 psi	10 min		NaOH 0.1M
3	Lavado	Presión	20 psi	5 min		Agua desionizada

## 6.12 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA CHILCHAHUA

Los compuestos polifenólicos presentes en la chilchahua se identificaron empleando electroforesis capilar, mediante la adición de estándares puros al extracto optimizado. Se reconoció la señal aumentada y consecuentemente se realizó la comparación de los espectros de absorción de las señales fortificadas con respecto a la de la muestra (Anexo 11. 2).

## 6.13 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA

La cuantificación de flavonoides totales fue realizada siguiendo la metodología reportada por Shaghghi M. (2009), basada en la formación de un complejo fluorescente de terbio-flavonoide, detectado por el equipo de fluorescencia a una intensidad máxima de emisión de 545 nm y 310 nm de excitación.

Para ello se elaboró una curva de calibración de estándar externo, con siete concentraciones que van de 0 a 2.033  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando quercetina estándar como patrón.

### 6.13.1 Preparación de los sistemas

- La curva de calibración se realizó a partir de una solución etanólica de quercetina hidratada estándar, 1000 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ , Solución A), enseguida se tomó 5 mL de la solución A y se llevó a un aforo con agua de 10 mL (Solución. B), nuevamente se tomó 2 mL de la solución B y se aforó con agua a 100 mL (Solución Stock, 10.16 ppm)
- Cloruro de Terbio 0.01M
- Solución Buffer de Tris(hidroximetilamino)metano 0.05 M, pH=7.0

Tabla 6.5 Sistema preparado para la elaboración de la curva de calibración de patrón externo (quercetina como patrón).

Sistema [ppm]	Buffer Boratos [mL]	Terbio [mL]	Stock de Quercetina [mL]
0	0.5	4	0
0.203	0.5	4	0.5
0.406	0.5	4	1
0.813	0.5	4	2
1.219	0.5	4	3
1.626	0.5	4	4
2.033	0.5	4	5

### 6.13.2 Determinación de la longitud de onda óptima:

Se definió la longitud de onda óptima, determinando el espectro de emisión de cada sistema, en un rango de 400-700 nm, una longitud de onda de excitación de 318 nm, y una abertura de rendija de 5 nm.

### 6.13.3 Cinética de reacción Tb-quercetina

La cinética de degradación del complejo terbio-quercetina se realizó utilizando la solución más concentrada (2.033 ppm) del sistema mostrado en la tabla 6.5, bajo las siguientes condiciones:

- Longitud de onda de excitación: 318 nm.
- Longitud de onda de emisión: 546 nm
- Abertura de rendija: 5 nm
- Tiempo de análisis: 8 horas, con lecturas por minuto.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 7.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE *Tagetes nelsonii* G.

En 1895 E. W. Nelson colectó por primera vez un ejemplar de *Tagetes nelsonii* G. en Tumbalá Chiapas, para la colección del herbario del Museo Nacional de los Estados Unidos (No. 3314 U.S. Nat. Mus.); más tarde, en 1903 el botánico Jesse More Greenman realizó la descripción botánica que asentó en: “*New and otherwise noteworthy angiosperms from México and Central America*” publicado por la revista *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*. Tiempo después, se realizaron otras descripciones de la planta por R. T. Neher, 1958, R. E. Delgado-Montaña, 1983 y A. Soule en 1993, concluyendo en la misma descripción botánica (JSTOR, 2008).

Villaseñor y Ortiz (2013) aseveran en sus estudios botánicos acerca de la familia *Asteraceae*, que tan sólo en la región Altos del estado de Chiapas existen 870 especies de vegetales, de los cuales 126 pertenecen a la familia *Asteraceae* y 13 de ellas se restringen exclusivamente a Chiapas y Guatemala, entre ellas *Tagetes nelsonii* G.

Hasta ese momento, los datos recabados fueron meramente botánicos y la información de sus propiedades medicinales únicamente se conocía por los nativos de la región.

En 1996 Ann y Brent Berlín publican *Medical ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, México: The gastrointestinal diseases*, en cuya obra mencionan su importante investigación sobre la diversidad de plantas medicinales que usan los tzotziles y tzeltales para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y otros padecimientos. Así mismo, se indica que en la región de Los Altos de Chiapas se reportan alrededor de 1600 plantas medicinales, de las cuales 64 integran el llamado cuadro básico de la farmacopea tzeltal-tzotzil. Los autores, enfatizan que las investigaciones realizadas van acompañadas de un sustento científico:

“In this volume on the medical ethnobiology of the tzeltal and tzotzil Indians, two Maya-speaking peoples who reside in the Highland of Chiapas, México, we present evidence that confirms the scientific bases of traditional medicine. Our data show that the Highland Maya have developed a large number of herbal remedies based on an astute understanding of the signs and symptoms of common disease conditions. Furthermore, the potential therapeutic efficacy of Maya herbal medicine is suggested by laboratory studies on the pharmacological properties affecting the agents associated with the ethnomedically identified clinical signs and symptoms that correlate closely with biomolecular medical disease categories.” (Berlín & Brent, 1996, cap. I, p. 4)

Entre las plantas estudiadas, se encuentra *Tagetes nelsonii* G., que contribuye a la mejora del enfermedades gastrointestinales, parasitarias y el dolor de cabeza. Sin embargo, en la

tabla 7.1 extraído directamente del libro, no se reporta la demostración científica de esta planta.

**Tabla 7.1 Algunas especies del cuadro básico de la farmacopea tzeltal - tzotzil de Los Altos de Chiapas. [Extraído de Brent & Berlín, (1996)].**

Categoría mayor de enfermedades (y subclase)	Especies primarias (En orden de importancia por subclase)	Propiedades farmacológicas demostradas y virtudes medicinales Mayas
Fracturas y esguinces	<i>Brugmasia candida</i> (Solanaceae) <i>Ricinus communis</i>	Actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, "caliente", bactericida, catártico, anticonceptivo, cianogénico, emoliente, veneno mortal, lactogogo, laxante, purgante, tónico, vermífugo
Fiebre	<i>Sambucus mexicana</i> (Caprifoliaceae) <i>Satureja brownei</i> (Lamiaceae) <i>Bryophyllum bipinnata</i>	Anodino, expectorante, febrífugo, hidragogo, sudorífico, "frío"
Dolor de cabeza	<i>Tagetes nelsonii</i>	
Infecciones de boca y dientes	<i>Rhus terebinthifolia</i> (Anacar.) <i>Rubus coriifolius</i> (Rosaceae) <i>Nicotiana tabacum</i> (Solanaceae)	Antimicrobiano, "frío" ("Caliente") (ver arriba)
Infecciones de los ojos	<i>Solanum americanum</i> (Solanaceae)	"En panamá se usa en gotas en ojos inflamados" "Frio"
Edemas	<i>Gautheria odorata</i> Wild. <i>Buddleia americana</i> L. <i>Buddleia crotonoides</i> A. Gray	Antibiótico, anticancerígeno Analgésico, anodino, diurético, hipnótico.
Enfermedades del aparato reproductor femenino	<i>Salvia cinnabarina</i> M. & G. <i>Salvia polystachya</i> Ortega <i>Ranunculus petiolaris</i> H. B.K. ex DC	Antiséptico
Dolores y malestares	<i>Senecio salignus</i> DC. <i>Ricinus communis</i> L. <i>Salvia cinnabarina</i> M. & G. <i>Salvia Rubiginosa</i> Benth	Anodino (Ver arriba)

El Dr. Xavier Lozoya y colaboradores realizan una investigación interdisciplinaria indicando que el extracto etanólico de *Tagetes nelsonii* G. en combinación individual con *Ageratina ligustrina*, *Smallanthus maculatus* y *Tithonia diversifolia*, poseen actividad antitumoral sobre las líneas celulares cancerígenas P388 y KB. (Lozoya, Tortoriello, Villarreal, Berlin, & Berlin, 1996)

Ezequiel Viveros, en el año 2013, realiza una investigación sobre el efecto terapéutico de distintas plantas medicinales sobre enfermedades gastrointestinales (Tabla 7.2), mencionando que *Tagetes nelsonii* G, posee actividad antibacterial, a su vez concluye que dicha planta se destaca por su posible presencia de compuestos con potencial antineoplásicos.

**Tabla 7.2. Especies medicinales usadas popularmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Chiapas, México (Viveros, 2013).**

Nombre científico/nombre popular	Familia	Parte	Desorden gastrointestinal	Actividad biológica	Forma de uso
<i>Salvia hispánica</i> L. Chía	Labiatae	Semilla	Laxante e indigestión	Antioxidante Espasmolítico	Crudo
<i>Satureja macrostema</i> (Benth) Satureja	Labiatae	Hoja/ tallo	Dolor de estómago Indigestión Cólicos	Espasmolítico	Infusión
<i>Stevia ovata</i> Pericón	Asteracea	Hoja	Dolor abdominal	Antibacterial	Infusión
<i>Smallanthu smaculatus</i> (Cav.) H. Robinson K'ail	Asteracea	Hoja/raíz	Parásitos	Espasmolítico	Infusión
<i>Solanum nigrescens</i> Martens & Galeotti Hierbamora	Solanaceae	Hoja	Laxante Gastritis	Antifúngico	Infusión
<i>Tagetes erecta</i> L. xpujuk	Asteracea	Hoja	Diarrea Dolor de estómago	Antibacterial	Infusión
<i>Tagetes nelsonii</i> Chilchahua	Asteracea	Hoja/tallo	Diarrea, parásitos, dolor abdominal	Antibacterial	Infusión
<i>Talisa oliviformis</i> Guaya	Asteracea	Hoja	Dolor abdominal, fiebre, diarrea	Antibacterial	Infusión
<i>Verbena litoralis</i> Verbena	Verbenaceae	Hoja	Dolor de estómago, vómito	Espasmolítico	Infusión
<i>Vernonia leiocarpa</i> DC. Batz'itzelo-pat	Asteracea	Hoja/flores	Dolor de estómago, náuseas, diarrea	Antibacterial	Infusión

Finalmente, Espinoza y colaboradores (2013), reportan los resultados positivos de la actividad antibacteriana y las propiedades farmacognósticas de *Tagetes nelsonii* G. Discute la importancia del consumo de esta planta por los pobladores de San Cristóbal de Las Casas para el tratamiento de enfermedades infecciosas digestivas y hace énfasis en que existe escasa información sobre su actividad biológica y nula sobre los componentes químicos de esta especie vegetal.

### 7.1.1 Sinonimia popular

Respecto a los nombres populares designados a *Tagetes nelsonii* G., el Programa de Colaboración sobre Medicina Indígena Tradicional y Herbolaria (PROCOMITH), en su publicación de 1990, reporta algunos nombres con los que se denomina a dicha especie según la etnia y región del estado de Chiapas (Tabla 7.3).

**Tabla 7.3 Nombres populares en lengua tzeltal y tzotzil utilizados por los nativos de cada región en el estado de Chiapas para nombrar a *T. nelsonii*. (PROCOMITH, 1990)**

Municipios tzeltales	Nombre popular	Municipios tzotziles	Nombre popular
Amatenango	Pay te' Pay te' wamal	Chamula	Tzis chauk Yama chauk
Cancuc	Muk'ul majtas	San Andrés Larrazar	Tzis chauk
Chanal	Muk'ul majtas	Zinacantán	Tzis chauk tz'i'lel
Oxchuc	Majtas nichim Muk'ul majtas		
Tenejapa	Tusus wamal Muk'ui majtas		

## 7.2 REGISTRO ETNOBOTÁNICO

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (2002), más del 80% de la población mundial, especialmente en los países en desarrollo, utiliza tratamientos tradicionales a base de plantas para sus necesidades de atención primaria de salud. No obstante, en esos países ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales y además, su disponibilidad se ha visto reducida por la degradación de los ambientes naturales. En este contexto, la investigación etnobotánica puede ayudar a evitar la pérdida de dicho conocimiento y proteger, simultáneamente, la biodiversidad.

### 7.2.1 Descripción geográfica del área de estudio

La región de Los Altos se localiza en la parte central del estado de Chiapas, limita al norte con las regiones Norte y Selva. Tiene una extensión territorial de 3,770.35 Km<sup>2</sup>, que representa el 4.86% de la estatal (INEGI, 2011).



Pertenece a la Altiplanicie Central, su topografía es montañosa con valles. Las rocas predominantes son calizas que dan origen a grutas y dolinas, además de rocas de origen volcánico.

Los suelos son delgados y pedregosos y en la mayoría de los casos presentan pendientes considerables.

El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura promedio anual es de 14.8°C, con una precipitación promedio anual de 1,227 mm. La época fría presenta temperaturas de hasta -3°C con presencia de heladas.

La vegetación es de bosques de pino y encino, predominando uno sobre otro de acuerdo a la altitud (Orozco, 2002).

### 7.2.2 Estudio etnobotánico

Para la investigación etnobotánica sobre el conocimiento y uso de *Tagetes nelsonii* G., se entrevistó a una población total de 60 habitantes de la zona Altos del estado de Chiapas (Tabla 7.4), con edades entre 15 a 82 años de edad, de los cuales:

18 informantes son de San Cristóbal de las Casas, 9 de San Andrés Larrainzar, 9 de Yabteclum, 9 de San Juan Chamula, 8 de Aldama, y 7 de San Pedro Chenalhó (Figura 7.1)

Tabla 7.4. Distribución de la población en los municipios entrevistados de la región Altos del estado de Chiapas (INEGI, 2011)

Localidad	San Cristóbal de Las casas	San Andrés Larrainzar	Yabteclum	San Juan Chamula	Aldama	San Pedro Chenalhó
No. Habitantes	185,917	20,349	675	76,941	5,072	36,111

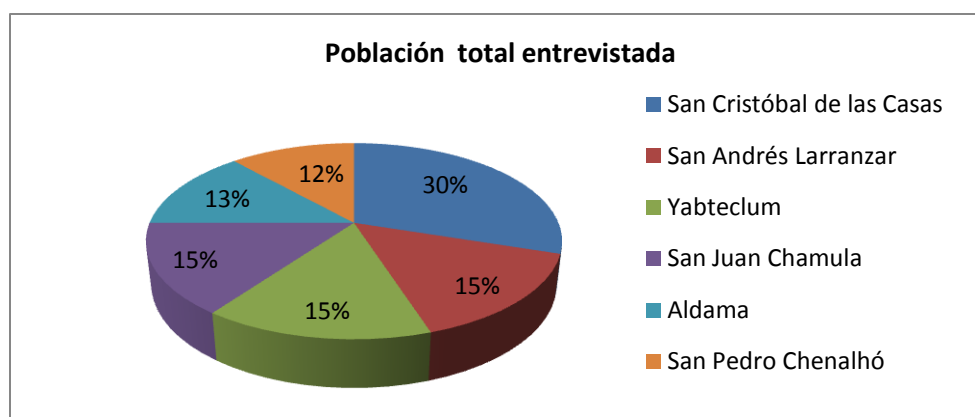


Figura 7.1 Población total entrevistada de la zona Altos del Estado de Chiapas.

Del total de la muestra, 31 son mujeres (51.66 %) y 29 hombres (48.33 %).

Las actividades laborales de los encuestados son variables (Figura 7.2), se encontró que todas las personas dedicadas al hogar son mujeres, la población de estudiantes se encontró más homogénea en cuanto al género, otros realizan distintos oficios como la agricultura, carpintería, albañilería así como elaboración y venta de artesanías, en su mayoría hombres. La cantidad de profesionistas encontradas para la entrevista fue la más baja con respecto a la población total (n=60).

Algunos médicos tradicionales son muy conocidos en su localidad por efectuar labores curativas exitosas, otros son poco conocidos y se dan a conocer a través de su participación en actividades religiosas; o bien, se involucran en programas de rescate y difusión de las prácticas curativas con plantas medicinales, como el que se realiza en el Museo de Medicina Maya en San Cristóbal de Las Casas.

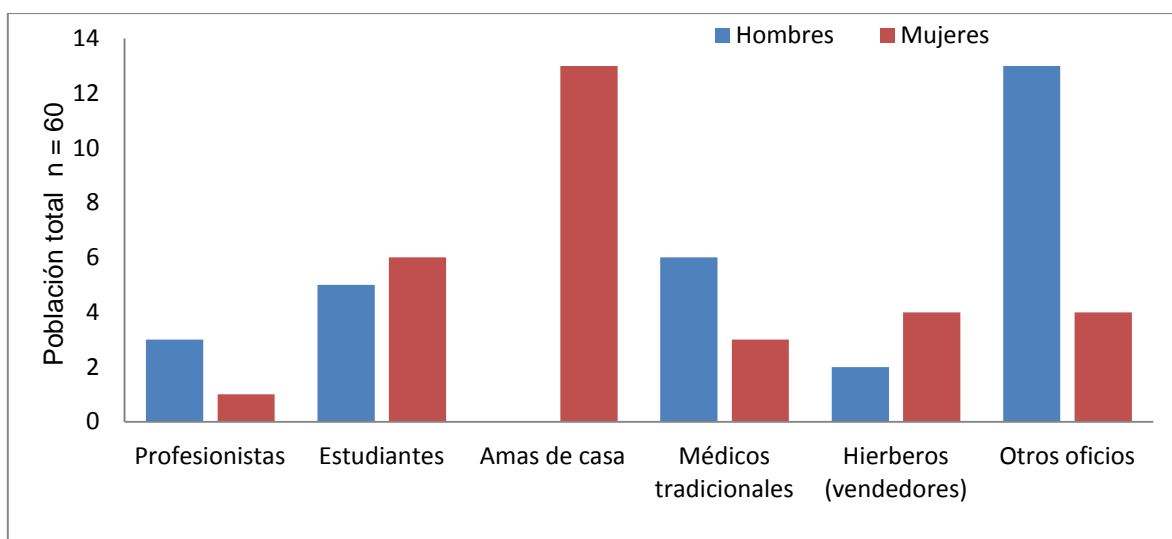


Figura 7.2 Actividades a las que se dedican los encuestados.

### 7.2.3 Reconocimiento de la planta

En cuanto al reconocimiento del ejemplar mostrado durante la entrevista, los resultados (Figura 7.3) demostraron que de la población total (n=60):

- El 68% reconoció un ejemplar de *Tagetes nelsonii* G. Así como su manejo y uso terapéutico, así también afirman de manera unánime que es fácilmente distinguible por el aroma característico que presenta la planta y las flores amarillas.
- El 27% desconoce la planta.
- El 3% reconoció el ejemplar, pero no saben exactamente de sus propiedades medicinales.
- El 2% confundió el ejemplar, con otra planta.

