Te
UVG
1988

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* Cav. (PERICON) COMO ANTIMICROBIANO Y ANALISIS DEL COMPUESTO QUE LE CONFIERE ESTA PROPIEDAD.

MONICA GANDARA ROSAL

Trabajo de investigación presentado para optar al grado académico de

Licenciatura en Bioquímica

Guatemala

1988

ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* Cav. (PERICON) COMO ANTIMICROBIANO Y ANALISIS DEL COMPUESTO QUE LE CONFIERE ESTA PROPIEDAD

Vo. Bo.:

(f) ----------

Licenciado Sergio Domingo Ortiz M.

Asesor

Tribunal:

(f) ----------

Licenciado Sergio Domingo Ortiz M.

(f) ----------

Doctor Juan de Dios Calle S.

(f) ----------

Licenciada Rebeca Conde G.

Fecha de aprobación: 6 de julio de 1988.

Agradezco la colaboración y ayuda brindada para la realización de este trabajo, en especial a las siguientes personas e instituciones:

Lic. Sergio Domingo Ortiz Martínez
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacia (USAC).

Lic. Armando Cáceres
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacia (USAC).

Dr. Juan de Dios Calle S.
Departamento de Química
U. del Valle de Guatemala.

Personal del Edificio de Ciencias
U. del Valle de Guatemala.

CAPLAMED

CONTENIDO

		Página
I.	RESUMEN	1
II.	JUSTIFICACION	3
III.	MARCO TEORICO	5
	A. Revisión Botánica	5
	1. Familia Compositae	6
	2. Género Tagetes	8
	3. Tagetes lúcida	11
	B. Análisis Fitoquímico de las especies del género Tagetes	16
	C. Análisis Fitoquímico de la especie Tagetes lúcida Cav.	34
	D. Actividad Antimicrobiana	38
III.	OBJETIVOS	42
IV.	ASPECTOS METODOLOGICOS Y RESULTADOS	43
	A. Universo de Trabajo	43
	B. Procedimiento	43
	a. Preparación de la planta	43
	b. Preparación de extractos metanólicos	43
	c. Ensayo microbiológico	43

d. Separación cromatográfica de fracciones y prueba de las mismas como antimicótico 47

e. Determinación de MIC 53

VI. DISCUSION 58

VII. CONCLUSIONES 60

VIII. REFERENCIAS 61

IX. APENDICES 64

Espectro IR de 7-metoxicumarina 64

Espectro NMR de 7-metoxicumarina 65

LISTA DE TABLAS

Tabla #		Página
1.	Usos populares de Tagetes lucida	14
2.	Constituyentes volátiles en Tagetes	20
3.	Porcentajes relativos de distribución de carotenoides en pétalos de margarita de diferentes fuentes	22
4.	Flavonoides y otros compuestos fenólicos	23
5.	Tiofenos en Tagetes	24
6.	Especies estudiadas de la tribu Tageteae	27
7.	Tiofenos en Tagetes	33
8.	Halos de inhibición de extracto metanólico de pericón	41
9.	Resultados de las pruebas de las fracciones antimicóticas	45
10.	Valores de Rf de los compuestos con actividad antimicótica	45
11.	Valores promedio de halo de inhibición de distintas cepas microbianas tratadas con diferentes concentraciones de 7-metoxi-cumarina	47

12. Valores de MIC de 7-metoxi-cumarina contra diferentes cepas microbianas 48

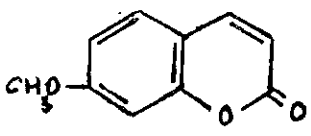
LISTA DE FIGURAS

#		Pag.
1.	Alopatuletina	31
2.	Dibujo de <u>Tagetes lúcida</u>	66

RESUMEN

Al inicio de este trabajo se conocía la necesidad de conocer las bases sólidas para el empleo de Tagetes lucida como antimicrobiano, que es tan popular en el area rural de Guatemala. Otros de sus usos ya habían sido estudiados y se había confirmado su efectividad en los mismos; fue esta la motivación principal para realizar este estudio.

Para lograr la elucidación de los grupos funcionales presentes en el (los) compuesto (s) con la actividad se hizo un sirupe del extracto de la planta y se comprobó su actividad; luego mediante distintas técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina, en capa fina preparativa y en columna) y después de la selección de los solventes adecuados se consiguió la separación del compuesto con la mayor parte de la actividad, aunque hay otros componentes de la planta que también presentan esta propiedad antimicrobiana. El compuesto encontrado fue la 7-metoxi-cumarina, que también presenta propiedades antiespasmódicas, las cuales fueron comprobadas anteriormente en otros estudios.



7-metoxi-cumarina

Después de haber encontrado el compuesto fue probada su actividad contra diferentes especies bacterianas.

JUSTIFICACION:

El uso de Tagetes lúcida es muy extendido en toda América Latina, en rituales y ceremonias religiosas, tanto como en la curación de muchas afecciones.

Los indígenas le atribuyen una serie de propiedades, entre estas la de ser un antibiótico muy efectivo. En otras plantas de la familia Compositae y aún del género Tagetes esta actividad ha sido comprobada.

Un ensayo microbiológico de fototoxicidad de materiales de plantas, reportó que el aquenio de las maravillas (de la familia Compositae), producía fototoxicidad formando una zona clara de inhibición del crecimiento de Candida albicans, después de irradiación prolongada en el UV. Gran número de otras especies de Compositae son también fototóxicas hacia Candida. (11).

La recién descubierta capacidad fotosintetizadora de poliacetilenos de las plantas superiores puede extenderse para incluir ciertos de sus derivados de tiofeno como alfa-tertienil y 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT). Estos derivados de azufre, que son de amplia ocurrencia en ciertos

géneros de la familia Compositae, son letales a bacterias, levaduras y otros hongos, nemátodos y peces. Alfa-tertienil y BBT a menudo se localizan en las raices de las especies de Compositae, e.g. Tagetes, aunque en otras especies se encuentran en las hojas y otras partes aéreas de la planta. (12).

Debido a la carencia de un trabajo sistemático de las propiedades antimicrobianas de Tagetes lucida se emprendió éste trabajo.

MARCO TEORICO

A. Revisión Botánica

La familia Compositae es la más grande del grupo de las plantas vasculares, y se estima que los géneros contenidos en ella son 950 y las especies llegan a 20,000. Están distribuidas en la mayor parte de la tierra y en casi todos los habitats. La mayoría son herbáceas aunque cerca de 2% son árboles o arbustos.

La familia se reconoce generalmente por la inflorescencia, una cabeza involucra, las corolas gamopetalosas de 5 lóbulos, la presencia de un papo, el ovario inferior bicarpelado, uniloculado con un solo óvulo basal y los 5 estambres. El fruto seco que no se abre con una semilla sin endosperma, es también distintivo.

La clasificación de Cassini respecto de las familias ofrece 2 subdivisiones primarias:

1) Las Tubifloreae con 12 tribus todas caracterizadas por la corola con las flores en disco tubulares bilabiadas y por la ausencia de canales lactíferos.

2) Las Liguliflóreae son sólo una tribu que se distingue porque sus flores son todas liguladas y

tienen canales lactíferos anastomosados.

Entre las tribus de Tubifloreae está el género Helenieae y entre los géneros de esta tribu se encuentra Tagetes.

Desde el punto de vista económico la familia Compositae es de importancia considerable. Algunos de sus miembros son comestibles, otros ornamentales y otros son usados en grado limitado en preparaciones medicinales. (30).

i. Familia Compositae:

Hierbas, arbustos y árboles con savia usualmente lechosa. Las hojas alternadas, opuestas o raramente en verticilo, pinnadas, simples, palmadas lobuladas, divididas y compuestas, frecuentemente en rosetas basales, o como matorral en forma de aguja ó reducidas a escamas en algunas xerofitas, decurrentes o a veces auriculadas, estipuladas. La inflorescencia primaria es indeterminada, un capítulo de pocas flores con o sin brácteas, éstas a menudo cascarudas y escariosas, deciduas o persistentes. El receptáculo puede ser de formas variadas; aplanado, en forma cóncava, convexa, y cónico o columnar, y encerrado por una o más series de brácteas distintas o connato variado; las flores bisexuales y unisexuales (las plantas monoicas,

algunas veces dioicas). El cáliz se considera generalmente representado por un papo (cáliz reducido altamente modificado), en apariencia ausente, el papo muy diverso en su forma y tipo; la corola gamopetalosa y derivada por la unión congénita de 5 pétalos, representada por uno de los siguientes tipos:

a) Corola tubular o discoide: 5 lóbulos con un tubo conspicuo y comunmente una rama corta.

b) Corola ligulada o en rayos: con 3-5 dientes apicales y un tubo muy corto.

c) Corola bilabiada: modificación de una corola tubular y con 3 lóbulos (dentada) el labio superior y 2 labios inferiores delgados y curvos.