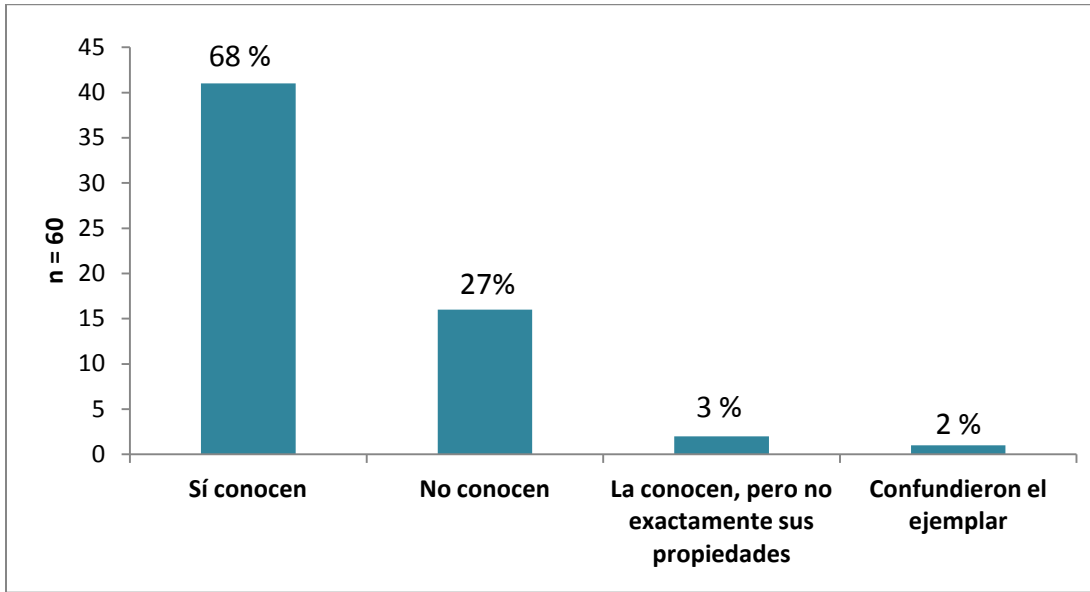


Figura 7.3 Resultados arrojados de la entrevista semiestructurada, realizada en las seis localidades del estado de Chiapas.

### 7.2.4 Obtención

En San Juan Chamula, San Andrés Larrainzar, San Pedro Chenalhó y Aldama consiguen la planta en los montes, veredas, milpas, laderas, terrenos y orillas de camino. Algunos de ellos ya la cultivan en los patios de sus casas.

La identifican principalmente por su olor característico, así también por sus hojas verdes oscuras y su tallo recto. Cuando está en periodo de floración por sus flores amarillas en racimos.

En San Cristóbal de Las Casas es posible conseguirla en los mercados donde está a la venta la planta fresca recién cortada o bien ejemplares en macetas (Figura 7.4).



Figura 7.4 Venta de *Tagetes nelsonii* G. en el mercado principal “José Castillo Tielmans”, ubicado en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez]. Archivo de autor.

## 7.2.5 Nombres populares

La población que reconoce el ejemplar de *Tagetes nelsonii* G. muestra una marcada diferencia en cuanto a su denominación, ya que en San Cristóbal de Las Casas es conocido popularmente con el nombre de *chilchahua*, *chilchagua*, *chijchahua* o *chichagua*, en San Pedro Chenalhó, Yabteclum y Aldama se le conoce a esta planta en lengua tzotzil como *tzis chauh* o *chix chauh*, y en San Juan Chamula se le conoce como *tzis chauh tz'i'lel*.

Estos nombres fueron escritos en referencia a los nombres publicados por PROCOMITH en 1990 de acuerdo a la pronunciación y gramática de la lengua tzeltal y tzotzil, debido a que la población entrevistada sólo sabe pronunciarla, pero no escribirla.

## 7.2.6 Uso medicinal

Los informantes aseguran que *Tagetes nelsonii* Greenm, es usado por la comunidad tzotzil, para el tratamiento contra la salmonelosis, parasitosis intestinal y enfermedades infecciosas gastrointestinales denominadas por la población como “dolor de estómago”, a su vez, afirman que se obtiene un efecto paliativo frente malestares tales como la diarrea, dolor de cabeza, escalofríos, fiebre, dolor de articulaciones y un mal conocido entre algunos tzotziles de mayor edad, con el nombre de “*chalam tzotz*” que lo describen como un calentamiento de la cabeza, seguida de fiebre, hinchazón en la cara y caída de cabello. Así también hay quienes afirman que controla la tos y el sangrado de nariz (Figura 7.5). Combinado con la planta “verbena”, es usado contra la disentería.

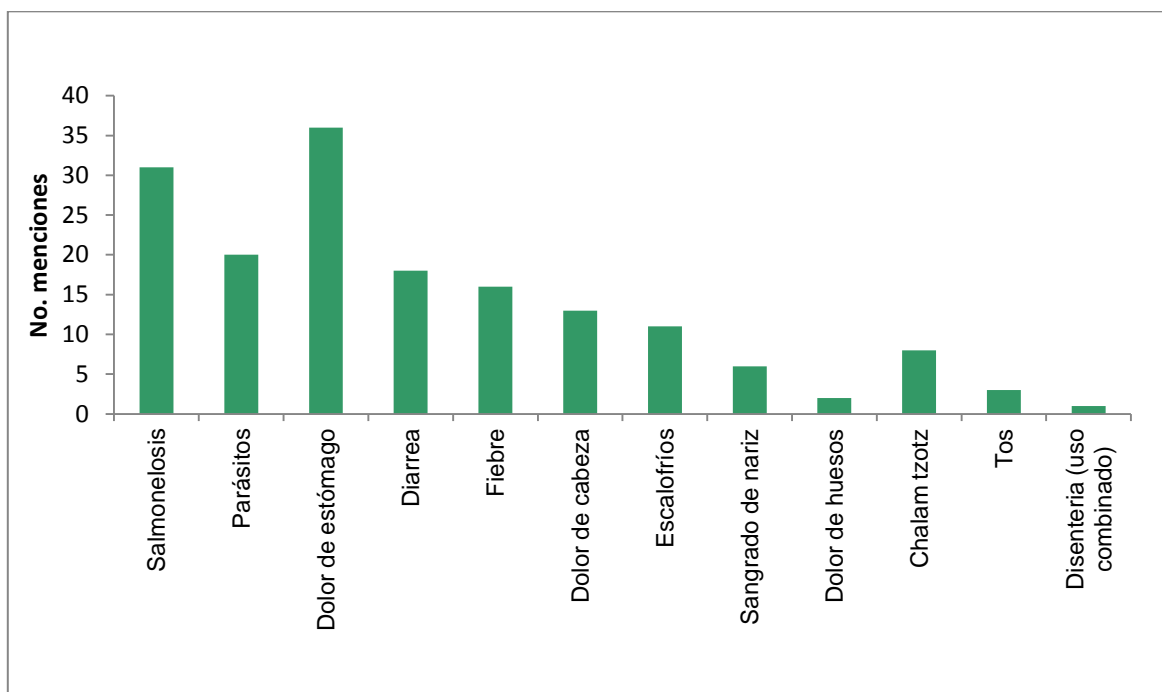


Figura 7.5 Uso medicinal de *Tagetes nelsonii* Greenm.

### 7.2.7 Partes utilizadas

El 54% de los informantes concuerdan que las propiedades medicinales de *Tagetes nelsonii* G. se encuentran en las hojas, y el 46%, (entre ellos los médicos tradicionales), utilizan toda la parte aérea de la planta, es decir, hojas, flores y tallo para un tratamiento efectivo. (Figura 7.6).

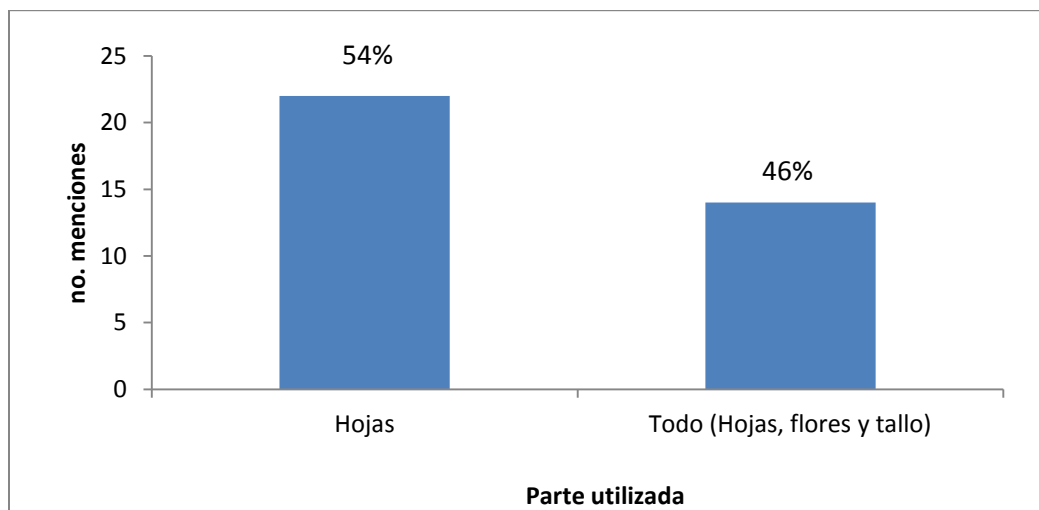


Figura 7.6 Partes de *Tagetes nelsonii* G. que usan como recurso medicinal

### 7.2.8 Modo de preparación y vía de administración

En este estudio se identificaron cuatro formas empleadas de preparación de *Tagetes nelsonii* medicinal (Figura 7.7):

- Machacado o machucado
- Licuado
- En té
- Gotas medicinales

El 28% de los informantes menciona la siguiente forma de preparación:

Es necesario recolectar un puñado de planta fresca (aproximadamente 50 g), enseguida colocarlas sobre un recipiente con agua potable y machucarlo con piedra, molcajete o frotado con las manos. El concentrado es bebido de dos a tres veces al día durante el periodo de enfermedad.

El 55% realiza el procedimiento anterior en una licuadora.

El 16% prepara una infusión del material vegetal como a continuación se presenta:

Se pone a fuego lento un poco de agua potable (1 taza aproximadamente.) y cuando esté a punto de hervor se agregan de 3 a 4 ramitas de la planta fresca, y se tapa. Se deja hervir de 3 a 5 minutos. Luego se entibia y se toman de dos a tres veces al día dependiendo del caso.

El 1 % realiza una extracción con una bebida alcohólica denominada *pox*<sup>1</sup>, a partir de ésta se realizan diluciones con agua y *pox* para la elaboración de las gotas medicinales.

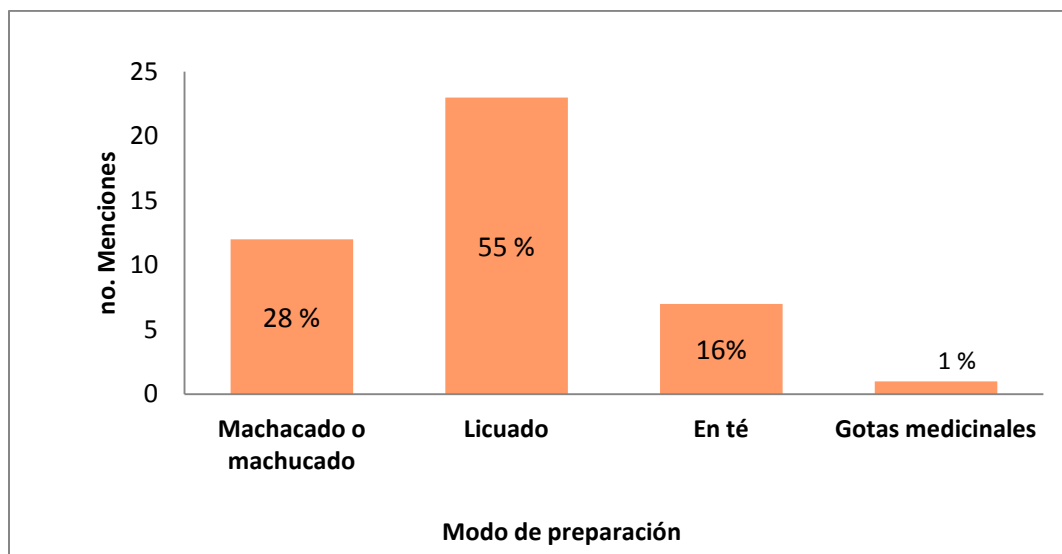


Figura 7.7 Modos de preparación de *Tagetes nelsonii* Greenm utilizados por los informantes de la zona de estudio.

La mayoría de los informantes coincide en que independientemente de la forma empleada para la preparación de *Tagetes nelsonii* G., es mejor utilizarla en fresco para obtener mejores resultados curativos, sin embargo, es posible usar la planta seca usando las mismas formas de preparación considerando que la efectividad es menor que en el consumo crudo.

De acuerdo al conocimiento popular, la administración de *Tagetes nelsonii* depende de los signos y síntomas del padecimiento (Tabla 7.5).

Para el tratamiento de la salmonelosis, parasitosis, dolor de estómago, diarrea, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y tos, es fundamental la administración del concentrado acuoso vía oral, de dos a tres veces al día dependiendo del malestar. O bien, consumir 20 gotas medicinales (extracto en *pox*) diluido en un vaso de agua; en ambos modos, no se recomienda en mujeres embarazadas y con respecto a las gotas medicinales no es recomendable en niños menores de 5 años.

Para el dolor de cabeza y de huesos, es necesario realizar una aplicación tópica del extracto acuoso de la planta, o bien realizar baños de cuerpo entero o locales con el mismo concentrado.

<sup>1</sup> El *pox* es un destilado de maíces criollos, o caña de azúcar y/o trigo. Sus orígenes se encuentran en la cultura Maya, era y sigue siendo usado por terapeutas tradicionales entre los tzeltales y tzotziles durante ritos y ceremonias religiosas.

En tzotzil y en tzeltal, la palabra *Pox* significa: 'medicina, curación'. *Pox* se refiere también a medicamentos. Así, la palabra *poxtaiwanej* es relativa al médico y *poxna* es la casa de las medicinas o farmacia. (Page Pliego) (s.f).

Tabla 7.5. Vía de administración de *T. nelsonii*, en los diferentes padecimientos del grupo de estudio.

Vía de administración de <i>Tagetes nelsonii</i> G.	Padecimientos	Modo
Oral	Salmonelosis, parasitosis, dolor de estómago, diarrea, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y tos.	Extracto acuoso o infusión
Tópico	Fiebre, dolor de cabeza y articulaciones.	Hojas machacadas en agua
Baños	Dolor de huesos	Concentrado de hojas machacadas en agua tibia.

### 7.2.9 El conocimiento popular

El conocimiento tradicional de la especie *T. nelsonii* ha sido muy diversa. Los resultados obtenidos muestran que el 56% de los informantes obtuvo la sabiduría directamente de sus abuelos y bisabuelos de manera oral y práctica, el 23% de sus padres y familiares cercanos, el 13% de personas locales (vecinos, compadres, médicos tradicionales, hierberos y personas ajenas a ellos), el 7% obtienen el saber al visitar otras localidades del mismo estado y el 1% lo adquirieron ellos mismos.

El 87% de los encuestados afirma que los efectos curativos de la chilchahua han sido comprobados en ellos mismos o en su propia familia y el 11% lo han observado y escuchado de personas fuera de su ámbito familiar. El 2% no recuerda que haya obtenido algún efecto en el uso de la planta.

### 7.2.10 El rescate de la medicina tradicional

La investigación de campo realizada, denota que el conocimiento medicinal de la planta proviene de personas mayores, generalmente adultos en plenitud. Ellos enfatizan su preocupación al notar el desinterés de los jóvenes por el conocimiento de la curación ancestral a través de plantas y por no preservarlo, encontrándose en riesgo de desaparecer.

Actualmente existen instituciones y ONG'S en San Cristóbal de las Casas que se encargan de promover el uso y reconocimiento de plantas medicinales como medio alternativo de prevención y curación de enfermedades. Entre las que se encuentra la Organización para la Defensa de la Medicina Indígena Tradicional de Chiapas A.C. (ODEMITCH), que imparte talleres teóricos y prácticos sobre herbolaria medicinal y pone a la venta sus productos. También se encuentra el Museo de Medicina Maya que forma parte del Centro de Desarrollo de la Medicina Maya (CEDEMM), encargada de la difusión de las prácticas curativas tzotzil-tzeltal en el estado, forma parte de una diversidad de ambientes

museográficos que recrean los usos de esta medicina tradicional, además de la práctica y recursos terapéuticos utilizados por los médicos tradicionales, a su vez cuenta con un número importante de plantas medicinales y un huerto demostrativo. En 1998 fue acreedor del Premio Nacional de Museografía Miguel Covarrubias, por parte del Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH).

### 7.3 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DEL MATERIAL VEGETAL

La identificación botánica fue realizada en el Herbario IZTA, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM (Anexo 11.6), cuyo resultado se muestra en la tabla 7.6.

Tabla 7.6 Identificación taxonómica de un ejemplar de chilchahua, obtenida en el estado de Chiapas

Nombre popular del material vegetal	Nombre científico	Familia	No. de registro
Chilchahua	<i>Tagetes nelsonii</i> Greenm.	ASTERACEAE	2411

### 7.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Se realizó el análisis fitoquímico cualitativo para identificar los principales metabolitos secundarios presente en la parte aérea de la planta (Tabla 7.8).

Este estudio preliminar aporta datos sobre la composición química de *Tagetes nelsonii* G.

Para el extracto se utilizaron tres disolventes de menor a mayor polaridad (Tabla 7.7)

Tabla 7.7. Extractos utilizados para la realización del tamizaje fitoquímico.

Disolvente	Polaridad
Hexano	No polar
Acetato de etilo	Polaridad intermedia
Etanol-agua (50:50)	Polar



Tabla 7.8. Resultados del tamizaje fitoquímico de *Tagetes nelsonii* G.

Metabolitos	Prueba	Extracto Hexano	Extracto Acetato de etilo	Extracto Etanol-agua (50:50)
Alcaloides	Dragendorff	-	+	-
Alcaloides	Hager	NR	-	NR
Alcaloides	Ac. Silicotúngstico	+	NR	NR
Aceites esenciales	Sudan	+	NR	NR
Aminas	Ninhidrina	NR	-	NR
Azúcares reductores	Felhing	NR	-	-
Cumarinas/Comp. Lactónicos	Baljet	-	-	+
Fenoles	FeCl <sub>3</sub>	-	+	+++
Flavonoides	Shinoda	NR	++	++
Flavonoides	Reacción NaNO <sub>2</sub> -Al (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -NaOH	-	NR	++
Glicósidos Cardiotónicos	Kedde	NR	NR	+
Quinonas	Börntrager	+	Resíduo: + Fase orgánica: -	NR
Saponinas	Espuma	NR	++	+++
Saponinas	Rosenthaler	NR	+	NR
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman-Burchard	+	++	NR
<b>Simbología: +++ : Abundante ++ : Moderado + : Escaso ± : Dudoso - : Negativo NR: No realizado</b>				

En la tabla 7.9, se encuentran los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico.

La polaridad del extracto influye mucho en el tipo de metabolitos encontrados. Así pues, en el extracto hexánico se identificaron alcaloides, aceites esenciales, quinonas y triterpenos debido a que estos metabolitos tienen la característica común de ser solubles en disolventes no polares.

En el extracto con acetato de etilo, fue posible encontrar en cantidades moderadas saponinas y triterpenos, así como alcaloides, flavonoides, fenoles y quinonas.