Las corolas liguladas o en rayos se restringen a la periferia de la cabeza radiada o pueden cubrir completamente el receptáculo (entonces la cabeza es ligulada). Cuando son periféricas, son neutras o pistiladas, cuando tienen una cabeza ligulada son comunmente bisexuales o unisexuales y las plantas dioicas; las corolas tubulares o discoides pueden ocupar completamente el receptáculo (entonces la cabeza es discoide) ó todo el receptáculo, excepto la periferia, y son comunmente bisexuales (algunas veces unisexuales y las plantas monoicas o dioicas); 5 estambres, epipetalosos, reproducción sexual (anteras coherentes a veces), las anteras

introrsas, de 2 células, que se abren en forma longitudinal, formando un cilindro alrededor del estilo, a menudo con varios apéndices en el ápice o en la base del saco de la antera, los filamentos son distintos y enrollados; un pistilo, el ovario inferior unilocular, con un solo óvulo basal anatraposo, 2 carpelos y un estilo delgado, usualmente en dos ramas o las ramas bífidas, 2 estigmas, las superficies a menudo muy restringidas, de varias formas; el fruto seco, no se abre, puede que esté comprimido, coronado o accesorio con cualquiera de una gran variedad de tipos de papo persistente o deciduo, ó sin papo, algunas veces envuelto por una bráctea persistente; la semilla con un embrión grande recto y sin endosperma. (30).

2. Género Tagetes:

Es un género diverso compuesto por especies de olores muy fuertes, algunas de las cuales son conocidas como "maravillas". Se extienden desde el sudoeste de los Estados Unidos hasta Argentina, y el área donde hay gran diversidad es en el centro y sur de México.

Algunas especies han quedado establecidas en la horticultura y hay evidencia de su cultivo y uso extensivo por las tribus indígenas mexicanas y de Sudamérica desde mucho tiempo antes de la llegada de los conquistadores. Los indígenas precolombinos

creían que muchas de las "maravillas" mas aromáticas tenían propiedades mágicas y de salvar vidas. De hecho, estas plantas, ya sea de fuentes cultivadas o no, tenían gran variedad de usos religiosos y mundanos. (35).

Las "maravillas" están entre las plantas más comunes a la orilla de los caminos de Guatemala en el otoño. Hay gran controversia acerca de donde se originó Tagetes. Todas las regiones donde se encuentra tienen ciudades que hace mucho tiempo fueron puertos para barcos españoles: el este de la India, el norte de Africa, Portugal, Centro América y también España. Una razón para la confusión ha sido que en todas estas áreas hay ritos religiosos muy antiguos en los cuales se usa Tagetes. El botánico alemán Leonhard Fuchs que nombró este género en el siglo XVI, dijo que el lugar de origen era el Nuevo Mundo, este nombre fue luego adoptado por Linneo. Dos puntos que soportan esta aseveración son el hecho que las especies de Tagetes se muestran en esculturas mayas hechas en los días grandes de esas civilizaciones (1000 A.C.) y que aquí se le dio un nombre indígena ("cempoalxochitl" en azteca). (8).

Estas plantas son muy usadas en los ritos indígenas del Día de los Santos y el de los Muertos. Esto es lo que queda de su uso precolombino referi-

do a rituales. (8). Aunque estas celebraciones son parte del calendario religioso católico, las costumbres se deben al sincretismo con la religión indígena. Aunque muchos indígenas aún las emplean de modo similar que sus ancestros, la educación y el efecto de ésta sobre la superstición ha disminuido notablemente su uso en la actualidad. (35).

A casi todas las especies mexicanas de Tagetes se les ha dado un uso "práctico". Las partes de la planta más útiles son la cabeza de las flores y las hojas, estas 2 partes tienen grandes cantidades de glándulas que son la fuente de los aceites, ésteres y fenoles. Las infusiones (reposo en agua caliente sin que ésta hierva) y cocciones (con ebullición) se hacen de las partes de la planta, se elaboran cataplasmas de las hojas y en algunos casos ésta se pulveriza entera. (35).

Los usos medicinales reportados se pueden dividir en categorías generales:

a) Analgésicos
b) Antisépticos
c) Antiespasmódicos
d) Carminativos
e) Diuréticos
f) Expelentes
g) Estimulantes
h) Vermífugos
i) Repelentes

Los atributos mágicos que se dan a estas plantas son evidentes. Rose reportó en 1899 que Tagetes lúcida era una de las plantas medicinales más usadas en el oeste de México. (35).

3. Tagetes lúcida:

El nombre "pericón" está bien establecido en Guatemala, hay aldeas que llevan el nombre de "El Pericón" en El Quiché y Huehuetenango. Se le conoce como "liyá" en Totonicapán y en Quezaltenango como "Hierba de San Juan". (34).

El nombre más común que se le ha dado a T. lúcida en México es "pericón", que significa que éste se adapta para todos los usos. Otros nombres que se le da son Cravo de defunto, curucumín (en Michoacán), flor de Santa María, flor de tierra dentro, guía laga zaa, hierbanis, hierba de San Juan, hierba de Santa María, hipericón, iya, jolomocox, liya, pericón, pericón amarillo, periquillo, Santa María, Sweet Mace (en horticultura), tumutsali, uca, hierba nil, hierbanis, anisillo (en el valle de México), hierba anís (en San Luis Potosí). (10), (31), (32), (33).

En su mayoría se encuentra en campos abiertos, en bosques de cedro y algunas veces en laderas de colinas rocosas secas; a una altura entre 1,000 y 2,000 m. Se ha reportado que existe en Petén,

Jalapa, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, El Quiché, Huehuetenango, San Marcos, México (34) [es abundante en los estados de Nayarit y Jalisco, México, Veracruz, Hidalgo, Michoacán, Durango, Chihuahua, Zacatecas y el valle de México (31)], El Salvador y Honduras. (34).

La planta crece en forma abundante durante los meses húmedos pero escasamente en cuanto paran las lluvias. No florean durante la estación seca, empiezan a hacerlo en julio y hay mayor abundancia de flores en octubre. Según los indígenas, la planta debe cortarse antes del 24 de junio, Día de San Juan, porque después de ese día les entra el demonio. (34). En muchas comunidades en México, se celebra la "Fiesta del Pericón" el 28 y 29 de septiembre, cuando éste se encuentra en el pico máximo de su ciclo de floración, el primer día, las mujeres y los niños recolectan la planta.

En los mercados públicos de muchas partes de América Latina pueden adquirirse pequeños manojos de T. lúcida. Los indígenas colectan las plantas enteras, las empacan, secan y las guardan para ser empleadas posteriormente. Luego preparan un té para tratamiento de picaduras de alacrán, fiebre y malaria, también es usado como afrodisíaco. El té, de sabor dulce y olor similar al del anís, es una bebida refrescante y sabrosa y se ha demostrado algunas de las propiedades que le son atribuidas.

(35). Esta planta tiene gran reputación como remedio para desórdenes digestivos. Se usan los tallos secos para preparar té cuando hay problemas serios del estómago o los intestinos. (34).

En los antiguos ritos aztecas, T. lúcida no faltaba en las ceremonias, pulverizándola, y tirándo este polvo a las caras de los prisioneros de guerra para embotar sus sentidos antes de ser quemados en una gran hoguera, pues le atribuían a la planta efectos anestésicos. (35).

Los Huicholes de México fuman una mezcla de Nicotiana rustica (tabaco) y Tagetes lúcida para provocarse visiones. Se mezcla con tabaco porque dicen que reduce la aspereza del mismo, facilita inhalaciones profundas y la intoxicación; ésta intoxicación se caracteriza porque se muestran quietos, se acuestan y pasan períodos muy frecuentes con los ojos cerrados. (40). Frecuentemente beben el "tesguino" o "cai" de maíz fermentado, a la vez que fuman "para producirse visiones más claras". Tagetes lucida ocasionalmente se fuma sola para obtener efectos alucinógenos. (12).

Tagetes lúcida se ha usado por mucho tiempo en la purificación ritual para limpiar el aire. (11). En el contexto religioso se le conoce como "hierba de la Virgen María". La fragancia es adecuada para mezclarla con licor o chocolate, En la corte de

Montezuma era uno de los aditivos de su bebida ritual del cacao. (10). Las cabezuelas y hojas se emplean para aromatizar los elotes, poniéndolas en el agua donde éstos se cuecen. (32). Es difícil afirmar o negar los reportes de que esta planta es efectiva como narcótico, porque éstos son muy variados y los análisis químicos están incompletos. (10).

En la actualidad, T. lúcida se quema frecuentemente en los ritos religiosos y en el hogar, en lugar de incienso. Es un material ideal porque es fácilmente disponible, barato y tiene un olor muy agradable. (35). Las cabezuelas y hojas son usadas para aromatizar el agua con que se baña a los niños y para aliviar el reumatismo. (31), (32). En infusión, para curar los dolores del vientre que revisten aspecto de cólicos y vienen acompañados de meteorismo. Se quema para ahuyentar los mosquitos. (32). También se usan con este propósito las hojas secas pulverizadas, así también como remedio para la malaria y otras enfermedades. (34).

En Nayarit usan el cocimiento de este vegetal contra el paludismo, pero en el Instituto Médico Nacional de México se experimentó como antipalúdico y antidiarreico con resultados negativos. (32).

En la Tabla #1 se encuentran los distintos usos que se le dan a Tagetes lúcida, la evaluación vulgar y farmacológica, la vía de administración y

la parte de la planta usada. (9).

CLAVE:

Uso Vulgar (V):

Ø) No hay información.

1) Uso reportado en varias regiones.

   Referencias independientes del uso.

   Observación directa por persona calificada.

   Autoexperiencia.

2) Identificación de persona o lugares.

   Observación directa por persona no calificada.

   Información oral de un observador directo o un curandero.

3) Información oral de terceras personas.

   Revision.

   Dicho popular.

   Anónimo.

Evaluación Farmacológica (F):

Ø) No hay información.

1) Se confirma en preparaciones animales el uso farmacológico.