Al aumentar la polaridad del disolvente se tiene una solubilidad parcial de metabolitos más polares, de este modo las saponinas de tipo heterósido se solubilizan mejor en disolventes polares y las saponinas son más solubles en disolventes orgánicos no polares.

Finalmente en el extracto realizado con etanol-agua (50:50), se observa la presencia de fenoles simples y saponinas en abundancia que se destacan por ser solubles en mezclas hidroalcohólicas. También se encontraron flavonoides y en menor cantidad cumarinas y glicósidos cardiotónicos

**Tabla 7.9. Metabolitos secundarios identificados en *Tagetes nelsonii* G.**

Extracto	Identificación cualitativa		
	Abundante (+++)	Moderado (++)	Escaso (+)
Hexano			Alcaloides Aceites esenciales Quinonas Triterpenos
Acetato de etilo		Saponinas Triterpenos Flavonoides	Alcaloides Flavonoides Fenoles Quinonas
Etanol-agua (50:50)	Fenoles Saponinas	Flavonoides	Cumarinas Glicósidos cardiotónicos

La información química y farmacológica de la chilchahua es escasa y dado que el objetivo de este proyecto está centrado en los compuestos fenólicos, se llevó a cabo un ensayo químico preliminar de compuestos fenólicos en tres partes de la planta: hojas, flores y tallos (Tabla 7.10).

**Tabla 7.10 Pruebas preliminares de identificación de compuestos fenólicos en las hojas, flores y tallos de *Tagetes nelsonii* G.**

Prueba de identificación	Metabolitos	Extracto etanólico		
		Hojas	Flores	Tallo
FeCl <sub>3</sub>	Fenoles	+++	+++	+++
Shinoda	Flavonoides	++	+	+
NaNO <sub>2</sub> -Al (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -NaOH	Flavonoides	+++	+++	++
<i>Simbología:</i> +++: Abundante ++: Moderado +: Escaso -: Negativo				

Los resultados indican que en las tres partes de la planta se encuentran los compuestos fenólicos, siendo en las hojas más abundante; no obstante también resulta significativa la presencia de estos metabolitos en las flores y tallos. (Tabla 7.10). Por ello, se trabajó conjuntamente la parte aérea de la planta.

## 7.5 MOLIENDA

En la tabla 7.11 se observa que existe una mayor retención de muestra A en la malla número 60, la muestra B es retenida en mayor cantidad en la malla número 40. Por consiguiente, se seleccionaron estos dos tamaños de malla como variables para la realización del diseño experimental.

**7.11 Determinación del número de malla óptima para la extracción de polifenoles en la chilchahua de la muestra A y B.**

No. Malla	Peso de malla (g)	Muestra A (g)		Muestra B (g)	
		Malla + muestra (g)	Cantidad retenida (g)	Malla + muestra (g)	Cantidad retenida (g)
40	346.86	347.14	0.86	347.80	1.52
60	379.21	280.35	1.14	279.71	0.5
80	346.95	347.01	0.06	347.03	0.08
100	356.85	356.85	≈ 0	356.85	≈ 0
120	336.61	336.61	≈ 0	336.61	≈ 0
Base	344.56	344.56	≈ 0	344.56	≈ 0

La tabla 7.12, señala que existe mayor humedad en la muestra A con un tiempo de molienda de 1 min. En la muestra B la humedad es menor, debido a que hubo más pérdida de agua con un tiempo de molienda de 3 min.

**7.12 Porcentaje de humedad de las muestras molidas de chilchahua (*Tagetes nelsonii* G.)**

Muestra	Tiempo de molienda	Cantidad ( $\bar{X}$ )	% Humedad
A	1 minuto	0.519 g	8.09 ± 0.042
B	3 minutos	0.513 g	7.62 ± 0.098

## 7.6 SELECCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS POLIFENOLES

Para realizar este análisis, se comparan los electroferogramas de los experimentos 03, 05, 06, y 08, que corresponden al extracto hidroalcohólico con etanol al 30 %.

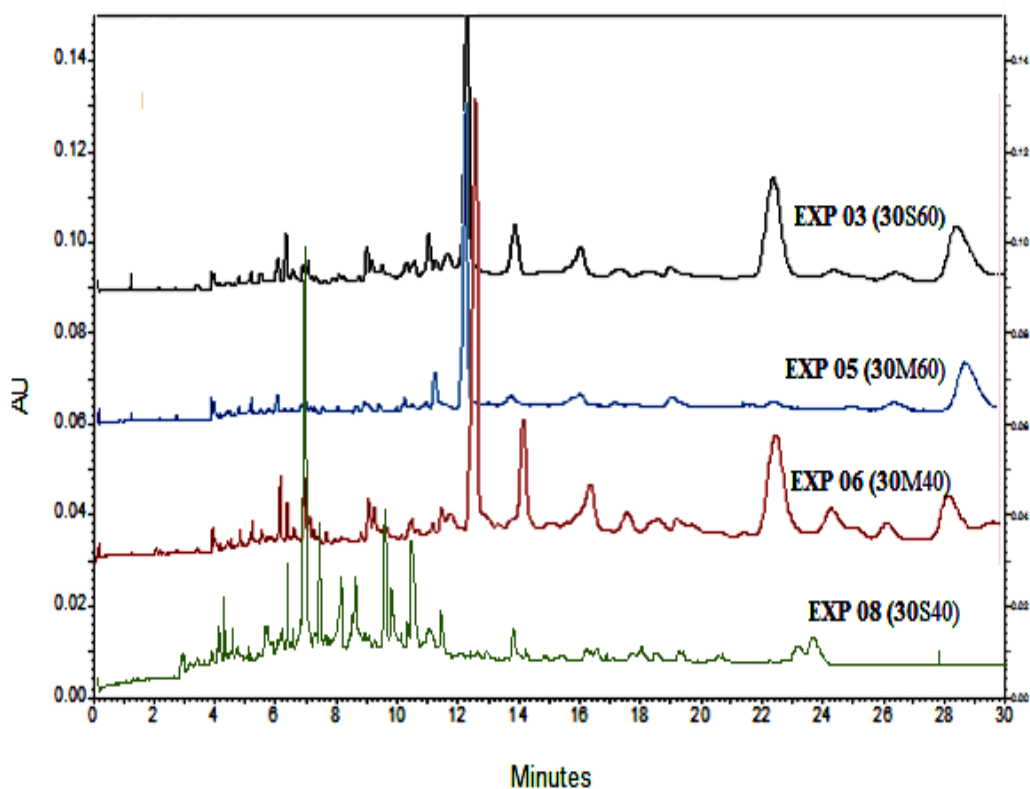


Figura 7.8 Electroferogramas de los mejores métodos de extracción de polifenoles

La figura 7.8, primeramente, se compararon los experimentos 03 y 05, ambos, han sido extraídos con la misma proporción de disolvente y tamaño de malla 60. En el experimento 03 (sonicado) se observan más picos de extracción de polifenoles que en el experimento 05 (macerado), donde la extracción fue casi nula.

En los experimentos 06 y 08 se observa un mayor número de picos (que en los experimentos anteriores). Cabe mencionar que en ambos casos se ha utilizado la malla número 40 donde el material vegetal tiene un promedio de tamaño de partícula mayor que en los experimentos anteriores. El experimento 06 extrae pocos fenoles grandes (tipo flavona) que eluyen a bajos tiempos, mientras que se observan más señales a tiempos altos donde eluyen los polifenoles pequeños que son más polares y por ende extraídos de una forma más eficiente cuando la proporción de agua es mayor.

El experimento 08, extrae mejor a los componentes polifenólicos de mayor tamaño, pero la extracción de componentes más pequeños es casi nula.

Por otro lado, en la figura 7.9, donde se muestran los electroferogramas del experimento 02 (sonicado) y el experimento 04 (macerado) ambos de composición etanólica al 70 % y malla 60, demuestran que tienen formas y número de picos similares, aunque en la extracción con el método macerado, los picos tienen una mayor altura.

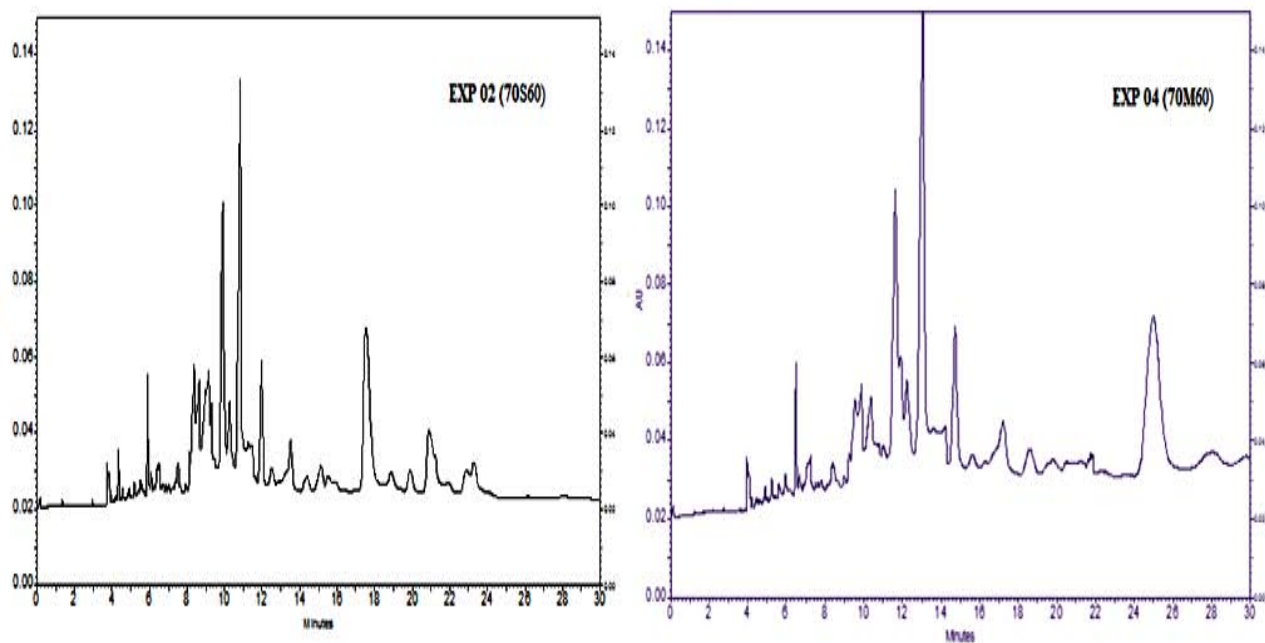


Figura 7.9 Electroferogramas de los extractos hidroalcohólicos 70%, malla 60, por sonicación (Izquierda) y maceración (derecha).

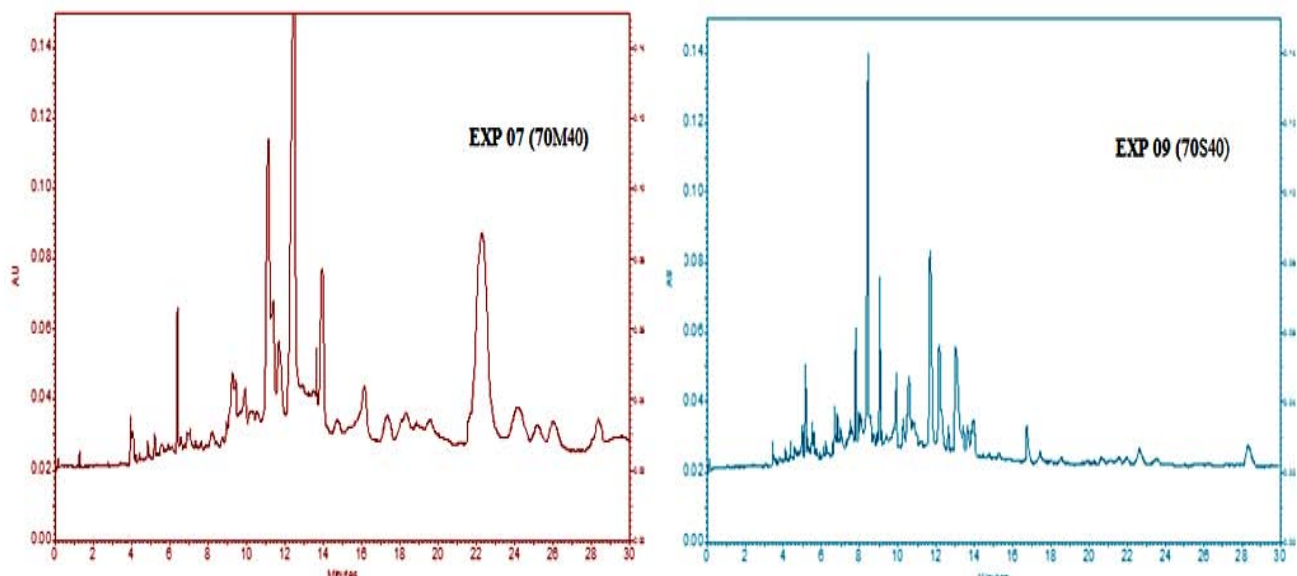


Figura 7.10 Electroferogramas de los extractos hidroalcohólicos 70%, malla 40, por maceración (Izquierda), y sonicación (derecha)

En la figura 7.10, el experimento 09, muestra un grupo de picos adicionales entre el minuto 11 y 14 que no aparecen en el experimento 07 y aunque el pico del minuto 22 del experimento 07 es mucho más alto, se observa también en el experimento 9 es más pequeña, pero sin problemas para su integración.

En general al usar el método de macerado, se obtienen picos más altos, pero teniendo que ocupar mayor tiempo en el pre tratamiento de la muestra (12 h.).

Comparando los experimentos 02 y 09, los polifenoles más pequeños (más polares) sí se extraen cuando el tamaño de partícula es más pequeño (malla 60).

Por lo tanto, se puede decir que el mejor método de extracción se encuentran entre los experimentos 07 y 09, porque el proceso de macerado (07) extrae mejor los polifenoles de tamaño pequeño (más polares) que eluyen a bajos tiempos, mientras que con el método del sonicado (experimento 09) se logran extraer de forma más eficiente los polifenoles de estructura más grandes, observados en los picos que se obtienen entre 4 y 14 minutos.

La influencia de la composición etanólica es evidente al observar que los picos obtenidos de los electroferogramas de los experimentos 03, 05, 06 y 08 (todas de composición etanólica al 30%) son significativamente más bajas que de los electroferogramas 02, 04, 07 y 09 (composición etanólica al 70%).

A su vez, el tamaño de partícula influye en el número de picos emitidos, puesto que en la malla no. 60 se obtienen menos picos que en la malla no 40, analizados en los electroferogramas 02, 04, 07 y 09.

El tipo de extracción resultó ser conveniente, tanto en el modo macerado como en el modo asistido por sonicación. Sin embargo como ya se ha mencionado la maceración extrae mejor los compuestos fenólicos más pequeños y el modo sonicado extrae favorablemente a los compuestos polifenólicos más grandes, además de tener un mayor ahorro en el tiempo de extracción, ya que sólo se requirió de 90 minutos.

Sin embargo, elegir el método de extracción más adecuado dependerá de los picos de interés.

En este trabajo, se busca un método que proporcione una mejor extracción en el menor tiempo posible, obteniendo un mayor número de señales analíticas que permitan poder identificar los compuestos presentes, por ello se seleccionó el experimento 09 (etanol al 70%, sonicado y malla 40).

### **7.6.1 Perfil electroforético**

Una vez elegidas las condiciones óptimas de extracción de polifenoles para este trabajo, se procedió a realizar repeticiones del mismo, para comprobar que el perfil obtenido fuera repetible y posteriormente llevar a cabo una identificación confiable.

Inicialmente se hicieron repeticiones en el mismo día, observando que el perfil fue completamente repetible (Figura 7.11) al obtener el mismo patrón de picos en el electroferograma.

Posteriormente se analizó el extracto optimizado en días consecutivos (Figura 7.12) y se observó que el perfil presenta una mayor variación en los tiempos de migración, esto debido a que el extracto se preparaba de nuevo y cambiaba con el día por lo que el cambio en la viscosidad de la muestra se vio reflejada en el desplazamiento de los picos en los electroferogramas. En estos casos y si en un futuro se realizara la cuantificación, se recomienda la utilización de un estándar interno que elimina este efecto.

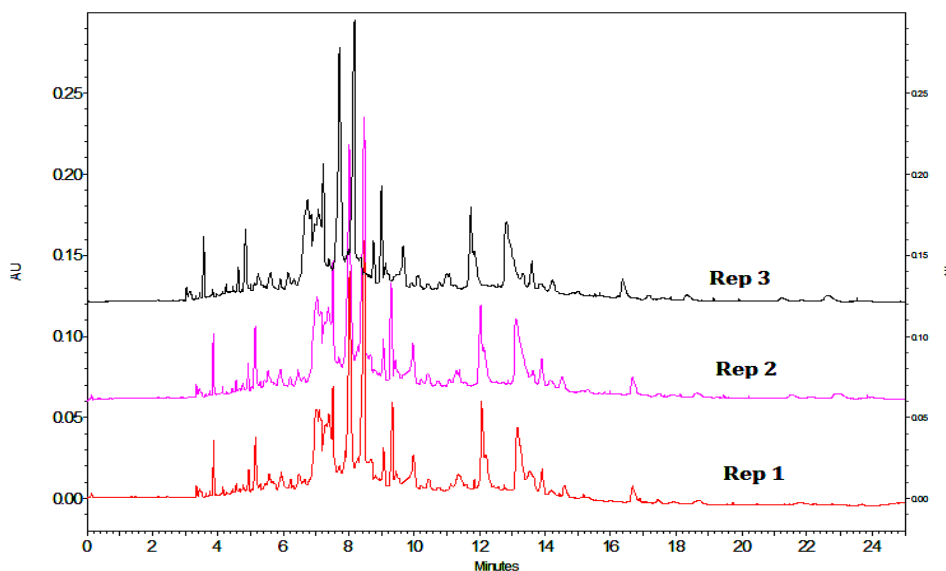


Figura 7.11 Perfil electroforético de la chilchahua repetido el mismo día.

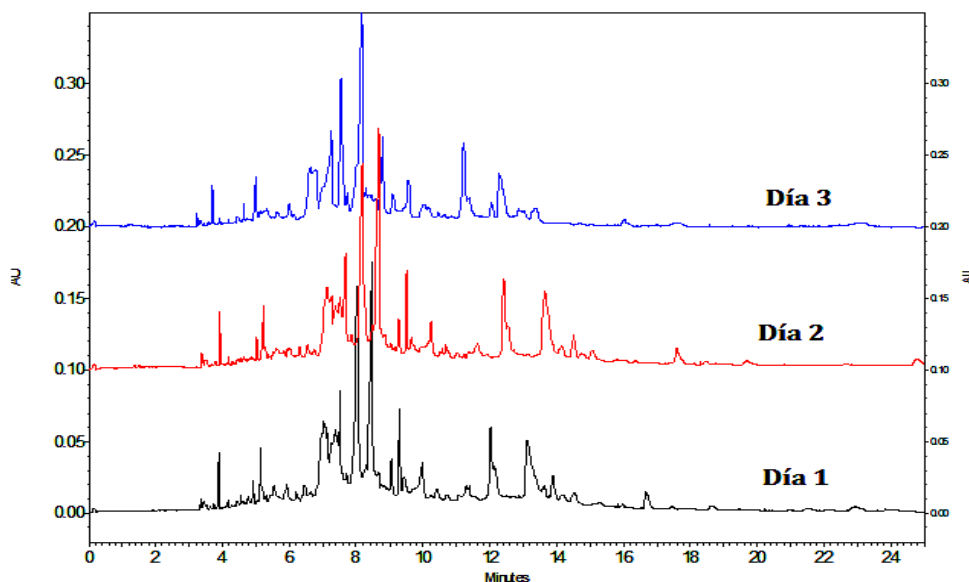


Figura 7.12 Perfil electroforético de la chilchahua repetido en diferentes días.

## 7.6.2 Selectividad del método

En la técnica de electroforesis capilar, la diferencia de movilidades de los solutos iónicos, harán que los analitos migren a través del capilar y lleguen al detector a diferentes tiempos. Este método es muy selectivo y la separación de los componentes se realiza a altas resoluciones. Por ello, la comprobación de ausencia de interferencias se lleva a cabo con el detector de arreglo de diodos (DAD); es decir, evalúa si la señal analítica obtenida corresponde a uno o más compuestos y además los compara con los correspondientes espectros de absorción UV-Vis, comprobando así la selectividad y separación en alta resolución.

## 7.7 IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA PLANTA CHILCHAHUA (*Tagetes nelsonii* G.)

La identificación de cada compuesto fenólico se efectuó adicionando al extracto (“optimizado”) un estándar que permitió observar el crecimiento del pico y por ende la identidad del compuesto polifenólico seleccionado.

Los compuestos fenólicos identificados se muestran en la figura 7.13.

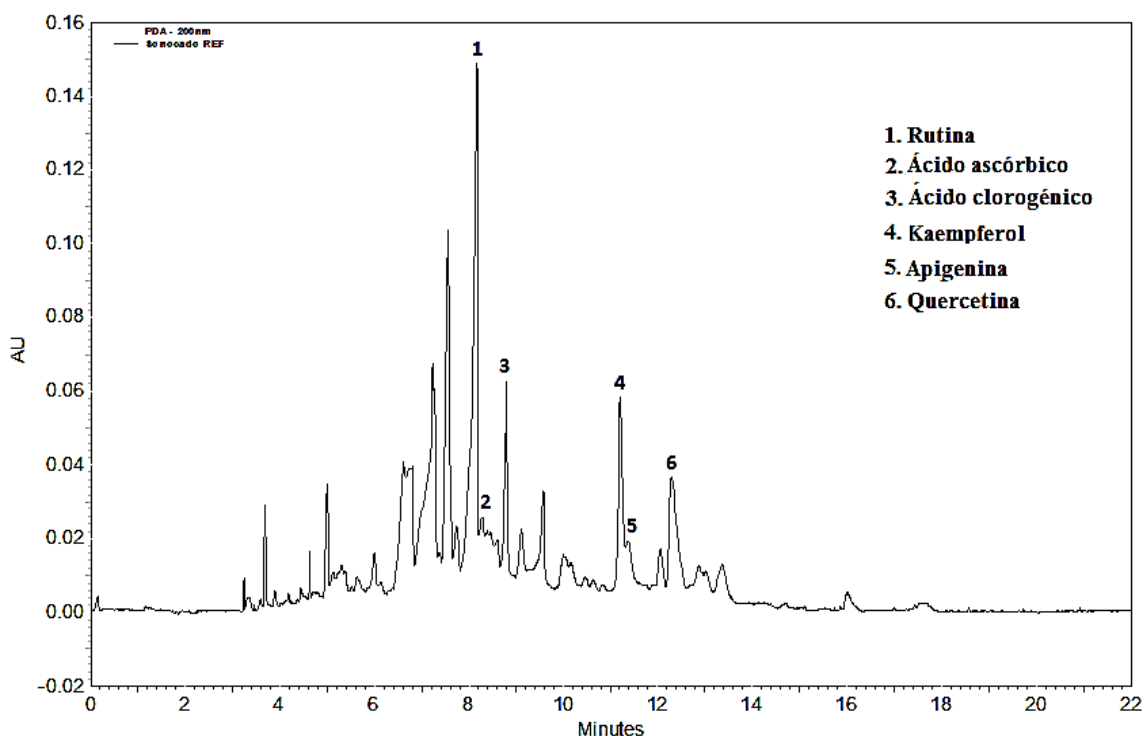


Figura 7.13 Compuestos fenólicos identificados en el extracto de la planta chilchahua (*Tagetes nelsonii* G.).



La comparación de los espectros correspondientes del pico obtenido y la del estándar se logra gracias a que el equipo de EC permite posicionarse en el pico del electroferograma y a través de una ventana emergente de la pantalla, muestra el espectro de absorción (Figura 7.14). De esta forma se identifica el compuesto fenólico, que junto con la información de los tiempos de migración proporcionan información objetiva.

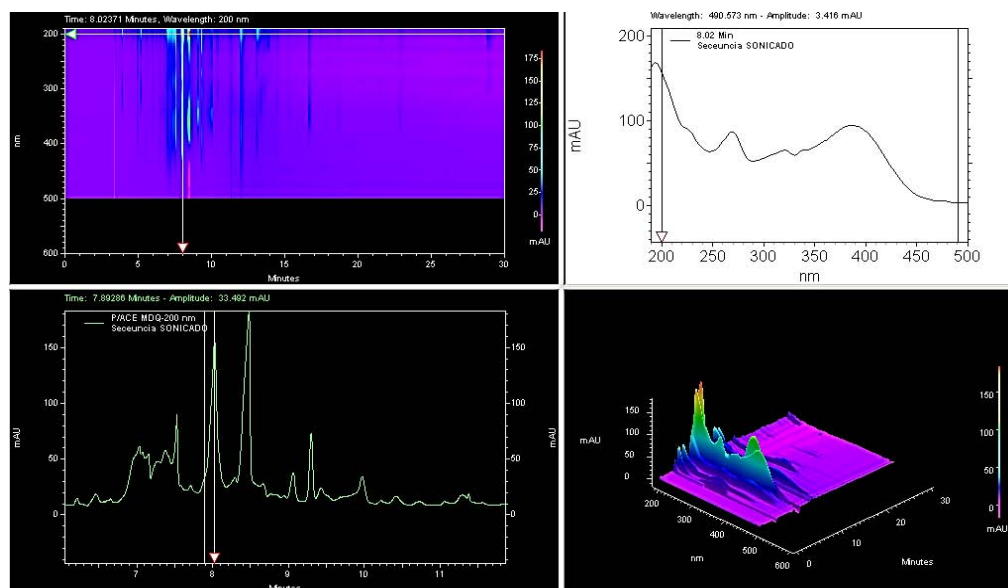


Figura 7.14 Ejemplo del espectro de absorción obtenido mediante el detector de arreglo de diodos (DAD).

La tabla 7.13 muestra los tiempos de migración obtenidos para cada uno de los compuestos fenólicos identificados.

En esta tabla se observa que no hay una gran diferencia entre los tiempos obtenidos para el estándar de referencia y los correspondientes a la muestra.

Tabla 7.13 Tiempos de migración de los compuestos presentes en la planta con respecto al estándar.

Compuesto identificado	Tiempo de migración $\bar{X}$ (min)	
	Muestra	Estándar
Rutina	7.28	6.88
Ac. clorogénico	8.79	8.90
Ac. ascórbico	7.88	7.78
Apigenina	10.01	9.96
Kaempferol	11.21	11.07
Quercetina	11.28	11.7

Durante el desarrollo de este proyecto se trabajó con un total de 14 estándares de referencia y solo 6 coincidieron plenamente con las señales obtenidas de la muestra vegetal de chilchahua. (Anexo 11.2M).

## **7.8 ANÁLISIS FLUORIMÉTRICO**

### **7.8.1 Elección del pico de emisión máximo para la cuantificación de flavonoides totales por fluorimetría**

Dado que el método de fluorescencia ofrece una mayor sensibilidad y selectividad, el primer paso para el desarrollo de la metodología de fluorescencia consistió en obtener el espectro de emisión del complejo formado por la quercetina con el terbio. La figura 7.15 exhibe los espectros de emisión de la quercetina, el complejo terbio-quercetina y el terbio 0.01M. Puede observarse que el espectro de la quercetina no es visible a una longitud de onda fija de excitación de 318 nm, el terbio 0.01 M. presenta un patrón espectral con tres picos máximos de emisión: 491 nm, 546 nm y 639 nm, mismos que se ven intensificados con la formación del complejo terbio-quercetina (2.033 ppm), aumentando la fluorescencia y por lo tanto muy sensible a la cuantificación de flavonoides totales.

En la figura 7.16 se distingue que la longitud de onda de mayor intensidad para el complejo Tb-quercetina se encuentra en 639 nm, no obstante ésta no fue seleccionada debido a que al obtener los espectros a diferentes concentraciones (0 a 2.033 ppm), no se obtuvo una longitud de onda máxima proporcional al aumento de la concentración y al realizar la curva de calibración no mostraba linealidad ni se ajustaba a algún modelo matemático en específico, pese a las repeticiones realizadas por el comportamiento caótico.

En consecuencia, la elección de la longitud de onda óptima, se efectuó a partir del estudio de los picos máximos subsecuentes (491 nm y 546 nm), realizando curvas de calibración respectivamente y observando que mantuviera la misma tendencia y linealidad entre cada repetición; estos resultados se muestran en la figura 7.17, se aprecia que a 639 nm, los puntos son caóticos y su correlación lineal es de 0.3139 por lo que se descarta para el análisis cuantitativo, a 491 nm se observa mayor linealidad con una correlación de 0.9839, empero, a 546 nm la correlación lineal es de 0.9911, demostrando que es la mejor opción para cuantificar y expresar fenoles totales en términos de EQ.

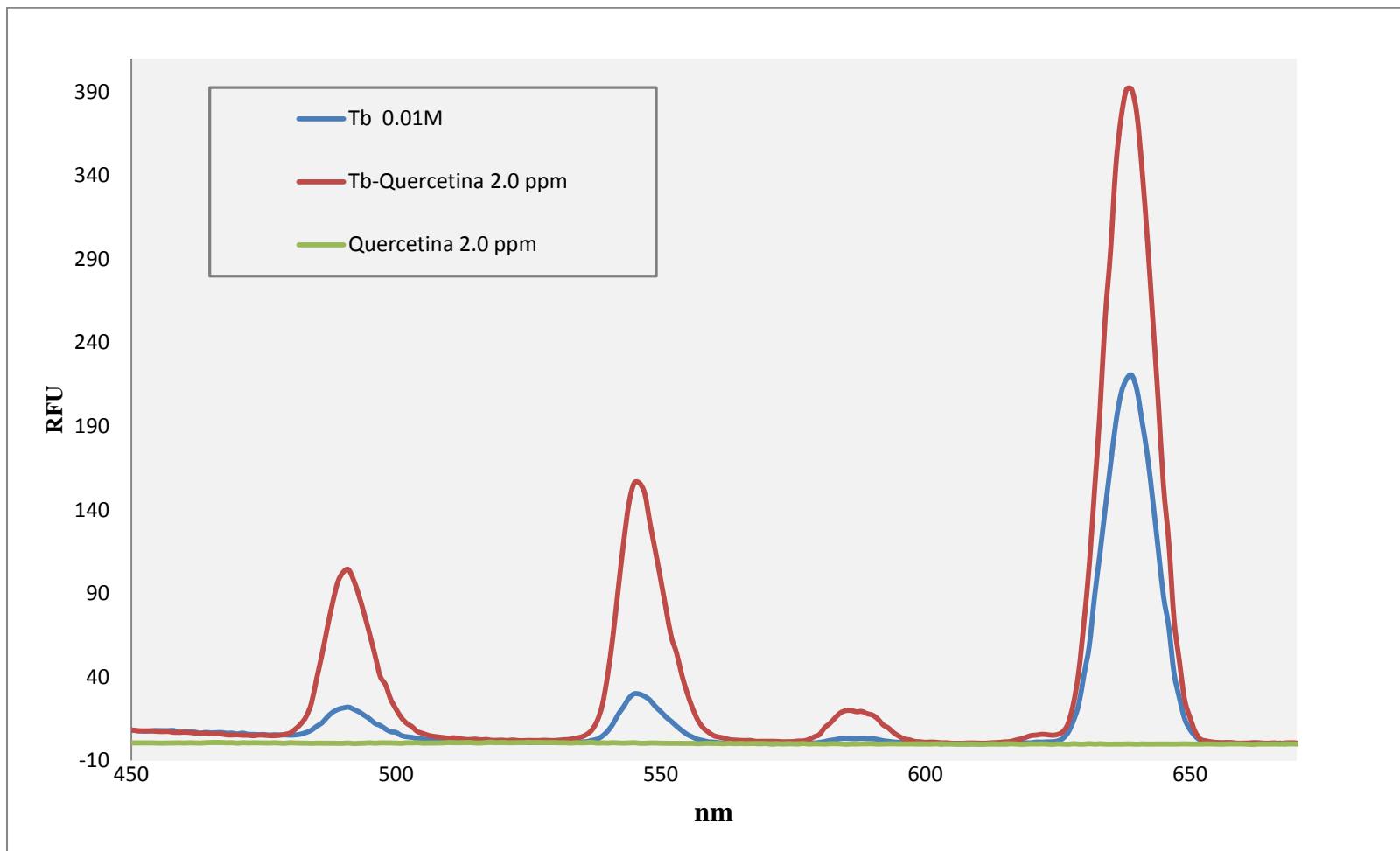


Figura 7.15 Espectros de emisión de la quercetina 2.0 ppm, terbio 0.01M y del complejo Tb-Quercetina 2.0 ppm. (Excitación fija: 318 nm.)

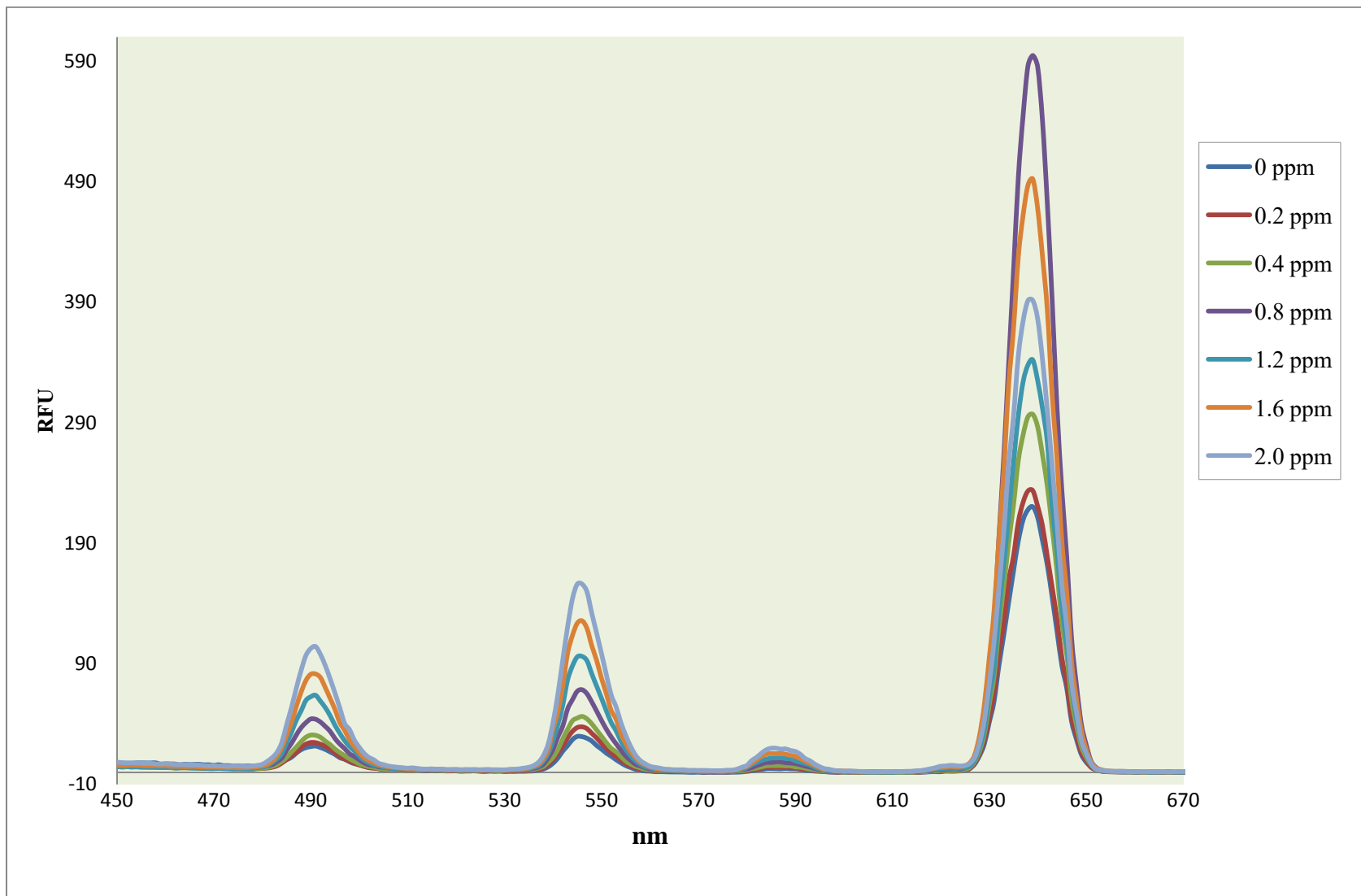


Figura 7.16 Espectros de emisión del complejo Terbio-quercetina a distintas concentraciones de trabajo. (Excitación fija: 318 nm.)