2) No se confirma el uso en una preparación animal adecuada.

3) Se presenta una acción farmacológica diferente del uso vulgar o de efectos clinicos.

NHI = no hay información.

PE = planta entera.

Tabla #1.

Uso	Evaluación F	Evaluación V	Vía de Administracion	Parte Usada
Afrodisiaco	Ø	2	Oral	Hoja
Anticatarral	Ø	3	"	PE
Antidisentérico	2	3	"	"
Antidoto	Ø	3	NHI	"
Antiespasmódico	Ø	2	Oral	Hoja,flor
Antipalúdico	Ø	2	Local	" , PE
Antiparasitario	Ø	3	NHI	NHI
Antipirético	Ø	3	Oral	PE
Antiséptico	Ø	3	NHI	NHI
Antitumoral	Ø	3	"	"
Antitusigeno	Ø	3	"	PE
Aperitivo	Ø	3	"	NHI
Arroja cálculos	Ø	3	"	"
Caquexia	Ø	2	Oral	Hoja
Carminativo	Ø	2	"	" ,flor PE
Cefalalgias	Ø	3	NHI	PE
Cicatricial y regenerativo	Ø	3	"	"
Dermatosis	Ø	3	Oral	"
Diaforético	Ø	2	"	Hoja
Diurético	Ø	2	" ,varios	" , PE
Emenágogo	Ø	2	" , "	" , "
Emético	Ø	2	"	"
Estimulante	Ø	3	NHI	NHI
Galactógeno	Ø	3	"	PE
Gastroenteritis	Ø	2	Oral	Hoja,flor
Humores	Ø	3	NHI	NHI
Insecticida	Ø	3	"	"
Locura	Ø	3	"	PE
Oxitócico	Ø	3	Varios	"
Pectoral	Ø	3	NHI	"
Refrescante	Ø	3	"	"
Relajante	Ø	2	Oral	Hoja
Resolutivo	Ø	3	NHI	NHI
Esputo de sangre	Ø	3	Oral	"

B. ANALISIS FITOQUIMICO DE LAS ESPECIES DEL GENERO Tagetes:

En las especies del género Tagetes se han

encontrado diversidad de compuestos. En general contiene grasa, tres resinas ácidas, esencia, clorofila, caucho, ácido gálico, tanino, glucosa, dextrina, materias pécticas, un cuerpo con algunas reacciones de alcaloides, sustancias leñosas y sales minerales. (32). No se han aislado alcaloides de Tagetes, sin embargo, el género es rico en aceites esenciales y derivados del tiofeno, tales como el 1-inositol. (11). En un ensayo microbiológico de fototoxicidad de materiales de plantas, se reportó que el aqueno de las maravillas, de la familia Compositae, producía fototoxicidad, dando como resultado una zona clara de inhibición del crecimiento de Candida albicans, después de una prolongada irradiación UV. Gran número de otras especies de Compositae son fototóxicas hacia Candida. Se han aislado derivados de tiofeno de especies de Tagetes, incluyendo T. erecta, T. minuta y T. patula. De los pétalos de T. erecta se aisló un compuesto que fluoresce en un azul intenso y se identificó como alfa-tertienil. Luego se encontró que las raíces de Tagetes eran fuente importante de alfa-tertienil. Este compuesto posee propiedades nematocidas, que también tiene otro compuesto de las raíces de Tagetes, es el 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil. Desde entonces se han aislado muchos otros derivados de tiofeno de éste género. (5). De estos

derivados de azufre, se sabe que son de ocurrencia muy elevada en ciertos géneros de la familia Compositae y que son letales a bacterias, levaduras y otros hongos, nemátodos y peces. (6).

La distribución y cambios ontogénicos en cuatro tiofenos biosintéticamente relacionados de T. patula cultivada en medios hidropónicos se investigó usando HPLC en fase reversa. Se identificó cuatro tiofenos de todas las partes de la planta:

1. 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2' bitienil.
   5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2' bitienil.
2. 5-(3-buten-1-inil)-2,2' bitienil.
3. 2,2':5'2"-tertienil.

sus concentraciones relativas varían entre la raíz, tallos y flores. 5-(3-buten-1-inil)-2,2' bitienil predomina en raíces y 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2' bitienil y 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2' bitienil son los derivados predominantes en tallos. Las flores contienen 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2' bitienil, 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2' bitienil y 2,2':5'5"-tertienil, y así como otros compuestos no identificados, con espectros de absorción UV característicos de los tiofenos. La concentración de 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2' bitienil, 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2' bitienil y 5-(3-buten-1-inil)-2,2' bitienil en las raíces y de 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2' bitienil y de 5-(4-acetoxi-1-butinil)-

2,2' bitienil en los tallos aumenta durante la vida de la planta, pero sus concentraciones se estabilizan después de la floración. La presencia de estos cuatro tiofenos en otros miembros de Tagetes se examinó, encontrando que se presentan algunos o todos en 9 especies del género.

Especialmente buenas para cultivarlas son T. erecta y T. patula. Las hojas y flores contienen flavonoides activos, especialmente patuletina y patuliterina en T. patula, y quercetagitrina en variedades de T. erecta. El contenido de flavonoides de las distintas especies de Tagetes es de 5-20%. (29).

T. filifolia muestra un aceite volátil de olor de anís, que contiene d-limoneno, citral, un aldehído no identificado y posiblemente tagetona. T. minuta presenta oxineno, tagetona y un producto resinificado de dimetiloctenona. Y T. erecta tiene d-limoneno (32.0%), oxineno (25.6%), l-linalil acetato (12.7%), l-linalool (9.8%), tagetona (62%) y nonanal (2.4%). (2).

También se ha establecido la presencia de helenina y sus derivados en flores de Tagetes. (7).

El aceite volátil de Tagetes filifolia contiene mas de 95% de un compuesto que ha sido identificado como esdragol. (2).

Las cumarinas, que también se encuentran presentes en algunos miembros de esta familia

pueden tener efectos tóxicos en los microorganismos y algunas tienen propiedades insecticidas. (39).

Guzmán, N. (15), en su estudio del género Tagetes hace un análisis en el que presenta los compuestos encontrados en este género, en él se menciona que: "Rodriguez, E. y Mabry, T. (16) hacen un listado de los componentes volátiles en el género Tagetes, hallados hasta ese momento, que incluye monoterpenos, aromáticos y sesquiterpenos:

Tabla #2: Constituyentes volátiles de Tagetes. (17).

CLAVE:

erec: T. erecta

sign: T. signata

gland: T. glandulifera

fili: T. filifolia

flori: T. florida

minu: T. minuta

patu: T. patula

Compuestos	erec	sign	gland	fili	flori	minu	patu
Monoterpenos							
Aciclicos							
tagetona	X	X	X	X		X	X
linalool	X					X	X
ecimeno	X	X				X	
citral				X		X	
mirceno						X	
Monociclicos							
limoneno	X	X		X		X	X
∝-felandreno						X	
p-cimeno						X	
timol							
carvona						X	
∝-terpineol		X				X	
Biciclicos							
∝-pineno						X	
ß-pineno						X	
canfeno						X	
sabineno						X	
1,8-cineol							
Δ^3 -careno							
Δ^3 -careno-10-al							
tujona							
Sesquiterpenos							
eudesmol		X				X	
aromandreno		X				X	
Aromáticos							
esdragol				X	X		
eudesmol					X		
cuminaldehido							
benzaldehido							

Asimismo reportan estudios de la presencia de triterpenos y esteroles, contándose con la información que la única especie estudiada es Tagetes cv. Sen. Dirksen, encontrándose eritrodiol monopalmitato en las flores, así como los esteroles estigmasterol y sistosterol. Dentro de los carotenoides mencionados para el género, los más abundantes en las flores son las xantofilas. Reproducen también una lista de 17 carotenoides encontrados en flores

secas de T. erecta y T. patula, de los cuales los mayoritarios son la luteína y la zeaxantina,(24) como se ve en la Tabla #3.

Tabla #3: Porcentajes relativos de distribución de carotenoides en pétalos de margarita de diferentes fuentes. (18).

Carotenoides	T. erecta (Americ.)		T. patula (Fran.)		T. patula (Mex.)
	R	A	R	A	
Fitoeno	1.9	2.4	1.9	2.9	3.1
Fitoflueno	2.3	2.6	2.9	1.9	2.0
α-caroteno	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
β-caroteno	0.3	0.5	0.6	0.3	0.3
β-zeacaroteno	0.4	0.5	0.8	0.3	0.2
ζ-caroteno	0.1	-	0.1	-	-
α-criptoxantina	0.7	0.8	0.6	0.1	0.2
Zeinoxantina	-	-	0.4	0.7	0.8
Isocriptoxantina	-	-	0.1	0.1	0.1
β-criptoxantina	0.4	0.5	0.4	0.8	0.4
Luteína	87.3	72.3	85.5	87.3	88.0
Anteraxantina	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
Zeaxantina	4.0	16.4	4.1	4.0	3.6
Neoxantina	0.2	0.8	0.2	0.1	0.1
Crisantemaxantina	0.3	0.8	0.2	0.2	0.2
Flavoxantina	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
Auroxantina	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

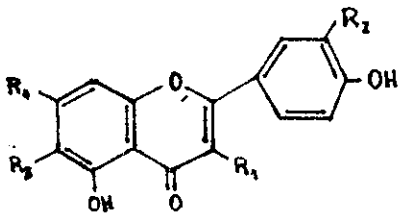
La identificación de pigmentos que constituyen el 1% del total fue realizada sobre la base de los espectros de absorción y las pruebas del HCl etanólico. El cálculo de los valores en porcentaje fue basado en la adsorbancia de las fracciones cromatográficas con la suma de las fracciones individuales considerada como el 100%. (19).