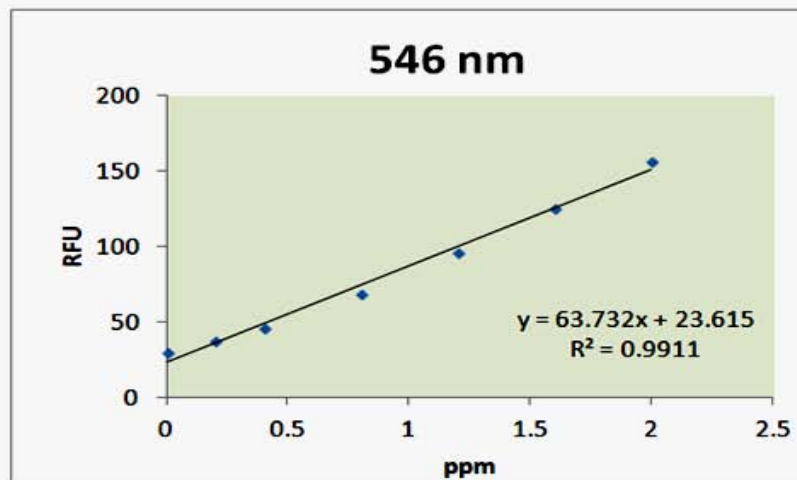
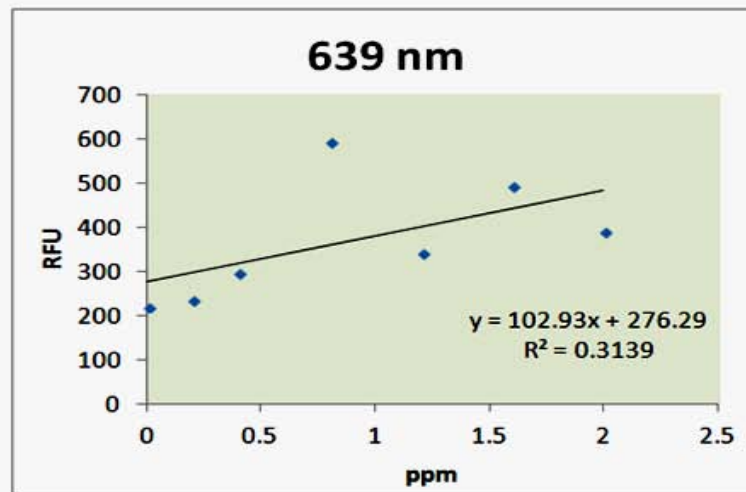
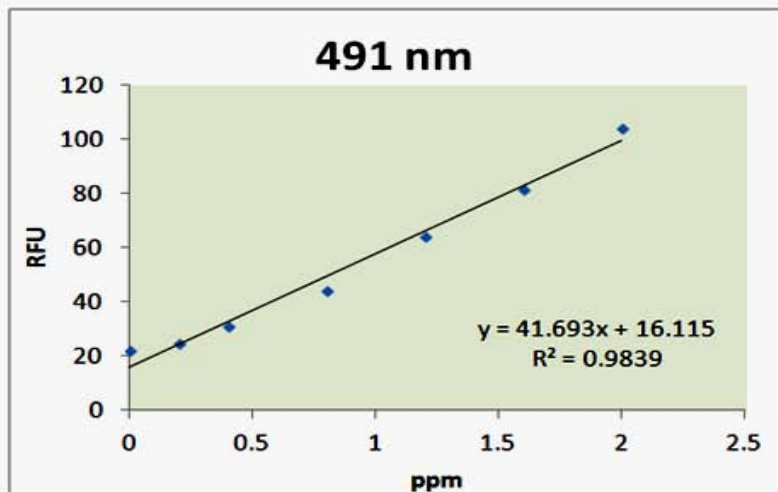


Figura 7.17 Curvas de calibración del complejo Tb-Quercetina a diferentes longitudes de onda máxima.

## 7.8.2 Cuantificación de flavonoides totales

La tabla 7.14 presenta la cuantificación de fenoles totales contenido en la muestra de chilchahua (*Tagetes nelsonii* G.) en mg EQ/g.

**Tabla 7.14 Concentración de flavonoides totales expresados en mg de quercetina sobre 1 g de planta.**

Extracto de Chilchahua	Repeticiones	RFU*	Flavonoides totales mg EQ**/ 1.0 g de planta
	1	66.140	386.28
2	66.222	387.01	
3	66.129	386.19	
	$\bar{x}$	<b>386.49</b>	
	D E	0.449	
	%DER	0.116	

\* RFU: Unidades relativas de fluorescencia (*por sus siglas en inglés*)

\*\*EQ: Equivalentes de quercetina

La cuantificación de flavonoides totales en la muestra de chilchahua (*Tagetes nelsonii* G.) fue de  $386.49 \pm 0.449$  mg/g de planta (Anexo 11.3).

Esta concentración fue comparada con la cantidad de flavonoides totales determinadas para otras plantas del mismo género (*Tagetes zipaquirensis*, *Tagetes sp* y *Tagetes multiflora*), observando que se reporta elevadas concentraciones de flavonoides, en el caso de *Tagetes multiflora*, 220 mg/g y *Tagetes spp.*, 347 mg/g. esta última ligeramente debajo de la determinación realizada de *Tagetes nelsonii* G. con 386.49 mg/g (Tabla 7.15).

**Tabla 7.15 Contenido de flavonoides totales presentes en algunas especies del género Tagetes.**

Vegetal	Contenido de flavonoides totales mg/g	Referencia
<i>Tagetes zipaquirensis</i>	96.2	(Solorzano, 2014)
<i>Tagetes multiflora</i>	220	
<i>Tagetes spp.</i>	347	
<i>Tagetes nelsonii</i> G	386.49	Obtenido

Posteriormente se realizó la comparación del resultado obtenido con valores reportados de flavonoides totales en diferentes especies vegetales con el fin de estimar el valor antioxidante de *Tagetes nelsonii* G.

Cabe mencionar que estas comparaciones son de distintos métodos de determinación de flavonoides, porque no existen más referencias acerca de determinaciones basadas en el método de fluorescencia (Tb-flavonoide sensibilizado).

En la tabla 7.16, se muestra en contenido de flavonoides totales, observando que la chilchahua (*Tagetes nelsonii* G.), destaca en cantidad de flavonoides (386.49 mg/g), comparado con otras plantas y se encuentra tan sólo por debajo de la piel de rambután (*Nephelium lappaceum*).

**Tabla 7.16 Contenido de flavonoides totales presentes en distintas especies vegetales.**

<b>Vegetal</b>	<b>Cantidad de flavonoides totales mg/g</b>	<b>Referencia</b>
Té verde <b>(<i>Camellia sinesis</i>)</b>	78.0	(Barukcic & Sola, 2015)
Calabaza rayada <b>(<i>Curcubita mixta Pangalo</i>)</b>	96.63	(Valenzuela, Cravzov, Soro, Taguinas, & Gruszycski, 2014)
Acaena <b>(<i>Acaena ovalifolia</i>)</b>	142.0	(Torres, 2015)
Arrayán negro <b>(<i>Mirciantes raphaloides</i>)</b>	155.0	(Torres, 2015)
Flor de manita <b>(<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>)</b>	164.17	(García, 2012)
Gingeng <b>(<i>Ginko Biloba</i>)</b>	240	(Shunjing & Ed, 2009)
Piel de rambután <b>(<i>Nephelium lappaceum</i>)</b>	542.2	(Thitilertdecha, Teerawutgulrag, & Rakariyatham, 2008)

## 7.9 ESTUDIO CINÉTICO DEL COMPLEJO TERBIO-QUERCETINA

Se llevó a cabo la cinética del complejo terbio-quercetina estándar (Figura 7.18) y terbio-flavonoide en la muestra vegetal (Figura 7.19), con el fin de encontrar el tiempo óptimo de formación y así obtener una mejor cuantificación de flavonoides totales.

En la figura 7.18, se observa que en  $t = 0$  min comienza la formación del complejo terbio-quercetina estándar, aumentando hasta el valor máximo de RFU en  $t=139$  min; éste tiempo

es idóneo para llevar a cabo la determinación cuantitativa de flavonoides totales, ya que se obtiene una formación máxima del complejo.

Posteriormente se distingue un decaimiento gradual en la intensidad de RFU, llegando a mantenerse casi constante a partir de  $t=448$  min.

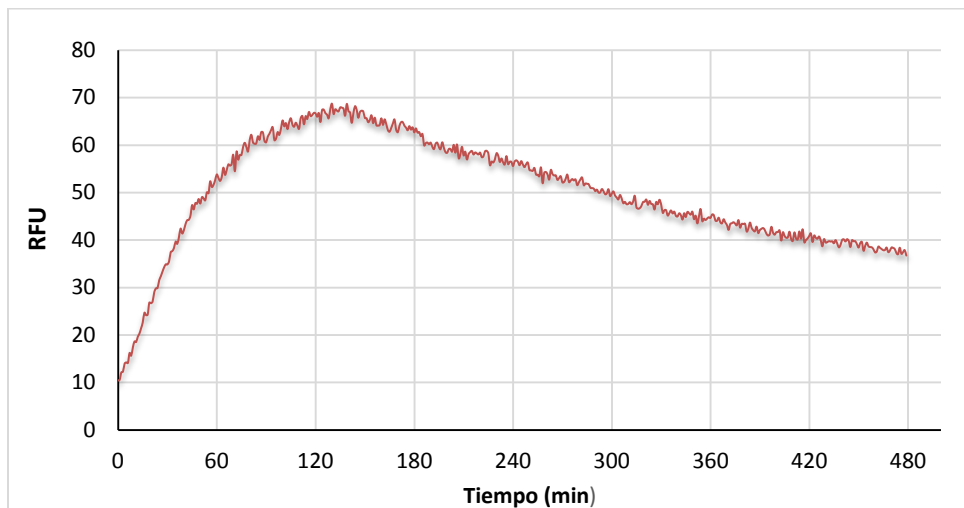


Figura 7.18 Cinética de formación y degradación del complejo Terbio-Quercetina

En el estudio cinético del complejo terbio-flavonoide en la muestra vegetal (Figura 7.19), se observa un comportamiento distinto al del terbio-quercetina estándar, ya que el valor máximo de RFU se registra en  $t=0$ , es decir, al inicio de la formación del sistema problema, manteniéndose en ése rango hasta  $t=16$  min.

Se estimó que el tiempo de vida media del complejo terbio-flavonoide es de  $t_{1/2}= 484$  min, presentando una cinética de reacción de orden 2.

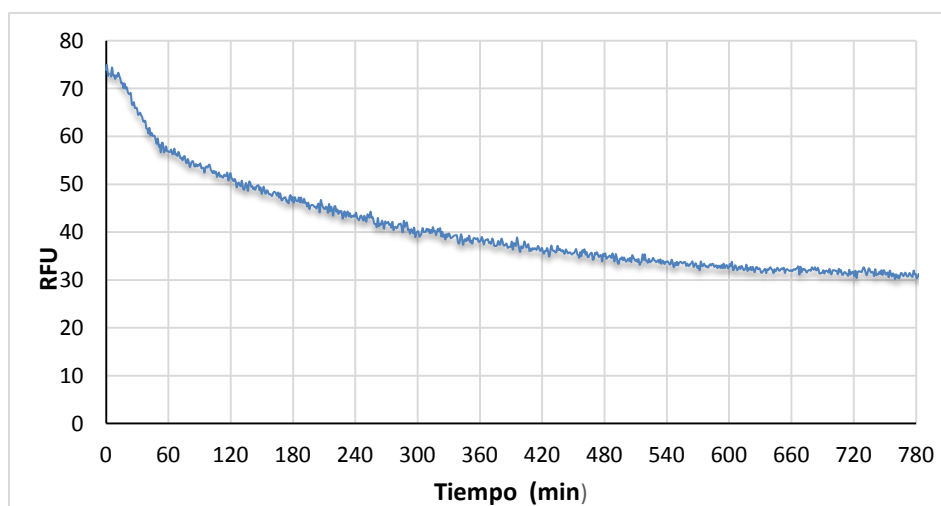


Figura 7.19 Cinética de formación y degradación del complejo Terbio-flavonoide en la muestra de chilchahua (*Tagetes nelsonii* Greenm).



## 8 CONCLUSIONES

---

- Se realizó una contribución al estudio etnobotánico que permitió documentar y organizar la información histórica y popular del uso medicinal de *Tagetes nelsonii* G. El enfoque interdisciplinario de este trabajo, ejemplifica la consolidación de la etnobotánica como ciencia, capaz de generar propuestas de conservación del conocimiento tradicional y manejo de plantas útiles para los seres humanos, así como la retribución a las localidades por los beneficios asociados con los conocimientos aportados.
- Se llevó a cabo la identificación de la planta en el Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala - UNAM, el cual ha sido integrado en la Colección Etnobotánica del herbario, con el número de registro 2411 IZTA, cuyo nombre científico es *Tagetes nelsonii* Greenm, perteneciente a la familia Asteraceae.
- Se realizó el estudio fitoquímico preliminar, que permitió la identificación cualitativa de metabolitos secundarios tales como alcaloides, aceites esenciales, cumarinas, fenoles, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, quinonas, saponinas y triterpenos presentes en la planta.
- Se efectuó la selección de las mejores condiciones de extracción de polifenoles de la planta *Tagetes nelsonii* G. utilizándose la parte aérea y estableciendo como condiciones óptimas, el extracto etanólico 70:30, asistida por sonicación durante 90 minutos a temperatura ambiente y se obtuvo el perfil electroforético característico que permitió la identificación de seis compuestos fenólicos: Rutina, kaempferol, apigenina, quercetina, ácido ascórbico y ácido clorogénico.
- Se calculó la concentración de flavonoides totales en el extracto de la planta, por fluorimetría, reportando  $386.49 \pm 0.44$  mg EQ por gramo de planta seca, siendo ésta una cantidad importante en cuanto al poder antioxidante, ya que se encuentra en concentraciones elevadas en comparación con otras especies vegetales.

## 9 PROSPECTIVAS

---

- Se sugiere incrementar la difusión de *Tagetes nelsonii* G., para contribuir al rescate y conservación de los hallazgos fitoterapéuticos de esta planta. Así como concientizar a las nuevas generaciones de la riqueza biológica y cultural que poseen.
- Se propone seguir investigando sobre sus propiedades químicas y farmacológicas, ya que se ha documentado ser eficaz como antifúngico, antiparasitario y analgésico. Así como realizar los estudios en la planta fresca y el aceite esencial.
- Es importante desarrollar estudios químicos que permitan corroborar la presencia de otros metabolitos secundarios con interés científico.
- Investigar las posibles aplicaciones del extracto de *Tagetes nelsonii* G. en el área agroquímico, como insecticida de origen natural.

## 10 REFERENCIAS

---

- Abrego R., V. H. (2015). *Principios básicos de electroforesis capilar*. (Q. Analytics, Ed.) Recuperado el 29 de noviembre de 2015, de slideplayer: [slideplayer.es/slide/2724400](http://slideplayer.es/slide/2724400)
- Alfonso, R. (2003). *Remington Farmacia* (20 ed.). Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
- Atudillo, V., Mata, R., & Navarrete, A. (2009). El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarréicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 37(1), 7-44.
- Barajas, P. J. (2009). Manejo agroecológico de plagas y enfermedad. *Tesis Maestría*. IPN, Morelos, México.
- Barajas, P., Montes-Belmont, R., Castrejón, A. F., Flores, M. H., & Serrato Cruz, M. A. (2011). Propiedades antifúngicas del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 95-91.
- Barukcic, R., & Sola, M. M. (2015). *Desarrollo de formulaciones fito-cosméticas empleando como sustancia activa el extracto seco de cinchona pubescens Vahl, rubiaceae (cascarilla)*. Tesis de Maestría, Universidad Politécnica Salesiana.
- Berlin, E., & Brent, B. (1996). *Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, México: The gastrointestinal diseases*. E.U.A: Princenton University Press.
- Bermúdez A., Oliviera, M., & Velazquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INJERCENCIA*, 30(8), 453-459.
- Castagnino, J. M. (1997). Electroforesis capilar. *Bioquímica*, 25(1), 13-32.
- Castillo, R. R. (2002). Fundamentos de electroforesis capilar. *UNAM*.
- Castillo, T., Quijano, L., & Chilpa, R. R. (2012). Algunas reflexiones actuales sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2), 41-64.
- Cataya, O. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
- Cedillo, D., & Serrato Cruz, M. (2011). Composición del aceite esencial de *Tagetes parryi* A. GRAY. *Revista Fitotecnia Mexicana A.C.*, 34(2), 145-148.
- Cervantes, R. (2012). Perfil electroforético y cuantificación de polifenoles de extractos etanólicos de *Calendula officinalis* L. E *Hippocratea excelsa* K. *Tesis QFB.*, FESC-UNAM.
- Cortés, G. C. (2015). Desarrollo de un método analítico para la determinación de coenzimas por electroforesis capilar. *Tesis de licenciatura*. Edo. México: FESC-UNAM.
- De la Cruz, J. L., Guzmán, L. M., & Viveros, V. E. (2014). Traditional medicinal plants used for the treatment of gastrointestinal disease in Chiapas, México. *Journal Applied Sciences Journal*, 31(4), 508-515.

- Dixit, P. (2013). A brief study on marigold (Tagetes species): A review. *International Research Journal of Farmacy*, 4(1), 43-48.
- Dominguez, X. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Limusa S.A de C.V.
- Escobar, P., Herrera, L. V., & Milena L., S. (2009). Composición química y actividad antitripanosomal de aceites esenciales obtenidos de Tagetes (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia. *Salud UIS*, 41(3).
- Espinoza, M., Cruz, F. O., & Trujillo, M. L. (2013). Estudio Farmacognóstico Y Bacteriológico De Tagetes nelsonii Greenm. *HYGEIA*, 3(4), 30-42.
- Espinoza, R. M. (2009). Análisis preliminar de la actividad antimicrobiana de la planta medicinal Chik chawa (Tagetes nelsonii Greenm). *Rev Cubana Plant Med*, 14.
- Estrada, R., Ubaldo, D., & Araujo, A. G. (2012). Flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud mental*, 35(5), 375-384.
- Freifelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. España: Reverté S.A.
- García, M. A. (2012). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gil, R., Gómez, M., & Trejos, J. (2008). Toxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados de Brownea ariza Brenth. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 93-101.
- Granados, L. (2014). Optimización de métodos de extracción de compuestos fenólicos de la planta hojaseñ (Fluorensia cernua D.C.) para su identificación por electroforesis capilar. *Tesis de Licenciatura*. México: UNAM.
- Harris C., D. (2003). *Análisis químico cuantitativo* (3a ed.). Barcelona: Reverté S. A.
- Heiger, N. (1997). *High performance capillary electrophoresis*. (3° ed.). Francia: Hp Co.
- Hernández, H. (2014). Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (Salvia Hispánica L.) mediante electroforesis capilar. *Tesis de licenciatura*. FESC-UNAM.
- INEGI. (2011). *Panorama sociodemográfico de Chiapas*. Obtenido de INEGI: <http://www.inegi.org.mx>
- JSTOR. (2008). *JSOR Global Plants*. Obtenido de Syntype of tagetes nelsonii Greenm. [family ASTERACEAE]: <http://plants.jstor.org>
- Larrea, P. J. (2012). *Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso aliamentario*. Universidad Publica de Navarra.
- Leposava, P., Predrag, D., Jelkic-Stankov, M., Dikanovi, D., Ciric, A., & Markovic, S. (2014). Spectrofluorimetric determination of quercetin in pharmaceutical dosage forms. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 33(2), 209-215.
- Lock de Ugaz, O. (s.f.). Análisis fotoquímico y metabolitos secundarios. *Manuela de fitoterapia, Capitulo IV*.