Con respecto a flavonoides, reportan que el queracetagetin es el pigmento mayoritario en el género Tagetes, un flavonol primeramente aislado de T. erecta. También incluyen datos por especies. (19).

Tabla #4: Flavonoides y otros compuestos fenólicos. (16).

Compuesto	T.erecta L	T.patula L	T.minuta L
quercetagetina	X		
quercetagetina 7-O-glucósido (Quercetagetrina)	X	X	X
quercetagetina 3-O-glucósido (tagetiina)	X		
quercetagetina 3-O-dirhamnósido	X		
quercetagetina 3-metileter 7-O-glucósido (patuletrina)		X	X
quercetagetina 6-metileter		X	

SIENDO:



Compuestos	R_1	R_2	R_3	R_4
Quercetagetina	OH	OH	OH	OH
Tagetiina	OGlc	OH	OH	OH
	ORha	ORhaOH	OH	OH
Patuletina	OH	OH	OMe	OH
Patuletrina	OH	OH	OMe	OGlc
Quercetagetrina	OH	OH	OH	OGlc

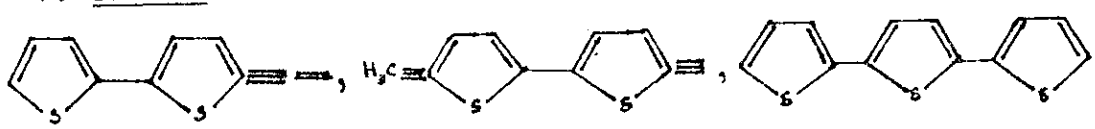
En T.minuta se encontró los ésteres monometílico de los ácidos fumárico y siríngico. En T. patula se ha reportado el ácido elágico. (20).

Respecto de poliacetilenos, se han estudiado los tiofenos; se reproducen los resultados de Bohlman et al (1973) en extractos de raíces. A continuación se presenta la Tabla #5 en la cual se revisan los tiofenos presentes en Tagetes. Un estudio sobre estos compuestos fue realizado por Guzmán, N. (15).

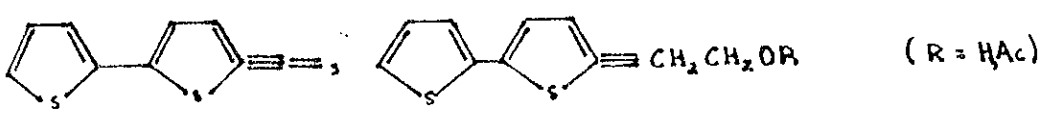
Tabla #5: Tiofenos en Tagetes. (21).

Especie	Constituyentes de la raiz

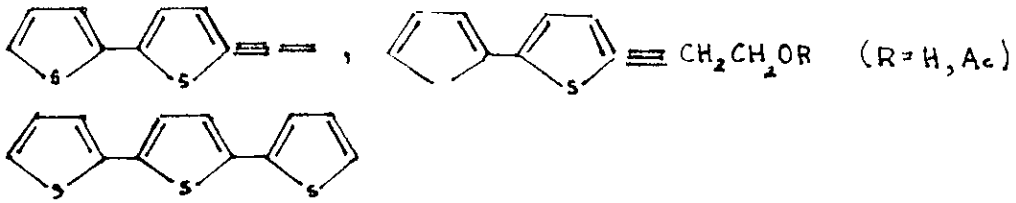
T. erecta L.



T. glandulifera Schrank

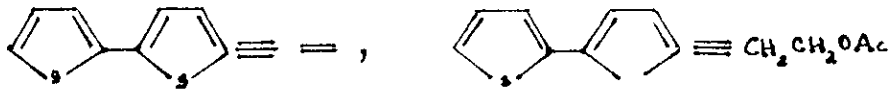


T. lúcida Cav.



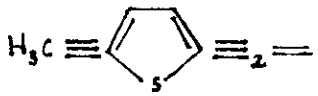
T. indica = T. lúcida Cav.

T. minuta

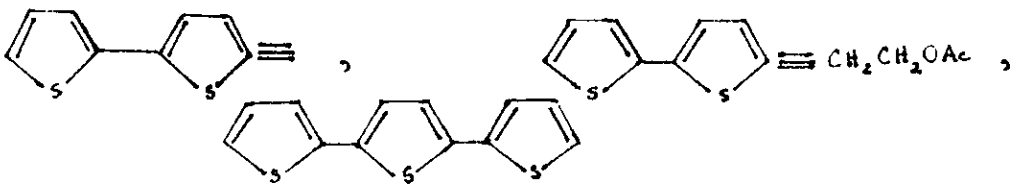


T. tenuifolia H.B.K. = T. minuta

T. pauciloba DC.



T. patula L.



T. signata Bortl. = T. patula

Los ácidos grasos láurico, mirístico, palmítico y oleico se encontraron en T. erecta. En T. sv. "Sen Driksen" se encontró 3-β-palmitoxi-olea-12-en-28-ol y ácido palmítico. (20).

Para alcaloides, reportan que Smolenski y colaboradores (1972-1973) obtuvieron pruebas negativas

en T. jaliscana Greenman, T. lúcida Cav. y T. parri Gray. (20).

Ortiz, S. menciona que en las referencias consultadas por él, en trabajos anteriores, sólo se reportan la presencia de flavonoides, flavonas y glúcidos en el género Tagetes. (36).

Ickes G.R. y colaboradores (1973) (20), citan la referencia de Unlenbrook J.H., Bijloo J.D. (1958) y de Atkinson R.E.; quienes mencionan la presencia de los tiofenos siguientes en especímenes de T. minuta:

5-(3-buten-1-inil)-2-'-bitienilo.

α-tertienilo

5-(but-1-cloro-2-ol-3-inil)-2,2-bitienilo

cis-5-(1-acetoxi-but-3-enil)-2,2'-bitienilo

5-(but-1-en-3-inil)-2,2'-bitienilo

5-(4-cloro-3-hidroxi-but-1-inil)-2,2'-bitienilo

5-(but-1-in-4-olil)-2,2'-bitienilo

así como de los terpenos esdragol y α-dimetil-Δ^{α}-octen-6-ona además de los listados por Rodríguez, E. y Mabry, T. (1977). (22).

Khanna, Pushpa; Sharma, Raka y Khanna Ranu (1975) reportan la presencia de seis piretrinas en semillas, cabezas florales y cultivos en suspensión de T. erecta. (22).

Philip, T. y Bery, J.W. (1976) reportan en extractos de T.erecta la presencia de ésteres de luteína como dipalmitato de luteína, dimiristato y

monomiristato de luteína. (22).

Jain, Satish C. (1977) reportan la presencia de patuletrina y queracetagitrina así como algunas isopiretrinas en T. minuta y Kamal Raka (1977) aisló piretrinas de cabezas florales de T. erecta. (22).

Maradufu A. y colaboradores (1978), aislaron (5-E)-ocimenona de hojas y flores frescas de T. minuta L. y demostraron que posee propiedades larvicidas al emplear 40 ppm produciendo 100% de mortalidad en Aedes aegypti en un lapso de veinticuatro horas. (22).

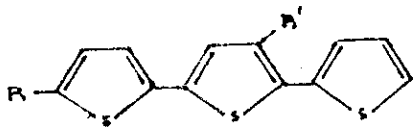
Castro A.V. y Castro C.O. (1978) encontraron el esteroide poriferasterol y dos derivados del tiofeno, siendo éstos el α-tertienilo y el derivado carbinólicoditienil acetileno en extractos de raíces de T. microglosa. (22).

Bohlmann, F. y Zdero, C. (1978) en un análisis de la tribu Tageteae reportan varios terpenos y derivados del tiofeno. Asimismo reportan por primera vez la presencia de dos dicetonas, la Bis-trans-ocimenona y la 14,15,-H-Bis-trans-ocimenona. (22).

Tabla #6: Especies estudiadas de la Tribu Tageteae. (23).