- Lozoya, X., Tortoriello, J., Villarreal, M. L., Berlin, E. A., & Berlin, B. (1996). Antropological Inquiry into boundaries power and knowledge. (L. Nader, Ed.) *Naked Science*, 43-68.
- Macías A, F., & Galindo C., G. (2001). Terpenoides aleopáticos: Estructura, actividad y aplicaciones. Instituto de ecología, México D.F: Plaza Valdés S.A. de C.V.
- Marcos, S. (2015). Análisis de los principales compuestos abtioxidantes en el extracto etanólico de Damiana (*Turnera diffusa*) por electroforesis capilar y su actividad antifúngica sobre el microorganismo fitopatógeno de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Tesis de licenciatura*. Fesc-UNAM.
- Marotti, M., R, P., B, B., & I, M. (2004). Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *SciELO*, 16, 440-440.
- Matesanz, S., & Valladares, F. (2009). Plantas ruderales. *Investigación y Ciencia*, 390, 10-11.
- More G., J. (1903). New and Otherwise Noteworthy Angiosperms from México And Central America. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 39(5), 117.
- Nash L., D. (1976). *Flora of Guatemala*. E.U.A: FIELDIANA.
- OMS. (2002). *The selection of essential drugs*. Obtenido de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2002.1\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf)
- Orozco, Z. (2002). *Geohistoria de Chiapas*. TGZ: Ediciones y sistemas especiales S.A de C.V.
- Osatinsky, R. (2007). ¿Qué es la electroforesis capilar? *Bioquímica y Patología Clínica*, 71(2), 60-66.
- Ovalles, D., León, L., Calderón, L., & Buchheister, M. (2002). Desarrollo de un método espectrofluorométrico para determinar astemizol. *Revista de la facultad de Farmacia*, 44.
- Page Pliego, J. (s.f.). *PROIMMSE-UNAM*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2015, de [http://www.academia.edu/995459/Determinantes\\_del\\_desplazamiento\\_de\\_pox\\_y\\_chicha\\_aguardiente\\_de\\_los\\_rituales\\_entre\\_tzotziles\\_de\\_Chamula\\_y\\_Chenalh%C3%B3\\_y\\_tseltales\\_de\\_Oxchuc\\_Chiapas](http://www.academia.edu/995459/Determinantes_del_desplazamiento_de_pox_y_chicha_aguardiente_de_los_rituales_entre_tzotziles_de_Chamula_y_Chenalh%C3%B3_y_tseltales_de_Oxchuc_Chiapas)
- Patricio, G. A. (2002). *GUÍA ETNOGRÁFICA Sistematización de datos sobre la diversidad y la diferencia de las culturas*. Quito: Abya-Yala.
- Prashant, T. (2011). Fitochemical screening and extraction: A review. *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106.
- PROCOMITH. (1990). *La herbolaria médica tzeltal-tzotzil en los Altos de Chiapas: un ensayo preliminar sobre las cincuenta especies botánicas de uso más frecuente*. (P. d. Herbolaria, Ed.) Chiapas, México.
- Quiñones, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Rai, M., & Mares, D. (2003). Plant derived antimycotics. Current trends and future prospects. *Haworth Press*.
- Rios, C., Quijano, L., & Reyes, C. (2012). Algunas reflexiones actuales sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico. *Instituto de Química-UNAM*.

- Romo del Vivar, A. (2006). *Química de la flora Mexicana*. (SQM, Ed.) México: Instituto de Química UNAM.
- Rondón, M., Velasco, J., Hernández, J., Pecheneda, M., Rojas, J., Morales, A., . . . Díaz, T. (2005). Chemical Composition and Antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela Andes. *Revista Latinoamericana de química*, 33, 40-44.
- Sahagún, B. (1946). *Historia general de las cosas de la Nueva España. Primera parte*.
- Salinas V, M. E. (2011). determinación de polifenoles totales y cafeína en granos de café verde y tostado. *Tesis Licenciatura*. UNAM, México D.F.
- Serrato C., M. Á. (2010). Información documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. *CONABIO*.
- Serrato Cruz, M. A., & Quijano, A. (1994). Usos de algunas especies de *Tagetes*. *Memorias I Simposium Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible Tradicional*, 228-238.
- Shaghghi , M., Jamshid, L., & Abolghasem , J. (2008). Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 108, 695-701.
- Shaghghi, M., Manzoori, J., & Lafshar, D. J. (2009). Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using Terbium sensitized fluorescence method. *DARU*, 17(4), 264-268.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Roberto Pinzón S. ed.). Colombia: CYTED.
- Shunjing, D., & Ed, D. (2009). Bioanalysis of the flavonoids composition of herbal extracts and dietary supplements. En K. R. B., *Flavonoids Biosynthesis, biological effects and dietary sources*. NOVA.
- Sierra A., I., Gómez R., S., Pérez Q., D., & Morante Z., S. (2010). *Análisis Instrumental: Herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al espacio Europeo de educación superior*. España: Netbiblo S. L.
- Skoog, D. A., West, D. M., F., H., & James. (1997). *Fundamentos de química analítica* (4a. ed.). Barcelona: Reverté S. A.
- Solanki, R., & Prakash, N. (2012). New method for extracting phytoconstituyentes from plants. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 3(10).
- Solorzano, K. (2014). Identificación y cuantificación de (*Tagetes* sp), (*Tagetes multiflora*) y (*Tagetes zipaquirensis*) por métodos cromatográficos. *Tesis de licenciatura*. Ecuador: ESPCH.
- Strother, J. L. (1977). *Tagetes*-systematic review. *The Biology and Chemistry of the compositae*, 769-783.

- Thitilertdecha, N., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2008). Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *Food Science and Technology*, 41(10), 2029-2035.
- Tibaduiza, R. (2010). La curación como experiencia: La zona Norte, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. *Tesis de maestría*. Ecosur.
- Torres, F. (2015). Etnobotánica y bioprospección en páramos y bosques de neblina del norte peruano: Conocimiento tradicional para la ciencia e innovación. *Instituto de montaña*.
- Trujillo, V. J., & García, L. (2001). Conocimiento indígena del efecto de plantas medicinales locales sobre las plagas agrícolas en los Altos de Chiapas, México. *Agrociencia*, 35(6).
- Turner B., L. (1996). The Comps of México- A systematic account of the family Asteraceae. *Phytologia Memoirs*, 6(10), 1-93.
- Valenzuela, G., Cravzov, A., Soro, A., Taguinas, C., & Gruszycki, M. (2014). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales y flavonoides totales en semillas de *Curcubita* spp. *Dominguezia*, 30(1).
- Villarreal., J. A., Villaseñor., J. L., & Medina, R. (2008). *Flora del valle de TEHUACÁN-CUICATLÁN*. Tribu: *Asteraceae*. Instituto de Biología-UNAM.
- Villaseñor, J. L., & Ortiz, E. (2013). La familia Asteraceae en el municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. *LACANDONIA*, 7(1), 31-55.
- Viveros, V. E. (2013). Actividad bactericida, antioxidante y tóxica de las plantas medicinales de Chiapas, México. *SILAE XX*, 61.

# 11 ANEXO

---

## 11.1 DOCUMENTACIÓN ETNOBOTÁNICA



**Anexo 11.1 A.** Centro histórico de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



**Anexo 11.1B.** Mercado municipal “José Castillo Tielmans” [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



**Anexo 11.1C.** Herboristerías en el mercado principal de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.





Anexo 11.1D. “La casa del pan Papalotl”, se dedica a la venta de alimentos orgánicos, comida vegetariana y extractos de plantas medicinales, en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



Anexo 11.1E. Centro de Desarrollo de Medicina Maya, se encarga de la difusión de prácticas tradicionales tzeltal-tzotzil, y cuenta con un número importante de plantas medicinales y así como un huerto demostrativo, en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



Anexo 11.1F. Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, en cuya biblioteca se encontró la mayoría de la documentación bibliográfica de *Tagetes nelsonii* G. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



Anexo 11.1G. San Pedro Chenalhó, Chiapas. A la izquierda la plazuela principal, a la derecha una de las calles donde se realizó la entrevista. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



Anexo 11.1H. Comunidad de Yabteclum, municipio de Chenalhó, Chiapas, el poblado cuenta una abundante flora silvestre. [Fotografía de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



Anexo 11.1 I San Andrés Larrainzar, Chiapas. A la izquierda, plazuela principal del pueblo, a la derecha una de las casas entrevistadas. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



Anexo 11.1 J San Juan Chamula. Chiapas. A la izquierda, carretera de entrada al pueblo, a la derecha una de las colonias ubicadas al oeste del pueblo. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo del autor

Anexo. 11.1K Formato de la entrevista semiestructurada aplicada a los habitantes de las localidades seleccionadas, (Elaborado por Edith Bibiana Díaz Gutiérrez).

Nombre		Fecha	
Edad		Ocupación	
Lugar			
Nombre popular de la planta (Tagetes nelsonii)	Uso	Parte utilizada	Forma de preparación
			Cantidad:  Vía de aplicación:
¿Dónde consigue la planta?			
¿Cómo reconoce la planta?			
¿Quién le enseñó sobre sus propiedades medicinales?			
Bisabuelos o abuelos <input type="checkbox"/>	Padres o familiares <input type="checkbox"/>	Personas locales <input type="checkbox"/>	Otros <input type="checkbox"/>
<p>_____</p> <p>_____</p>			
¿Ha comprobado los beneficios de la planta en sí mismo o en su familia?			
Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
¿Por qué? _____			
_____			
Observaciones			





Anexo 11.1M Hojas de *Tagetes nelsonii* G., las fotos superior e inferior izquierda muestran el haz de la hoja, fotos superior e inferior derecha, muestran el envés. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo de autor.



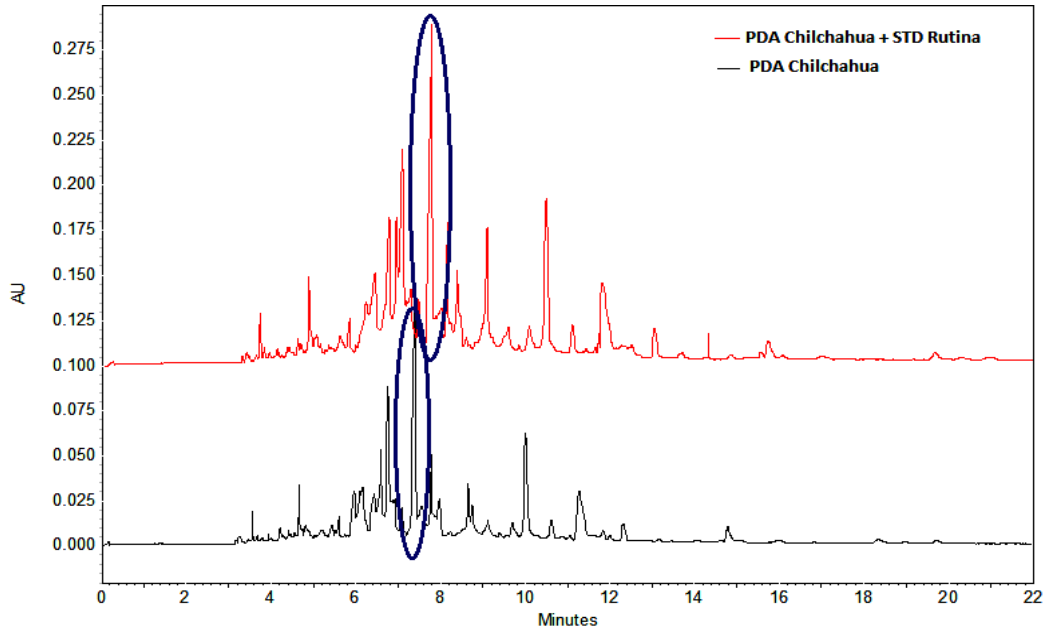
Anexo 11.1 N Secado a la sombra de *Tagetes nelsonii* G. separadas en hojas, tallo y flores.



**Anexo 11.10** *Tagetes nelsonii* G. *En las fotos superiores se muestra el ejemplar completo, foto central, hojas, abajo flores amarilla dispuestas en racimos. [Fotografías de Edith Bibiana Díaz Gutiérrez] Archivo del autor.*

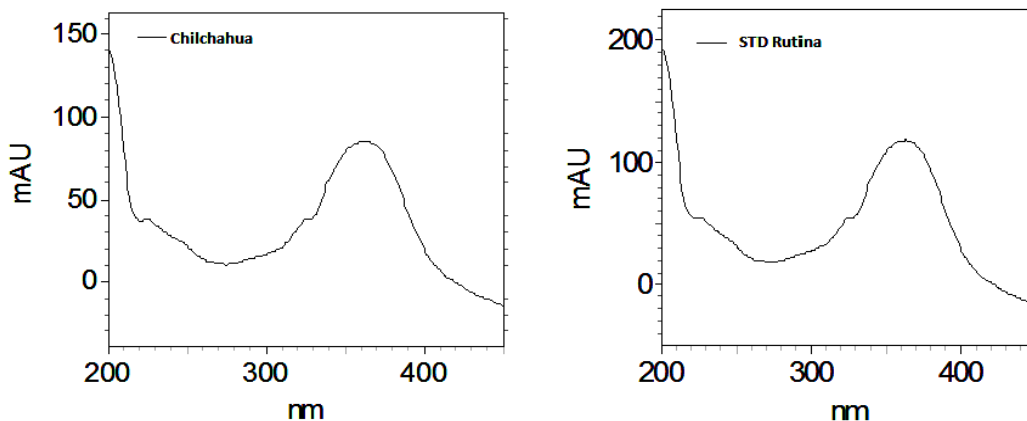
## 11.2 ELECTROFEROGRAMAS DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS IDENTIFICADOS

### RUTINA



Anexo 11.2 A Electroferograma comparativo del extracto de *Tagetes nelsonii* G. con adición de estándar de rutina.

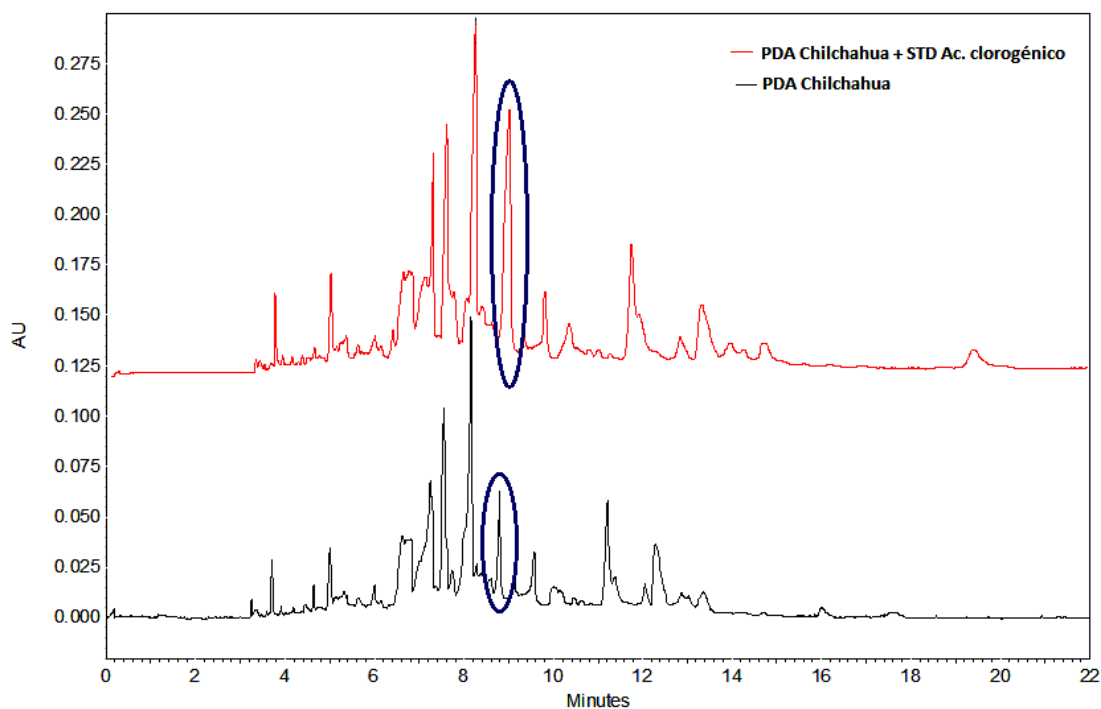
El electroferograma (Anexo 11.2 A), muestra la señal identificada de rutina en el extracto de la planta, comparada con el electroferograma fortificado con el estándar. Posteriormente fue corroborado con los espectros de absorción de dicha señal (Anexo 11.2 B), en el que se muestra a la chilchahua en 365 nm., y el estándar de rutina en 363.14 nm., coincidiendo significativamente. De esta forma, se confirma la presencia de rutina en el extracto optimizado de chilchahua.



Anexo 11.2B Espectros de absorción de la rutina presente en el extracto (izquierda), rutina estándar (derecha).

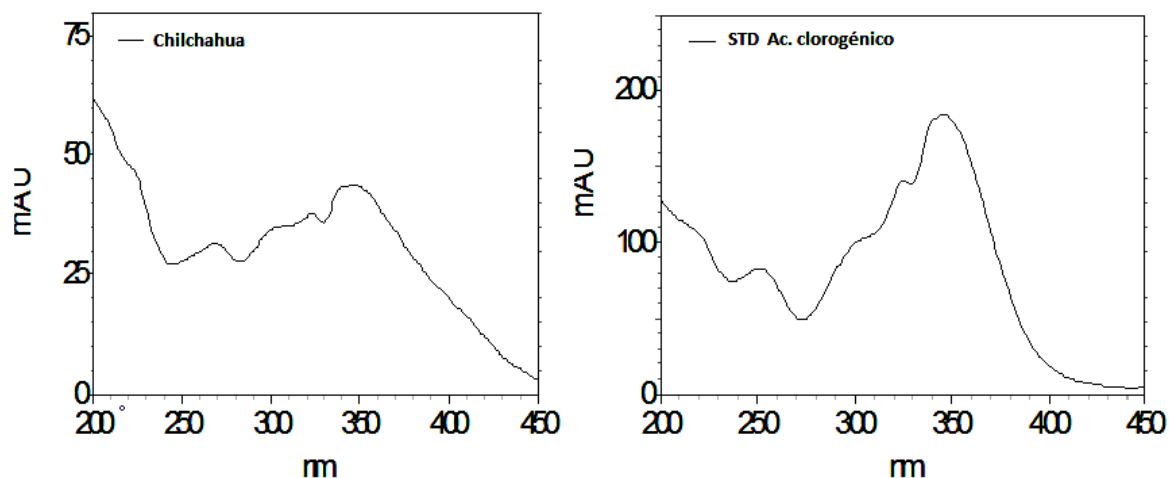


## ÁCIDO CLOROGÉNICO



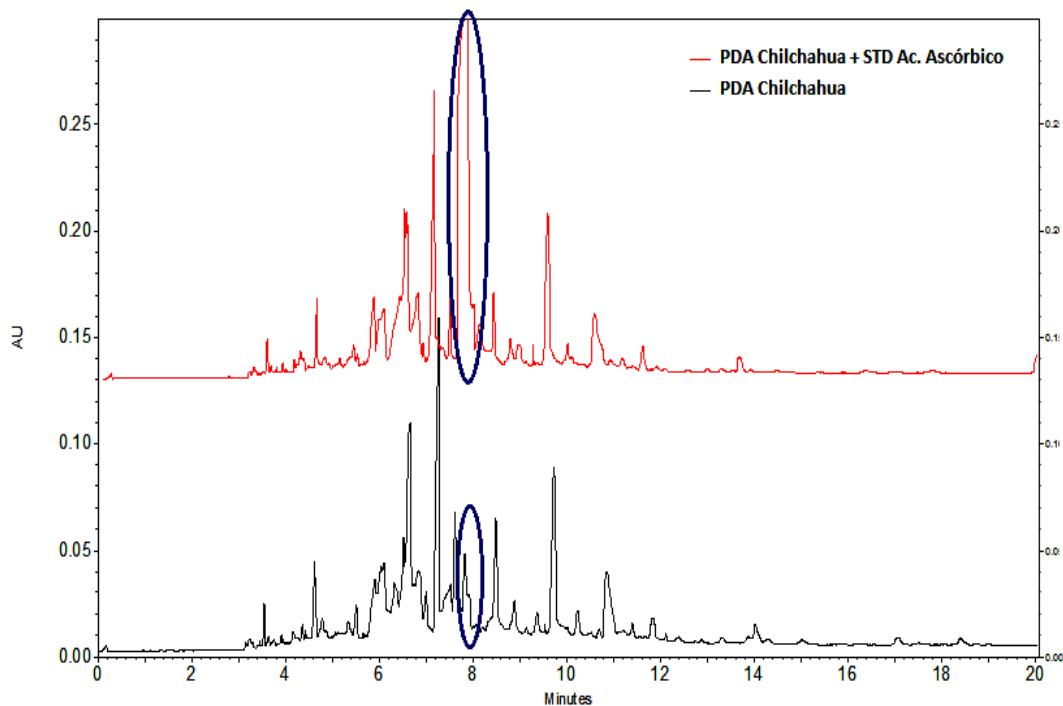
Anexo 11.2 C Electroferograma comparativo del extracto de *Tagetes nelsonii* G. con adición de estándar de ácido clorogénico

El electroferograma (Anexo 11.2 C), muestra la señal identificada de ácido clorogénico en el extracto de la planta, comparada con el electroferograma fortificado con el estándar. Posteriormente fue corroborado con los espectros de absorción de dicha señal (Anexo 11.2 D), en el que se muestra a la chilchahua en 345.87 nm y el estándar de ácido clorogénico en 346.18 nm., coincidiendo significativamente. De esta forma, se confirma la presencia de ácido clorogénico en el extracto optimizado de chilchahua.