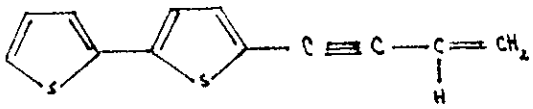
Especie	Raiz	Hojas
T. gracilis DC	1,3,4,5	1,2,3,5,9,11,16,17
T. terniflorae HBK	3,4,5	3,9
T. zypaquirensis H et B		3,9,11
T. patula L		1,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15

Siendo:

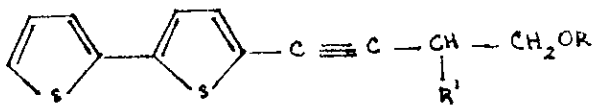


(1) R = R' = H

(2) R = R' = H

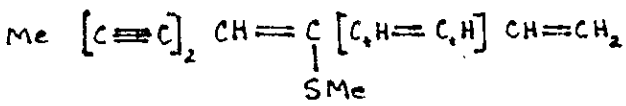


(3)

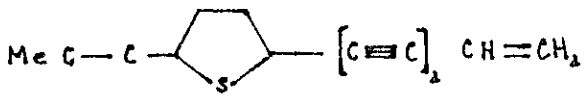


(4) R = R' = H

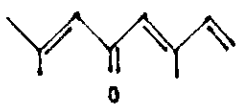
(5) R = Ac
R' = H



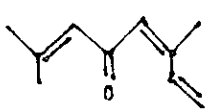
(6)



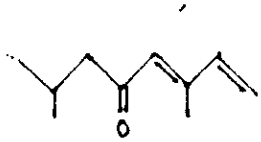
(7)



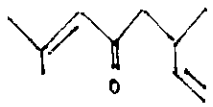
(8)



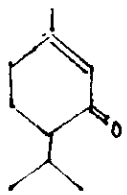
(9)



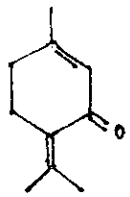
(10)



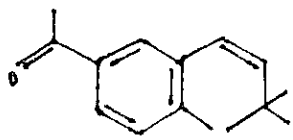
(11)



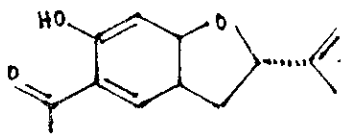
(12)



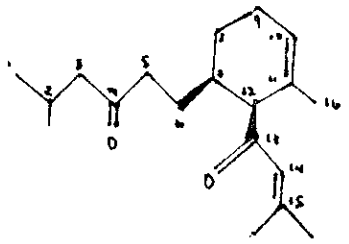
(13)



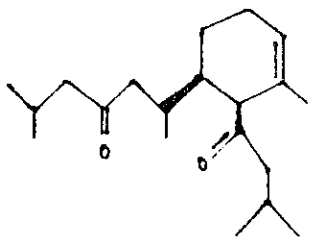
(14)



(15)



(16)



(17)

Chan G.F.Q. y colaboradores (1979) identificaron α-tertienilo y 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo en extractos alcohólicos de raíces de algunas especies del género Tagetes, confirmando su identidad por cromatografía y medios espectrales. Algunas de estas raíces resultan fototóxicos (al ser expuestas a luz UV) para C. albicans lo que sería explicable por la presencia de dichos compuestos. (6).

Bhardwaj D.K. y colaboradores, aislaron alopatuletina, una nueva flavona, de pétalos de T. pátula siendo determinada su estructura por análisis químicos y espectral. (22).

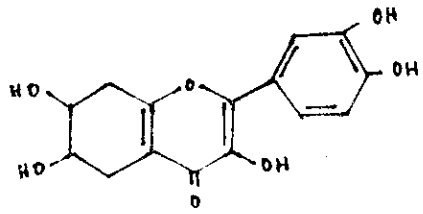


Figura #1: Alopatuletina. (22).

Kaloshina N.A. y colaboradores (1980), (29), extrajeron patuletina de inflorescencias de T. patula, por extracción con alcohol diluído, siendo absorbidos los extractos, sucesivamente, sobre acetato ftalato de celulosa y poliamida, luego eluidos con mezclas de butanol-cloroformo 1:4, y cromatografiados. La patuletina presenta acción colagógica. (24).

Kaloshina, N.A. (1980) reporta los siguientes flavonoides activos en especies de Tagetes:

T. patula: Patuletin, patuliterin.

T. erecta: Quercetagetin y quercetagitrin.

Reportan un contenido de flavonoides de varias especies de Tagetes del 5 al 20%. (24).

Baslas R.K. y Singh A.K. (1980) obtuvieron aceite esencial amarillo pálido y naranja de hojas y flores de T. erecta encontrando α-pineno, β-pineno, dipenteno, mentol, geraniol, y otros terpenos por métodos cromatográficos. (24).

Posteriormente Baslas y Singh (1981) reportan como terpenos mayoritarios en T. erecta Linn el linalool, d-limoneneno, tagetona, β-ocimeno, β-felandreno, acetato de linalilo, α-pineno y

nonanal. (25). También reportan (1981) como constituyentes mayoritarios para T. minuta Linn el aromandreno, ocimeno, -mirceno, y tagetona. (25). Castro O. & Muñoz L. (1982) separaron en identificaron los siguientes derivados del tiofeno en extractos etéreos de raíces de T. jalisciencis, presentando ambos actividad nematicida contra Meloidogyne incognita, en la luz:

2,2':5',2":-tertienilo ó ∝-tertienil, y

5-(3-buten-1-inil-)-2-2'-ditienilo. (25).

Tower G.H.N. y Downum K.R. (1983), examinaron la distribución por HPLC en fase reversa y cambios ontogenéticos de los siguientes cuatro tiofenos en varias especies del género Tagetes (25) siendo estos los que se indican en la tabla #7:

Tabla #7: Tiofenos en Tagetes, (26).

Especie	Compuestos			
	1	2	3	4
T. coronopifolia willd	X	X	X	X
T. erecta L	X	X	X	X
T. filifolia A. Gray		X		
T. lemonii A. Gray	X	X	X	X
T. lunuta Ort.		X	X	X
T. minuta L	X	X	X	X
T. multiflora H.B.K.			X	X
T. patula L	X	X	X	X
T. tenuifolia Cav.	X		X	X

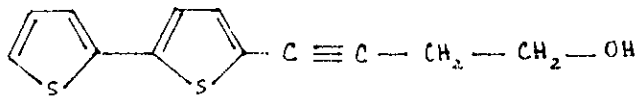
Siendo:

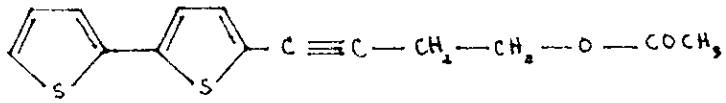
(1) 5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo

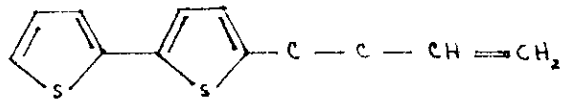
(2) 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo

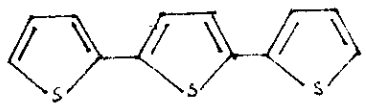
(3) 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo

(4) 2,2':5'2"-tertienilo

(1) 

(2) 

(3) 

(4) 

C. ANALISIS FITOQUIMICO DE LA ESPECIE Tagetes lúcida Cav.:

Martínez, M. (1959), (31), Ida Kaplan Lagman (1964), Quentin Jones y F.R. Earle, lograron reacciones positivas para alcaloides y taninos. (24).

Además, Guzmán, A. y Manjarrez, A. (1962) (24), quienes, mediante el uso de la cromatografía gaseosa, obtuvieron cuatro fracciones diferentes a partir de aceite esencial obtenido por arrastre con vapor de material vegetal, sin raíz y colectado en los meses de octubre y diciembre. De las cuatro fracciones obtenidas, únicamente dos de ellas fueron identificadas positivamente. Las sustancias identificadas fueron el esdragol (4-propenil,-1-metoxi-benceno), y el éter metílico del eugenol (4-propenil,-1,2-dimetoxi-benceno), negaron la presencia de compuestos carbonilos como la tagetona (5,7-octadien-4-ona-2,6-dimetil) por la ausencia de bandas de absorción IR en el espectro del aceite esencial. (27). Por cromatografía en capa fina preparativa de material recolectado en los meses de Julio-Agosto, Ortiz, S. aisló uno de los compuestos carbonilos cuyo espectro IR sugirió la presencia de una cetona insaturada de isomería trans, posiblemente la -7-octen-4-ona 2,6 dimetil o dihidrotagetona (36); y hace notar que este

resultado no es contradictorio: "Es de hacer notar que la época de recolección de la planta influye mucho en los resultados, ya que el estudio de Tagetes lucida hecho en México, por A. Guzmán y A. Manjarrez no se encontró la presencia de compuestos carbonilos, y la época de recolección fue de Octubre-Diciembre."

Rodríguez E. y Mabry T. (1977) (28), reproducen un listado de tiofenos encontrados en 9 taxas de Tagetes en extractos de raíz por Bohlman et al (1973) donde para T. lúcida Cav. reportan la presencia de:

5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo

5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo

5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo

2,2':5',?"-tertienilo

Ríos T. y Flores R.M. (1976). (28) aislaron de T. florida (sinónimo de T. lúcida Cav.) e identificaron por sus espectro IR y RMN cuatro compuestos cuyas estructuras coinciden con la 7-metoxicoumarina, 6,7-dimetoxicoumarina, 6,7,8 trimetoxicoumarina y 7-hidroxicoumarina éter dimetilalílico.

Posteriormente, Ortiz, S. (1977) obtuvo aceite esencial de material vegetal seco y molido, colectado en el mes de agosto, por extracción contínua, empleando éter de petróleo como disolvente extractor. Luego, aisló otro compuesto que por el análisis, tanto de los espectros IR como de NMR,

sugieren la presencia de la N-fenilacetamida, coincidiendo estos resultados con el espectro de masa del compuesto. (36).

Finalmente, Guzmán, N, (1987) (15) mediante el uso de cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masas y análisis por computadora logró determinar la presencia de tres éteres aromáticos:

1-metoxi-4-(2-propenil)-benceno (alil-anisol)

1-metoxi-4-(1-propenil)-benceno (anetol)

1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-benceno,

dos cumarinas:

7-metoxi-cumarina

éter dimetilalílico de la 7-hidroxicumarina ó 7-isopren-oxi-cumarina, y

un alcohol monoterpénico acíclico:

linalool ó 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol.

Teniendo el respaldo del espectro de masas y el tiempo de retención de los patrones, como criterio de identificación, para los cuatro primeros componentes; para el quinto componente, éste presenta termolabilidad y además no se contaba con linalool como patrón para chequear su tiempo de retención, por lo que el espectro de masas es el único medio para la identificación de éstos dos compuestos. (15).

En 1987, Ortiz, S.D. (37), logró el aislamiento

y elucidación estructural del principio activo antiespasmódico en el extracto de n-hexano de Tagetes lucida, siendo éste la 7-metoxicumarina, comprobada su acción espasmolítica por estudios farmacológicos.

E. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA:

La actividad antimicrobiana de una sustancia puede definirse como la habilidad de esa sustancia para inhibir o matar un microorganismo. Aunque el modo de acción dela mayoría de sustancias antimicrobianas es desconocido, en algunos casos, se sabe que se debe a distintos factores, tales como inhibición de síntesis de proteinas, inhibición de la formación de DNA o RNA, prevención de la división celular, destrucción de la selectividad de la membrana celular, etc. (3).

La susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos puede ser medida utilizando los principios de difusión de agar y el método de dilucion a partir de la concentración inhibitoria mínima.

La prueba de dilución es un método esencialmente cuantitativo de susceptibilidad antimicrobiana, está influenciada por el crecimiento de los microorganismos y por el grado de difusión del antimicrobiano. El hallazgo más frecuente es la obtención cuantitativa de la susceptibilidad basada en dosis de drogas y niveles séricos adecuados, en los cuales se hace poco aplicable la prueba de difusión.

La prueba de difusión es el procedimiento más utilizado y sencillo en su aplicación, esencialmente cualitativo y es aplicado para microorganismos,

principalmente del género Enterobacteraceae, Staphylococcus, Haemophylus, Neisseria y algunos otros microorganismos. Esta prueba posee algunas deficiencias como no dar una interpretación cuantitativa y que es inaplicable para organismos de crecimiento lento y para anaerobios.

Este método comunmente usado para probar la actividad de un compuesto contra una bacteria se realiza colocando un disco de papel filtro saturado con la sustancia a ensayar, en la superficie de una caja de Petri con agar nutritivo sembrado con la bacteria. La sustancia se difundirá en el medio y después de la incubación; la ausencia de crecimiento bacteriano alrededor del disco indica la inhibición del crecimiento. El tamaño de la zona de inhibición dependerá de muchos factores: la concentración del compuesto, el pH del medio, la temperatura de incubación, la sensitividad del organismo, y la historia pasada del microorganismo, por mencionar unos cuantos. (3).

La técnica de difusión en agar, a la que daremos énfasis en el presente trabajo, generalmente clasifica la susceptibilidad a los microorganismos como resistentes, intermedios y susceptibles a cada antimicrobiano. Los organismos más susceptibles son los que presentan una zona más grande de inhibición, determinada en las primeras horas de in-

cubación.

Los antimicrobianos comerciales son aplicados a las placas de prueba en forma de disco de papel secante, previamente sometidos a refrigeración de 2 a 8@C para su conservación y mantenimiento. Al ser utilizados, deber ser sometidos a temperatura ambiental por 1 a 2 horas; el antimicrobiano se difunde obedeciendo ciertas leyes físicas como son la absorción de agua a partir del agar, disolviendo así la droga.

El Agar Mueller Hinton (AMH), es el medio estandar que mejor sostiene el crecimiento en la mayoría de microorganismos, utilizandose por tanto para la prueba de susceptibilidad. Algunos microorganismos requieren la adición de sangre desfibrinada, exceptuando para los Gram negativos; el pH del medio debe variar entre 7.2 y 7.4, el medio fresco es vertido en cajas de Petri a nivel de superficie horizontal y a una profundidad uniforme de 4 mm., lo cual requiere aproximadamente 60 ml. dependiendo del tamaño de la caja utilizada.

Después de llevarlo a la temperatura ambiente, debe ser guardado entre 2 y 8°C, envolviendo las cajas en material plástico para evitar la evaporación. Los medios no deben ser usados después de 7 días; al ser utilizados deben someterse a 35°C con tapaderas.

En el estudio de susceptibilidad bacteriana efectuado por Cano (1985) menciona que el pericón (T. lucida) fue la única planta de las estudiadas que presentó actividad inhibitoria contra las 5 cepas bacterianas con las que se probó (Shigella disenteriae, Shigella flexnerii, Salmonella typhi, Salmonella enteriditis y Escherichia coli), siendo mayor ante S. typhi con un halo de inhibición promedio de 13.2 mm de diámetro. Estudios elaborados in vivo mostraron su acción antiespasmódica. (4).

Tabla #8: Halos de inhibición de extracto metanólico de pericón. (4).

Bacteria	Halo de inhibición mm ± Dev. St. (*)
S. dysenteriae	12.8 ± 0.4
S. flexnerii	13.1 ± 0.8
S. typhi	13.2 ± 0.7
S. enteriditis	12.7 ± 0.7
E. coli (EP)	12.2 ± 0.4

(*) Diámetro promedio en 9 corridas de extracto metanólico.

Sisomicina 19 mm (promedio)

Trimetroprim sulfametoxasol 20 mm (promedio)

Norfloxacina 20 mm (promedio)

OBJETIVOS

Es posible aislar un compuesto orgánico en el extracto alcohólico de Tagetes lucida cav. con efectos antibióticos. Este compuesto orgánico puede aislarse mediante distintas técnicas cromatográficas.

Generales:

1. Lograr la separación del principio activo presente en el extracto alcohólico de Tagetes lucida cav. que presenta propiedades antibióticas.
2. Llegar a identificar los grupos funcionales presentes en ese compuesto.

Específicos:

1. Hacer uso de las técnicas cromatográficas para separar distintas fracciones de compuestos presentes en Tagetes lucida cav. e identificar entre ellas la que tiene propiedades antimicrobianas.
2. Determinar los grupos funcionales que presenta, intentar aislarlo y elucidar su estructura química mediante espectroscopía UV, IR y el uso de NMR.

ASPECTOS METODOLOGICOS Y RESULTADOS

A. Universo de Trabajo:

a) Hojas, flores y tallos de Tagetes lucida.

b) Cepas bacterianas (ATCC) de Escherichia coli, Staphilococcus aureus y Pseudomona aureuginosa, y cepa del hongo Candida albicans.

c) Antibiótico de referencia: discos impregnados con Trimetropim.

B. Procedimiento:

a) Preparación de la planta:

El material vegetal originario de Cabricán, departamento de Quezaltenango (altitud 2625 mts. sobre el nivel medio del mar, Atlas Nacional de Guatemala), fue colectado en los meses de diciembre (1986) y enero (1987). Este ya seco fue molido finalmente.

b) Preparación de extractos metanólicos:

Se tomó 2 kilos del material, este se colocó en aparatos extractores tipo Soxhlet haciendo una extracción exhaustiva con metanol la cual se filtró con papel filtro hasta obtener una solución cristalina. Esta se guardó en frascos ámbar y luego se evaporó el solvente a presión reducida hasta obtener el sirupe del extracto.

c) Ensayo microbiológico:

Al sirupe obtenido, se le realizó un ensayo preliminar con el objeto de confirmar la actividad

antimicrobiana informada en estudios anteriores, esto se hizo para comprobar la presencia del principio activo antimicótico, usando la cepa de C albicans. Se realizó una prueba de difusión del extracto en gel del agar, fundamentada en la metodología, originalmente descrita por Bauer & Kirby. (4). Se preparó una solución que contenía 1 g de sirupe seco (habiendolo llevado a sequedad completa con nitrogeno gaseoso) en 1 ml de metanol (0.6948 g/0.69 ml). La prueba se describe a continuación:

1. PREPARACION DEL MEDIO:

i. Se autoclaveó el medio Muller-Hinton Agar -MHA- durante 15 minutos a 120°C;

ii. se dejó enfriar a 48-50°C;

iii. se colocó en cajas de Petri estériles (de plástico o vidrio) hasta obtener una profundidad de unos 4 mm;

iv. se dejó solidificar el medio y se mantuvo a temperatura ambiente lo suficiente para que se evaporara el exceso de humedad. El pH final de cada lote quedó entre 7.2 y 7.4 y se ajustó el pH antes de autoclavear, en caso necesario.

v. las cajas se utilizaron inmediatamente después de preparadas o bien, se dejaron adecuadamente selladas para evitar la deshidratación, antes de almacenar en refrigeración.

2. PREPARACION DEL INOCULO:

i. Utilizando un asa de anillo, se tomó cuatro o cinco colonias del organismo a ensayar, a partir de un cultivo puro o de la placa de aislamiento primario;

ii. se transfirieron las colonias a un tubo conteniendo de 3 a 5 ml. de caldo tripticasa soya;

iii. se incubó el tubo a 35°C lo suficiente (2-8hrs) hasta obtener una suspensión del microorganismo lo suficientemente turbia. Se diluyó el cultivo en caldo con solución salina estéril hasta obtener una turbidez equivalente a la del estándar # 0.5 de McFarland; (preparado con 0.5 ml. de $BaCl_2.2H_2O$ al 1.175% más 9.5 ml de H_2SO_4 0.36N). El estándar puede almacenarse a temperatura ambiente, en la oscuridad durante 6 meses o más, sellándolo cuidadosamente para evitar evaporaciones y teniendo cuidado de mezclarlo vigorosamente antes de usarlo. La turbidez fue controlada midiendo la transmitancia de dicho estándar y llevando la turbidez del cultivo transferido a la solución salina a dicha transmitancia.