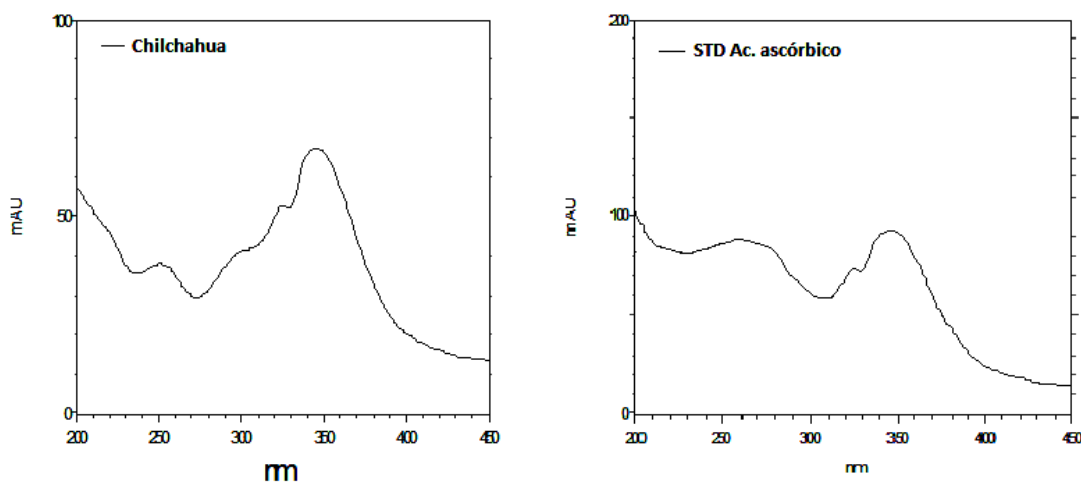
Anexo 11.2 D Espectros de absorción de la ac. clorogénico presente en el extracto (izquierda), ac. clorogénico estándar (derecha).

## ÁCIDO ASCÓRBICO



Anexo 11.2 E Electroferograma comparativo del extracto de *Tagetes nelsonii* G. con adición de estándar de Ac. Ascórbico.

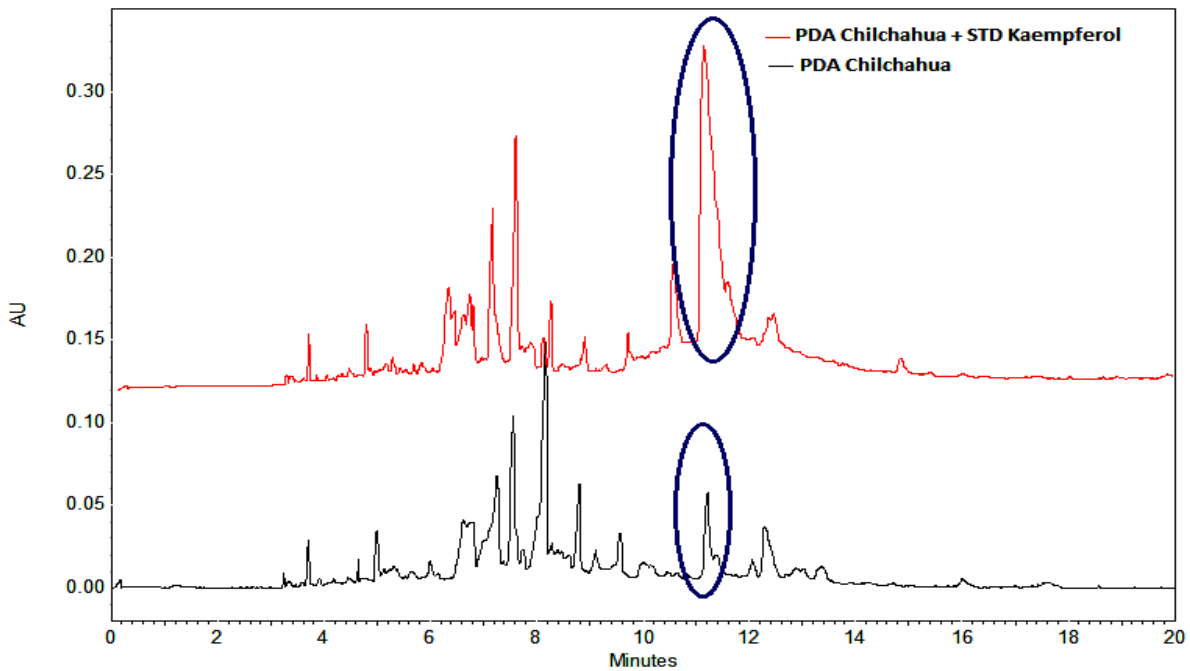
El electroferograma (Anexo 11.2 E), muestra la señal identificada de ácido ascórbico en el extracto de la planta, comparada con el electroferograma fortificado con el estándar. Posteriormente fue corroborado con los espectros de absorción de dicha señal (Anexo 11.2 F), en el que se muestra a la chilchahua en 350.09 nm y el estándar de ácido ascórbico en 349.56 nm., coincidiendo significativamente. De esta forma, se confirma la presencia de ácido ascórbico en el extracto optimizado de chilchahua.



Anexo 11.2 F Espectros de absorción del ácido ascórbico presente en el extracto (izquierda), ácido ascórbico estándar (derecha).

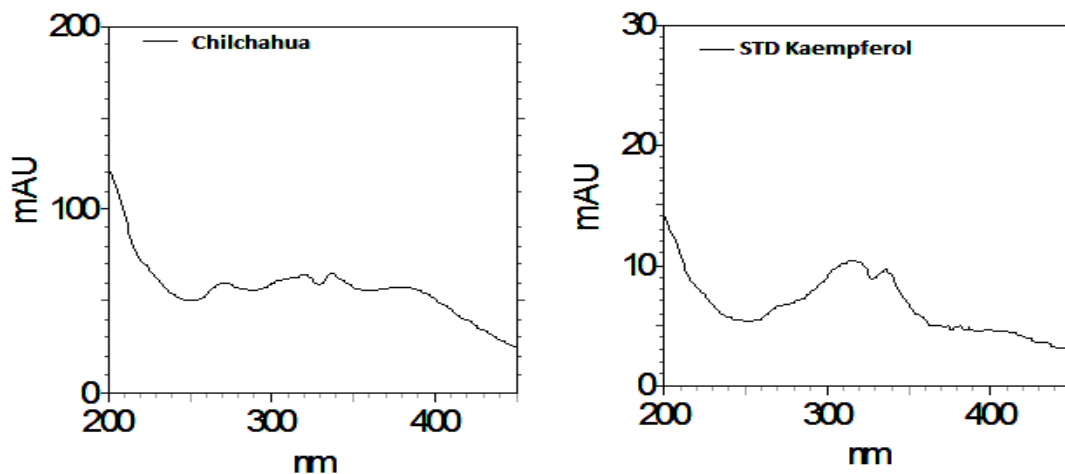


## KAEMPFEROL



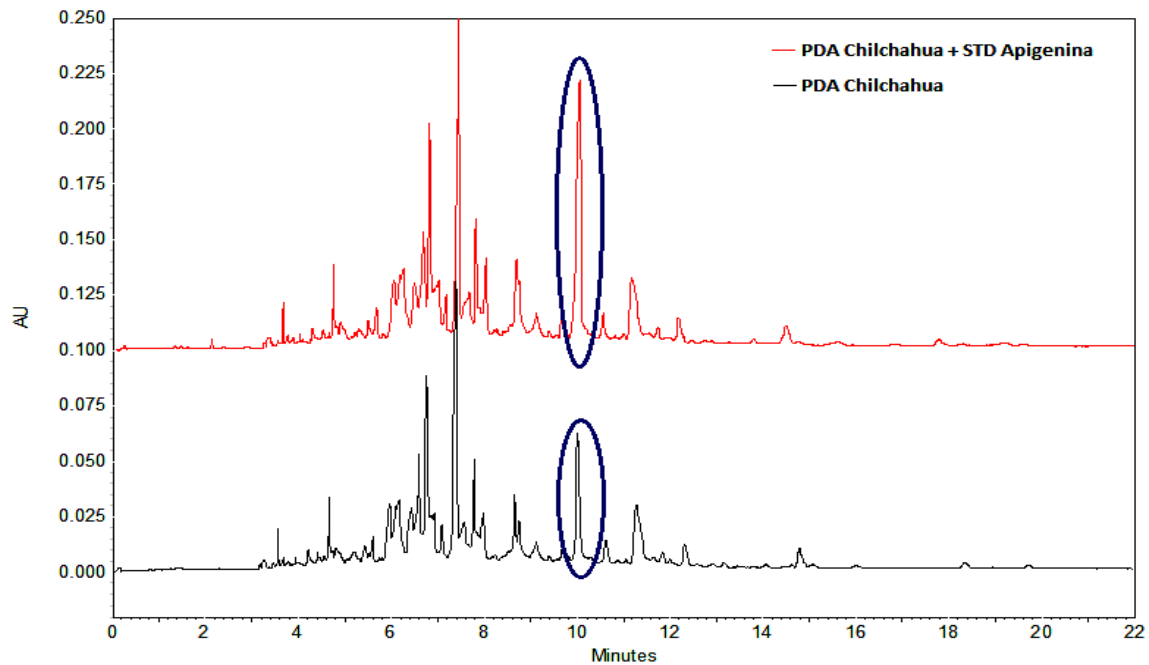
Anexo 11.2 G Electroferograma comparativo del extracto de *Tagetes nelsonii* G. con adición de estándar de Kaempferol.

El electroferograma (Anexo 11.2 G), muestra la señal identificada de kaempferol en el extracto de la planta, comparada con el electroferograma fortificado con el estándar. Posteriormente fue corroborado con los espectros de absorción de dicha señal (Anexo 11.2 H), en el que se muestra a la chilchahua en 320 nm y el estándar de kaempferol en 315.83nm., coincidiendo significativamente. De esta forma, se confirma la presencia de kaempferol en el extracto optimizado de chilchahua.



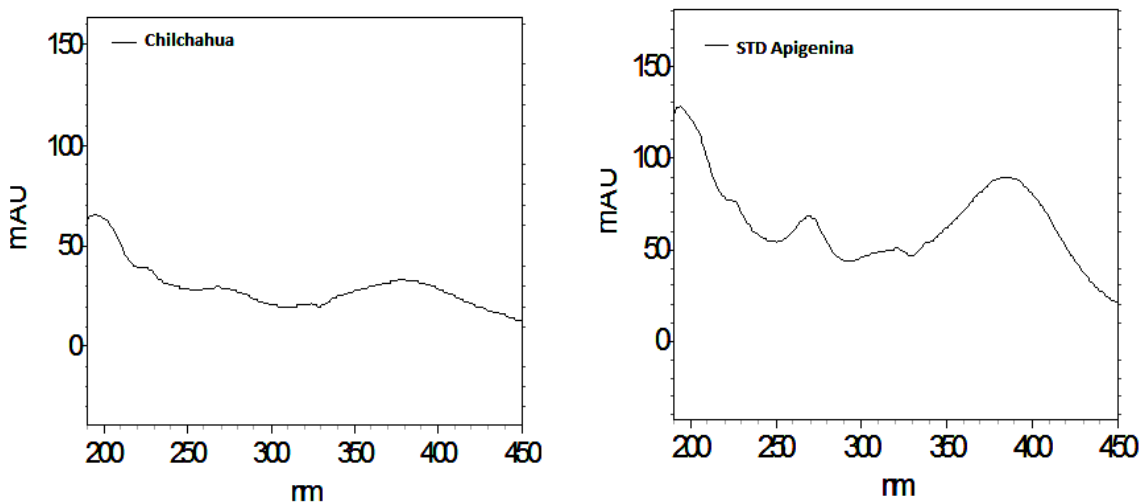
Anexo 11.2H Espectros de absorción de kaempferol presente en el extracto (izquierda), kaempferol estándar (derecha).

## APIGENINA



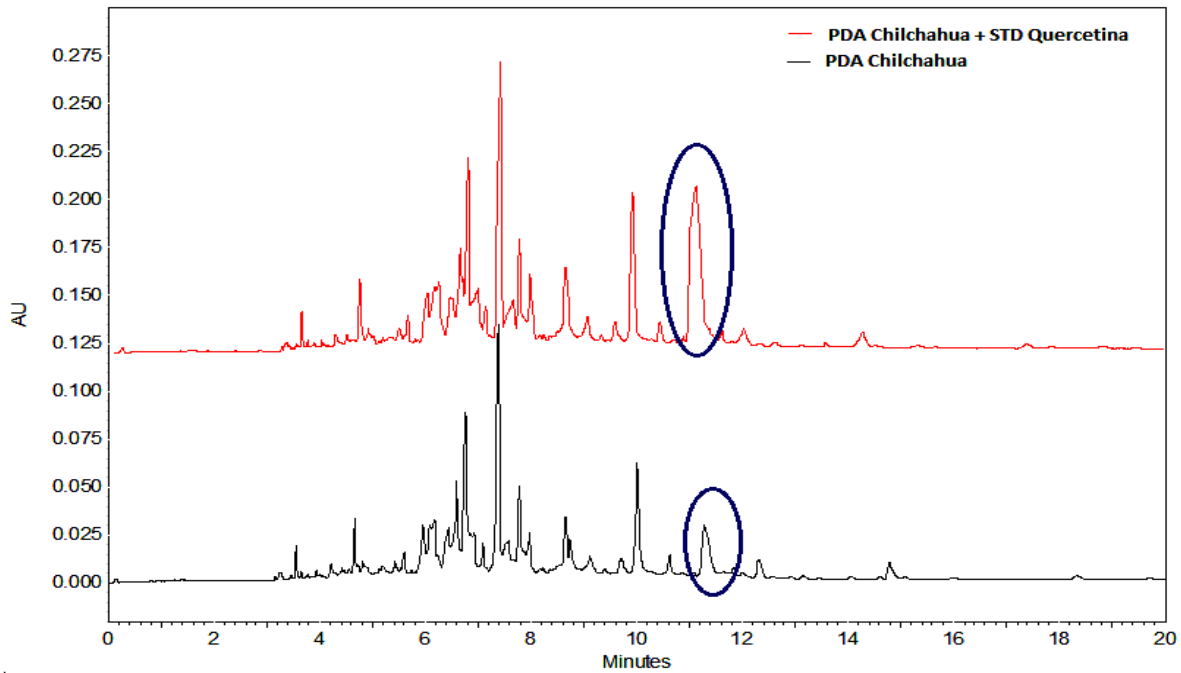
Anexo 11.2 I Electroferograma comparativo del extracto de *Tagetes nelsonii* G. con adición de estándar de apigenina.

El electroferograma (Anexo 11.2 I), muestra la señal identificada de apigenina en el extracto de la planta, comparada con el electroferograma fortificado con el estándar. Posteriormente fue corroborado con los espectros de absorción de dicha señal (Anexo 11.2 J), en el que se muestra a la chilchahua en 377.53 nm y el estándar de apigenina en 385.45 nm., coincidiendo significativamente. De esta forma, se confirma la presencia de apigenina en el extracto optimizado de chilchahua.



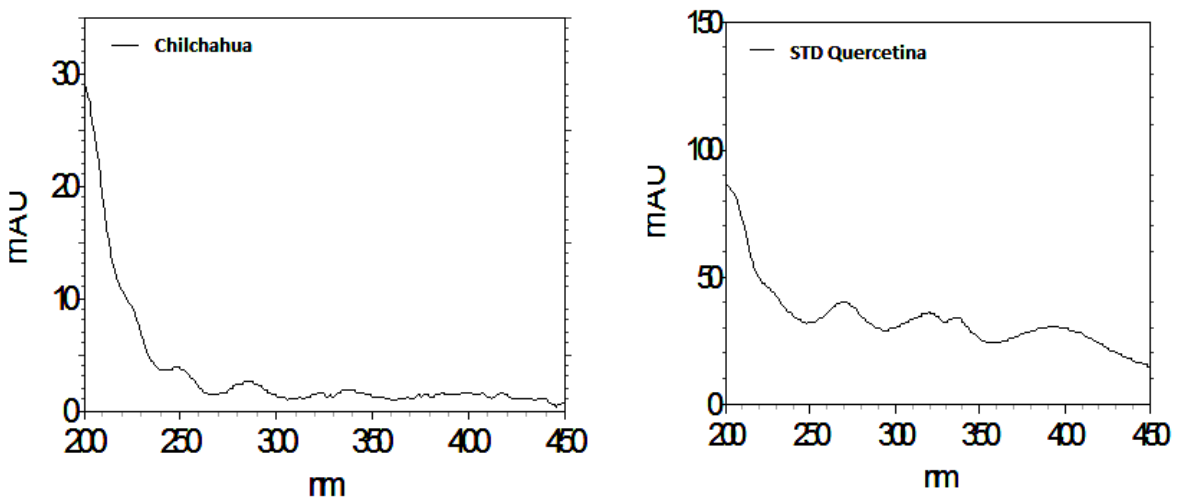
Anexo 11.2 J Espectros de absorción de la apigenina presente en el extracto (izquierda), apigenina estándar (derecha).