3. INOCULACION DE LAS PLACAS:

i. Se introdujo un hisopo de algodón estéril dentro del inóculo previamente estandarizado;

ii. se retiró el hisopo sobre el nivel de fluido y se presionó rotándolo contra las paredes internas del tubo a fin de remover el exceso en el mayor

grado posible;

iii. la superficie del agar fue inoculada con el hisopo en tres direcciones;

iv. se dejó secar la placa por 3-5 minutos con la caja cerrada;

v. se colocaron los discos sobre el agar con pinzas estériles; presionando los discos suavemente sobre el agar, para asegurar el contacto;

vi. se incubaron las placas antes de transcurridos treinta minutos, a 35°C;

vii. las placas fueron leídas después de 16-24 hrs. de incubación.

4. MEDICION DE LAS ZONAS:

i. con la ayuda de un cuentacolonias (Quebec) se midió el tamaño de la zona de inhibición de crecimiento alrededor de cada disco. Se midió los diámetros de las zonas, incluyendo los 6 mm. del disco, con una regla colocada sobre la superficie externa trasera de la caja. Siguiendo la literatura consultada, una lectura de 8 mm. no significaba zona de inhibición.

Para el ensayo de los extractos metanólicos, se impregnaron discos estériles de papel filtro con 50 µl. del extracto preparado en una solución de concentración conocida y permitiendo la evaporación del solvente antes de colocarlos en las placas. En el caso de las bacterias se utilizó como referencia

el antibiótico Trimetroprim.

La Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima -MIC- se hizo utilizando la metodología de impregnación en disco y difusión en gel de agar, una vez confirmada la actividad antibacteriana de cada extracto ó fracción del mismo.

d) Separación cromatográfica de fracciones:

1. Cromatografía en capa fina:

El extracto fue sometido a varias separaciones cromatográficas (por cromatografía en capa fina, en placas de 2.5 x 5 cms., con medio estacionario de silicagel G-60 y fase móvil constituida por cinco (5) solventes de distinta polaridad: metanol, éter, cloroformo, benceno y n-hexano, el mejor eluyente fue escogido de acuerdo al número de manchas y la resolución obtenida en la separación de los compuestos presentes, estas placas fueron examinadas a la luz UV/VIS y en base a los resultados se decidió efectuar la primera separación con metanol. Los valores de Rf promedios, para los distintos solventes se muestran en la Tabla #9.

Tabla #9: Rf promedio de manchas obtenidas en la cromatografía en capa fina, para la selección de solvente eluyente adecuado del estracto metanólico de Tagetes lúcida.

SOLVENTE	Rf1	Rf2	Rf3	Rf4	Rf5
n-hexano	0.1094	0.25	0.344	0.406	---
benceno	0.047	0.141	0.438	0.906	---
cloroformo	0.081	0.113	0.226	0.306	0.903
eter	0.147	0.276	0.741	0.759	0.991
metanol	0.359	0.703	0.750	0.828	---

2. Cromatografía en Columna:

Se realizó la separación en columna empacada con silicagel G-60 de 70 a 230 mesh, usando como solvente eluyente metanol, dicha separación se efectuó en tres horas; las distintas fracciones obtenidas fueron llevadas a sequedad completa en coriente de nitrógeno, las fracciones correspondientes de 1 g de material fueron recuperados en 1 ml de metanol (las fracciones posteriores fueron etéreas, estas se habían llevado a sequedad y mostraron ser solubles en metanol ya que la extracción inicial se efectuó en dicho solvente). El uso de este solvente tiene la ventaja de no provocar problemas de volatilidad a la hora de impregnar los discos con los 50 µl agregados en porciones de 10 µl en 10 µl, dejando secar entre una y otra adición. Empleando estas soluciones discos estériles fueron impregnados con 50 µl cada

uno y colocados en las cajas previamente inoculadas con C. albicans. También se colocó un disco impregnado con solución de metoxi-cumarina, compuesto extraído de T. lúcida, (se tenía una muestra aislada e identificada por Ortiz, S.D. (37) como principio antiespasmódico de T. lúcida y se decidió comprobar si también tenía propiedades antimicrobianas). En la preparación de los discos de 7-metoxicumarina, se intentó hacer una solución de 1g/1ml, igual a las fracciones en estudio, pero resultó ser una solución saturada, para disolverla se realizó un calentamiento leve, pero al enfriarse se precipitó nuevamente, los discos fueron impregnados con el sobrenadante de la solución, notando que al quedar en el disco la solución y al evaporarse el solvente se veían los cristales en la superficie del papel). De este ensayo dieron resultado positivo las siguientes fracciones obtenidas mediante la cromatografía en columna con éter, como se ve en la Tabla #10:

Tabla #10: Resultados de las pruebas de las fracciones como antimicótico.

Fracción	Color	Concentración	Diámetro del halo inhib.
A	V. olivo	0.037g/100µl	13 mm
B	V. musgo	0.03g/100µl	14 mm
C	V. limón	0.07g/100µl	11 mm
metoxi cumarina	-------	Sol. Saturada	17 mm

El soporte de sílicagel utilizado para la separación en columna, descrita previamente, fue extraída nuevamente con metanol en Soxhlets para eliminar los compuestos adsorbidos en su superficie, éste se llevó a concentración de sirupe y se preparó una solución para la prueba antimicótica y realizar la cromatografía en capa fina.

Se realizaron varias pruebas con cromatografía en capa fina de las fracciones que mostraron inhibición positiva, usando cloroformo como eluyente, como puede verse en la Tabla #11.

Tabla #11: Valores de Rf de los compuestos con actividad antimicótica.

Muestra	# mancha	Rf1	Rf2	Rf3	Rf4	Rf5	Rf6	Rf7
Metoxi-cumarina	3	0.07	0.2	0.35	-	-	-	-
Ext. sílica	5	0.17	0.33	0.42	0.53	0.75	-	-
Fracción A	7	0.05	0.17	0.36	0.5	0.58	0.66	0.75
Fracción C	7	0.21	0.29	0.42	0.53	0.62	0.68	0.75

Habiendo determinado los Rf de cada uno de los compuestos presentes en las fracciones se vio que la cumarina estaba presente en todas las otras fracciones que mostraron un halo de inhibición de tamaño razonable. Dado que la cumarina mostró la actividad antimicrobiana se trató de separarla de los otros compuestos presentes en el extracto; para ello se utilizaron 3 métodos:

No. 1. Hidrólisis de la lactona:

Se efectuó una hidrólisis alcalina (1 gramo de sirupe en 1 lt de KOH al 10% en solución 50:50 metanol-agua) con reflujo durante 3 horas y con ésta no se consiguió el propósito, por lo que se intentó con condiciones mas drásticas (1 gramo de sirupe en 3 lt de la misma solución, 6 horas de reflujo). Bajo estas condiciones no se consiguió la hidrólisis.

No. 2. Separación por cromatografía en columna:

2.1 Se intentó usar cromatografía en columna con alúmina ácida, pero las pruebas preliminares hechas en cromatografía en capa fina no mostraron resultados satisfactorios.

3.1 Se prosiguió intentando separar la cumarina mediante cromatografía en columna con las mismas condiciones que al inicio (cambiando el soporte del caso anterior por silicagel G-60 70-230 mesh con éter), después de haber intentado una mejor separación con otros solventes como tretracloruro de

carbono y diclorometano; y a una velocidad de 4-6 gotas por minuto (125 ml de solvente, se realizó en 16 horas), al haberse eluido toda la cumarina (lo cual fue probado corriendo TLC durante la separación) se sometió todo el residuo restante (que estaba por ser eluido en la columna) y el presente en la sílica de la columna (adsorbido en ella) a una extracción exhaustiva con metanol. Se preparó el sirupe (que no contenía cumarina) por concentración en rotavapor, se llevó a sequedad y se preparó una solución de 1 gramo en 1 ml de metanol y con ella se impregnó discos estériles de papel secante que fueron probados contra C. albicans. Estos no mostraron halos de inhibición significativos.

Al haber determinado de ésta manera que la 7-metoxi-cumarina tenía la actividad antimicótica se procedió a probar su efectividad contra cepas bacterianas y luego se determinó la MIC (Concentración Inhibitoria Mínima), cuyos resultados se presentan a continuación.

Tabla #12: Datos de efectividad de 7-metoxicumarina como antibiótico contra distintas cepas bacterianas.

Microorganismo	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl
E. coli.					
	8.5	8	9.5	10	10
	8	9	10	11	10.5
	8	9	10	9.5	10
	8.5	10	10	10	11
	8	9.5	10	10	-
	-	9	10	9	-
S. aureus.					
	9	10.5	12	12.5	15
	11	12	13	14.5	14.5
	11.5	12	12.5	13	13
	11	12	12.5	12.5	-
	10	11.5	12	13	-
	10	10	12.5	13.5	-
C. albicans.					
	9	8.5	9.5	9.5	9.5
	8	8.5	9	10	9.5
	8	8	8.5	9.5	10
	8.5	8	9	9.5	10
	8	8.5	-	-	11
	8	-	-	-	-

Tabla #13: Valores promedio de halo de inhibición de distintas cepas tratadas con diferentes concentraciones de 7-metoxi-cumarina.

CEPA (*2)	CONCENTRACIONES (*1)				
	(*4)				
C. albicans	8.25 (0.42)	8.3 (0.27)	8.83 (0.29)	9.63 (0.25)	10.00 (0.61)
S. aureus	10 42 (0.92)	11.33 (0.88)	12.42 (0.38)	13.17 (0.75)	14.17 (1.04)
E. coli	8.2 (0.27)	9.08 (0.66)	9.9 (0.22)	9.92 (0.66)	10.5 (0.5)
P. aureuginosa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-) (*3)

(*1) Todas las concentraciones se sacaron de una misma solución madre (0.0138 g/1.15 ml) y se impregnó en los discos los microlitros (µl) indicados en cada columna.

(*2) Las cepas utilizadas eran específicamente caracterizadas con números de registro:

S. aureus ATCC 25923 (Gramm positivo)

E. coli ATCC 25922 (Gramm negativo)

P. aureuginosa ATCC 27853 (Gramm negativo)

(La cepa de C. albicans usada no es ATCC por no haberse encontrado en Guatemala a la fecha de rea-

lización de este trabajo).

(*3) No se observó ningún resultado positivo de inhibición con la cepa usada de P. aureuginosa.

(*4) De cada dato se da el valor promedio y la desviación típica, dado el número de repeticiones tan pequeño.

Después de haber aplicado regresiones lineal, exponencial, logarítmica y potencial a las series de datos para cada microorganismo, se eligió la que presentó el coeficiente de correlación al cuadrado más cercano a uno (1), para determinar mediante este procedimiento la concentracón inhibitoria mínima para cada microorganismo, encontrándose los resultados en la Tabla #11.

Tabla #14: Valores de MIC de 7-metoxi-cumarina contra diferentes cepas microbianas.

CEPA	REGRESION USADA	MIC
C. albicans	Exponencial	7.98
S. aureus	Lineal	10.25
E. coli	Potencial	6.98

Los datos para MIC se obtuvieron con las ecuaciones:

$$\underline{C.\ albicans} \qquad y = a\,e^{bX}, \qquad B = 7.64\,e^{5.33\times10\ X}$$

$$\underline{S.\ aureus} \qquad y = a + bX, \qquad B = 9.5 + 0.0934X$$

$$\underline{E.\ coli} \qquad y = a\,X^{b}, \qquad B = 5.81\,X^{0.15}$$

Con ellas no se deben predecir valores de MIC para halos de inhibición menores a 6 mm.

DISCUSION

En estudios anteriores varias personas realizaron un tamizaje para determinar si distintas plantas (entre ellas Tagetes lucida) presentaban propiedades antimicóticas, según el método de Bauer y Kirby. El pericón mostró tener dicha propiedad, siendo el extracto metanólico el que con el mismo peso de extracto presentó un halo de inhibición mayor contra Candida albicans. Por este hecho se extrajo el material seco con metanol en extractores tipo Soxhlets. Para demostrar su efectividad inicial se hizo el ensayo micológico, y luego se efectuó la cromatografía en columna, separando cada fracción por su coloración con luz visible. Se realizó el ensayo que determinó en qué fracciones estaba presente el compuesto con la actividad buscada, y se efectuó una cromatografía en capa fina para determinar la existencia en dichas fracciones de un factor común al cual poder atribuirle la actividad antimicótica. Se obtuvo del Lic. Sergio Domingo Ortiz Martínez (37) una muestra del principio activo antiespasmódico del pericón (7-metoxi-cumarina) y esta muestra presentó la actividad antimicótica. Es de hacer notar que se cree que no es el único compuesto que tiene la actividad antibiótica, porque la medida del halo de inhibición de éste compuesto puro es menor que la del

extracto crudo. Al efectuar la cromatografía en capa fina mostró un Rf igual al de uno de los compuestos presentes en las fracciones cromatográficas que presentaban la actividad. Se procedió entonces a eliminar este compuesto del resto de compuestos para probar que era éste el que ejercía en mayor proporción esta actividad. Luego se determinó la concentracion inhibitoria mínima (MIC) del compuesto contra C. albicans.

El trabajo se finalizó haciendo el ensayo de la misma manera con otros microorganismos y determinando la MIC de la 7-metoxi-cumarina para cada uno de ellos. Con estos datos se confirma la acción antimicrobiana de Tagetes lucida, aunque la amplitud de éste trabajo no permite limitar claramente su espectro de acción.

CONCLUSIONES

En este trabajo se consiguió cumplir con los objetivos propuestos al inicio del mismo, llegándose a conocer los grupos funcionales presentes en el compuesto con actividad antibiótica, esto se logró determinando cuál era el compuesto presente en todas las fracciones con actividad positiva y gracias a que se tenía dicho compuesto aislado por ser el principio activo antiespasmódico.

El tiempo empleado en la realización del presente trabajo fue de 15 meses, tomando en cuenta el período de adquisición de las cepas usadas.

La importancia del mismo radica en que por su medio se llegó a conocer la estructura del compuesto que le confiere la actividad antimicrobiana al pericón, dando con ello bases sólidas para su uso, que es tan extendido en nuestro medio.

REFERENCIAS

1. Bauer, A.W. et al. 1966. Antibiotic suceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45:493-496.

2. Bohrman, H. & Youngken, H.W. Jr. 1968. Esdragole, te mkain compound in the volatile oil of Tagetes filifolia (Compositae). Phytochemistry. 7:1415-1416.

3. Brockman, E.R. 1971. Laboratory Textbook and Exercises for General Bacteriology. Pendell Publishing Co. Michigan.

4. Cano, J.D., 1985. Suceptibilidad bacteriana in vitro a extractos de vegetales utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Tesis (Médico y Cirujano) Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas, Guatemala.

5. Chan, G.F.Q., et al. 1975. Ultraviolet-mediated antibiotic activity of the thiophene compounds of Tagetes. Phytochemistry. 14:2295-2296.

6. Chan, G.F.Q., et al. 1979. Photosensitizing thiophenes in Porophyllum, Tessaria and Tagetes. Phytochemistry. 18:1566.

7. Chandoke, N. & Ghatak, B.J.R., 1968. Studies on Tagetes minuta: some pharmacological actions of the essential oil. Indian Journal of Medical Research. 57:864-876.

8. Chickering, C.R., 1973. Flowers of Guatemala. University of Oklahoma Press: Norman.

9. Diaz, J.L., 1976. Usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II.

10. Emboden, W., 1979. Narcotic Plants. Collier Books. McMillan Publishing Co. Inc.

11. Evans Schultes & Hofmann, A. 1980. The botany and chemistry of hallucinogens. 2nd. edition. American Lecture Series.

12. Evans Schultes & Hofmann, A. 1982. Plantas de los Dioses. Fondo de Cultura Económica. México.

13. Fernald, M.L., 1970. Gray's Manual of Botany. 8th. edition. D. Van Nostrand Co. New York.

14. Guatemala Indigena. 1978. Vol. XIII, No. 1-2.

15. Guzmán, N. 1987. Determinación de estructuras de los componentes mayoritarios del extracto de hojas y flores de Tagetes lúcida Cav. (pericón) soluble en eter de petroleo mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Tesis. (Quimico) Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Quimicas y Farmacia. Guatemala.

16. Idem, pag 27.

17. Idem, pag 78.

18. Idem, pag 79.

19. Idem, pag 80.

20. Idem, pag 28.

21. Idem, pag 81.

22. Idem, pag 29.

23. Idem, pag 82.

24. Idem, pag 30.

25. Idem, pag 31.

26. Idem, pag 84.

27. Idem, pag 24.

28. Idem, pag 25.

29. Kaloshina, N.A., 1980. Phytochemical evaluation and possibilities for the introduction of some medicinal plants of the Tagetes L. genus. Chemical Abstracts. General Subject Index. 93:217942p.

30. Lawrence, G.H.M., 1951. Taxonomy of Vascular Plants. MacMilan Publishing Co. Inc.

31. Martínez, M. 1959. Plantas útiles de la flora mexicana. Ediciones Botas.

32. Martínez, M. 1969. Las plantas medicinales de México. 5ta. edición. Ediciones Botas.

33. Morton, J.F. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America. Thomas Books.

34. Nash, D.E. & Williams, L.D. 1976. Fieldiana: Botany. Vol. 24. Part XII. Field Museum of Natural History.

35. Neher, R.T. 1968. The Ethnobotany of Tagetes. Economic Botany. 22:317-325.

36. Ortiz M., S.D. 1977. Aislamiento y elucidación de la estructura de los alcaloides del pericón (Tagetes lucida). Guatemala. Universidad de San Carlos. Tesis. (Químico). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

37. Ortiz M., S.D. 1987. Aislamiento y elucidación del principio activo antiespasmódico en el extracto n-hexano del pericón (Tagetes lucida Cav.) Universidad de San Carlos de Guatemala. En etapa de realización.

38. Ortiz de Montellano, B.R. & Browner C.H. 1985. Chemical bases for medicinal plants use in Oaxaca, México. Journal of Etnho-pharmacology. 13:55-88.

39. Robinson, T. 1983. Organic Constituents of Higher Plants. 5th. Edition. Cordus Press. Massachusetts.

40. Siegel, R.K. et al. 1977. On the use of Tagetes lúcida and Nicotiana rústica as a huichol smoking mixture: the aztec "Yahutli" with suggestive hallucinogenic effects. Economic Botany. 3:16.23.

41. Standley, P.C. 1931. Flora of the Lancetilla Valley of Honduras. Field Museum of Natural History. Botanical Series. Field Museum Press. Vol. X.