## QUERCETINA



Anexo 11.2 K Electroferograma comparativo del extracto de *Tagetes nelsonii* G. con adición de estándar de quercetina

El electroferograma (Anexo 11.2 K), muestra la señal identificada de quercetina en el extracto de la planta, comparada con el electroferograma fortificado con el estándar. Posteriormente fue corroborado con los espectros de absorción de dicha señal (Anexo 11.2 L), en el que se muestra a la chilchahua en 268.87 nm., y el estándar de quercetina en 249.72 nm., coincidiendo en la forma del espectro y la absorción máxima. De esta forma, se confirma la presencia de quercetina en el extracto optimizado de chilchahua.



Anexo 11.2 L Espectros de absorción de la quercetina presente en el extracto (izquierda), quercetina estándar (derecha).

Además de los compuestos fenólicos identificados en el extracto optimizado, existen distintas señales con diferentes tiempos de migración que no coinciden con el resto de los estándares utilizados, sin embargo, es evidente que estas señales son de compuestos fenólicos de diferente naturaleza a los que se adquirieron en esta investigación.

**Anexo 11.2 M Estándares utilizados para la identificación de compuestos fenólicos en *Tagetes nelsonii* G.**

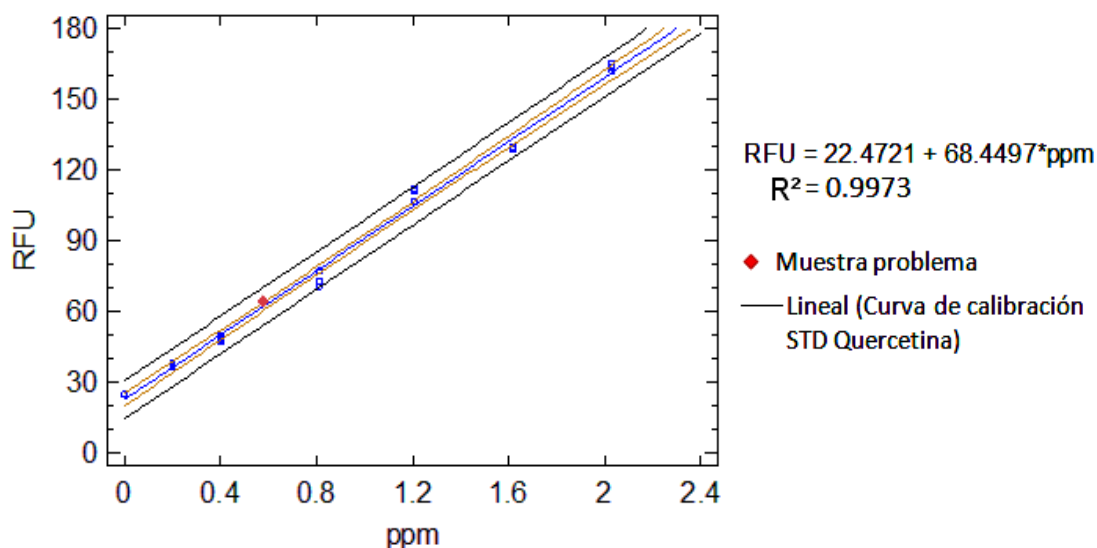
<b>Estándar</b>	<b>Marca</b>	<b>Presente en <i>Tagetes nelsonii</i> G.</b>
<b>Ac. ascórbico</b>	COSUFAR	SI
<b>Ac. clorogénico</b>	Sigma Aldrich	SI
<b>Ac. gálico</b>	Sigma Aldrich	NO
<b>Ac. Elagico</b>	Sigma Aldrich	NO
<b>Ac. Caféico</b>	Sigma Aldrich	NO
<b>Ac. Cítrico</b>	Baker	NO
<b>Apigenina</b>	Sigma Aldrich	SI
<b>(+)-Catequina</b>	Sigma Aldrich	NO
<b>(-)-Epicatequina</b>	Sigma Aldrich	NO
<b>Kaempferol</b>	Sigma Aldrich	SI
<b>Naringina</b>	Sigma Aldrich	NO
<b>Quercetina</b>	Sigma Aldrich	SI
<b>Resveratrol</b>	Sigma Aldrich	NO
<b>Rutina.</b>	Sigma Aldrich	SI

### 11.3 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Se aplicó la técnica propuesta por Shaghghi M. (2009) para la determinación de los flavonoides totales, expresada en EQ en el extracto optimizado de chilchahua, llevando a cabo una curva de calibración de estándar externo. Por consiguiente, el espectro de fluorescencia presentó una señal analítica (Tb-quercetina) con cantidades conocidas de quercetina de 0 a 2.0 ppm. Tabla 1.

Anexo 11.3 A Tabla de Resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides totales en *T. nelsonii*

Quercetina (ppm)	RFU			DE	%DER
	Rep 1	Rep 2	Rep 3		
0	24.552	24.576	24.438	0.0737	0.300
0.2	38.137	36.803	36.708	0.799	2.146
0.4	49.426	48.025	46.655	1.385	2.884
0.81	77.238	72.779	70.507	3.424	4.658
1.21	112.24	106.73	110.96	2.883	2.622
1.62	129.83	130.01	128.62	0.755	0.583
2.03	165.43	163.48	162.31	1.576	0.962



Anexo 11.3 B Curva de calibración del complejo Terbio- quercetina.

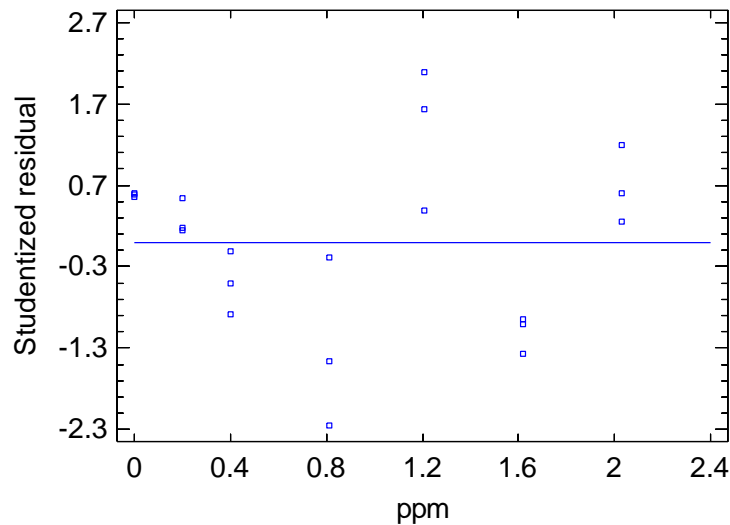
## Análisis ANOVA

Se realizó el estudio de la curva de calibración de patrón externo por medio del análisis ANOVA, y el software Statgraphics centurión XVI, en el que se obtuvo el gráfico con las tres repeticiones de cada curva de calibración; se determinó si existe tendencia lineal en los datos y se obtuvo su respectiva ecuación de línea recta:

$$\text{RFU} = 22.4721 + 68.4497 *(\text{ppm}) \quad \text{Ec. 1}$$

Con un coeficiente de correlación lineal de 0,9973, que indica que hay un ajuste al modelo lineal entre las variables.

En la gráfica de residuales, se observa que no existen residuos atípicos, además se considera que éstos datos son homocedásticos, es decir, sus varianzas son homogéneas y por lo tanto el ajuste al modelo lineal es válido.

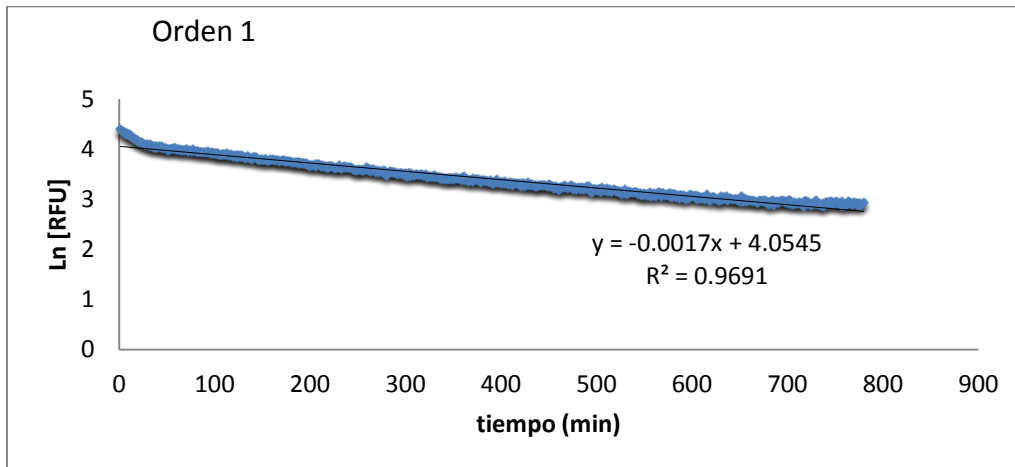


Anexo 11.3 C Gráfico de residuales de la curva de calibración

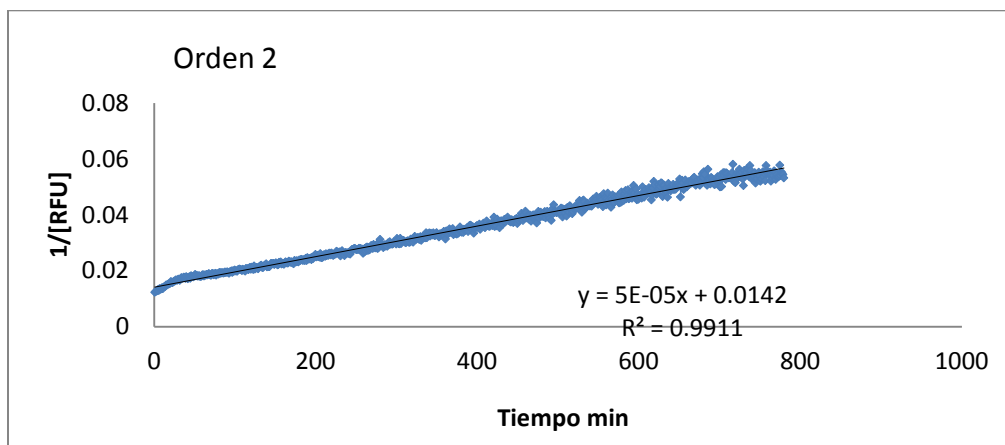
Anexo 11.3 D Tabla de resultados de la intensidad relativa de fluorescencia (RFU) obtenida de la muestra problema

	RFU muestra	Stock ppm	µg/mL	µg/mL	µg/mL	Cantidad en 1.0027g de planta	mg EQ/g de planta seca
	66.14	0.6379	45.5682	911.3657	45568.289	387.3304	386.2874
	66.222	0.6391	45.6538	913.0771	45653.8576	388.0577	387.0128
	66.129	0.6377	45.5568	911.1362	45556.8103	387.2328	386.1901
<b>PROMEDIO</b>	66.163	0.6383	45.5929	911.8597	45592.9857	387.5403	386.4968
<b>DESV. EST.</b>	0.0508	0.0007	0.0530	1.0605	53.0281	0.4507	0.4495
<b>%DER</b>	0.0768	0.11630	0.1163	0.1163	0.1163	0.1163	0.1163

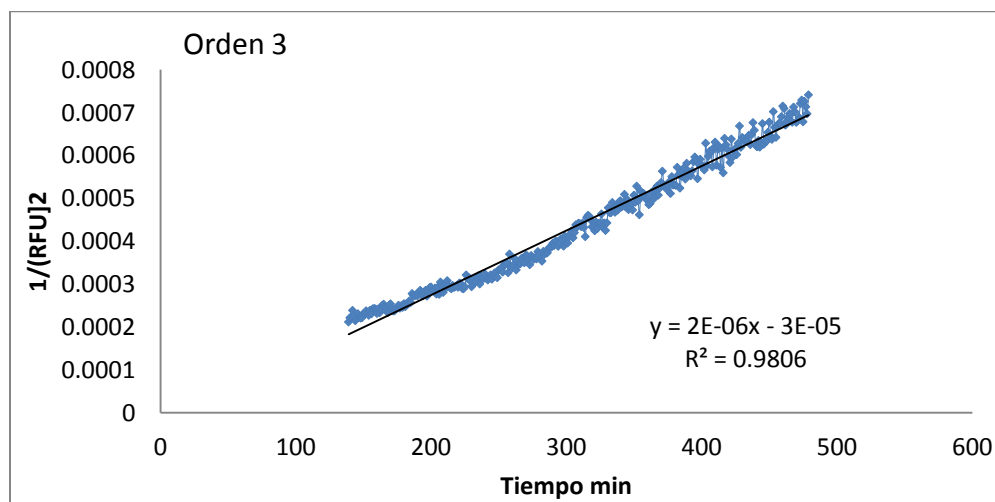
## 11.4 DETERMINACIÓN DEL ORDEN DE REACCIÓN



Anexo 11.4 A Gráfica representativa del orden de reacción 1 del complejo Tb-Flavonoide en la muestra vegetal.



Anexo 11.4 B Gráfica representativa del orden de reacción 2 del complejo Tb-Flavonoide en la muestra vegetal.



Anexo 4 C Gráfica representativa del orden de reacción 3 del complejo Tb-Flavonoide en la muestra vegetal.

## 11.5 PRUEBAS REACTIVAS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO

**Dragendorff:** La fracción disuelta en 1 mL de HCl al 1%, sin disolvente orgánico; se mezcla con gotas del reactivo. La aparición de un precipitado rojo ladrillo, indica la presencia de alcaloides.

**Liebermann-Burchard:** La fracción disuelta en 1 mL de cloroformo se le añade 1 mL de anhídrido acético y se mezcla. Por la pared del tubo se dejan caer de 3 a 4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La aparición de un color verde-verde oscuro, indica la presencia de triterpenos y/o esteroides.

**Börntrager:** La fracción disuelta de 1 mL de cloroformo, se agita con 1 mL de NaOH al 5%. Si la fase alcalina se colorea de rosa-rojo esto indica la presencia de quinonas.

**Baljet.** La fracción disuelta en 1 ml de etanol, se le añade una mezcla recién preparada de 1 ml de ácido pícrico al 1% en etanol y 1 mL de NaOH al 10% en agua. Un color o precipitado rojo naranja indica la presencia de agrupamientos lactónicos.

**Sudán:** Cuando un extracto en éter se evapora en presencia de una solución de Sudán III al 0.6% en glicerina-agua 1:1. En un vidrio de reloj colocar una gota del extracto y añadir 2 o 3 gotas del reactivo de Sudán. La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro, indica la presencia de lípidos y /o aceites esenciales.

**Fehling:** La fracción concentrada a seco se trata con una mezcla recién preparada de 1 mL de Fehling A y 1 ml de Fehling B. Se calienta a baño María de 15 a 30 minutos. La aparición de un color rojo o precipitado rojo indica la presencia de azúcares reductores.

**Espuma:** La fracción disuelta de 1 mL de etanol se le adiciona 10 mL de agua tibia y se agita fuertemente durante 2 minutos. La aparición de espuma jabonosa que se mantenga por más de 5 minutos, indica la presencia de saponinas.

**Rosenthaler:** La fracción disuelta en 1 mL de etanol se le adiciona una gota de reactivo Rosenthaler y 2 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta.

**Cloruro Férrico:** La fracción disuelta en 1 mL de etanol, se le añade de 3 a 4 gotas de reactivo de cloruro férrico. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indican la presencia de fenoles y /o taninos.

**Ácido Silicotúngstico:** El filtrado en HCl diluido se toma 1 mL se mezcla con gotas de reactivo de Ácido Silicotúngstico. La presencia de un precipitado blanco y fino indica la presencia de alcaloides.

**Hager:** Se reconstituye el extracto en HCl diluido y se toma 1 mL, el cual se mezcla con 2 o 3 gotas de reactivo de Hager. La aparición de agujas de color amarillo indica la presencia de alcaloides.



**Shinoda:** La fracción es disuelta en 2 mL de etanol, se añade un pedazo de viruta de magnesio metálico y enseguida se añade por las paredes del tubo  $H_2SO_4$  concentrado. La aparición de color naranja, rojo, rojo azulado o violeta indica la presencia de flavonoides y xantonas.

**Amoniaco:** Se impregna una tira de papel filtro con extracto diluido, se deja secar a temperatura ambiente, posteriormente se somete a los vapores de amoniaco. La aparición de color amarillo ocre se considera positiva para flavonoides.

**Kedde:** La fracción disuelta en 1 mL de etanol se trata con una mezcla recién preparada de 1 mL de ácido 3-5dinitrobenzónico al 2% en metanol y 1 mL de KOH al 5.7 % en agua. El desarrollo de una coloración violeta entre 1 y 10 minutos indica la presencia de glicósidos cardiotónicos.

## 11.6 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA

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





FESI/HI/015/2015

**EDITH BIBIANA DÍAZ GUTIÉRREZ,**  
Alumna de la Carrera de Química,  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM,  
Presente.

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del proyecto de investigación: “Obtención del perfil de polifenoles de la planta chilchahua (*Tagetes nelsonii* Greenm.) ASTERACEAE, mediante la técnica de electroforesis capilar”, que se realiza en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM bajo la dirección de la QFB Brígida del Carmen Camacho Enríquez.

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

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	NO. DE REGISTRO
<i>Tagetes nelsonii</i> Greenm.	ASTERACEAE/ COMPOSITAE	“Chilchahua”	2411 IZTA

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

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



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





Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
Tel: 5623-1147 • 5623-1189  
Fax: 5623-1149  
Av. de las Barreras No. 1 Los Reyes Iztacala,  
Tlalnepantla, C.P. 54090,  
Estado de México, México

Herbario IZTA  
Edificio E4, Planta baja  
Av. de las Barreras No. 1  
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla  
Estado de México, CP 54090 MÉXICO  
Tel/Fax: 5623-1376  
herbario\_izta@campus.iztacala.unam.mx



Anexo 11.5 A Certificado de identificación taxonómica de la planta *Tagetes nelsonii* Greenm



HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
Nº REG. 2411	FAM.: ASTERACEAE	
N.C.: <i>Tagetes</i>	<i>nelsonii</i>	Greenm.
N.P.: Chilchagua		
EDO. Chiapas		
MPIO. San Cristóbal de las Casas		
LOC.: Zona Ecológica "Arcotete"		
TIPO DE VEG.: Regiones montañosas mayas de Chiapas y Guatemala		
COORD. 16°44'43"	y 92°34'38"	ALT.: 2119 m.s.n.m
OBS.: Tesis Química FES-C: "Obtención del perfil de polifenoles de la planta chichagua ( <i>Tagetes nelsonii</i> Greenm.) ASTERACEAE mediante la técnica de electroforesis capilar. Floración julio y agosto, octubre-noviembre, amarillas.		
COL. Manuela Gutiérrez Sántiz y Edith Bibiana Díaz Gutiérrez		
Nº DE COL: s.n.	FECHA: 27 /	Julio / 2014
DET.: Patricia Jáquez Ríos		
USOS: Medicinal (Salmonelosis y parásitos intestinales;diarrea, fiebre y dolores de cabeza		

Anexo 11.5 B Fotografía del ejemplar que ha sido integrado en la Colección Etnobotánica del Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM.