

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ACUA-
ALCOHOLICO, ACETATO DE ETILO Y ETEREO DE TAGETES GRAVEOLENS
SOBRE *Staphylococcus áureos***

VICTORIA EUGENIA CAMACHO MEJIA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Popayán, 2001**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ACUA-
ALCOHOLICO, ACETATO DE ETILO Y ETEREO DE TAGETES GRAVEOLENS
SOBRE *Staphylococcus aureus***

VICTORIA EUGENIA CAMACHO MEJIA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico**

Director:

Mg. Medardo Vanegas Torres

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Popayán, 2001**

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo fue posible gracias a la ayuda de:

Medardo Vanegas Torres. Magíster en Química y Director de la investigación por compartir sus conocimientos y su valiosa orientación.

Cruz Marina Torres. Magíster en Química, por su incondicional ayuda durante la elaboración y desarrollo del proyecto.

Silvio Carvajal. Magíster en Genética, por su colaboración para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en la investigación.

Jaime Martín. Doctor en Química, por la colaboración en la obtención de espectros de RMN y por su asesoría.

Amparo Noguera de De la Cruz. Bacterióloga de la Universidad Nacional, por su asesoría en la parte de Microbiología.

Y a todos los profesores del Departamento de Química, que de una u otra forma colaboraron para poder culminar exitosamente esta investigación.

CONTENIDO

Página

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 JUSTIFICACION

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

1.2.2 Objetivos Específicos

1.3 HIPOTESIS

1.4 MARCO TEORICO

1.4.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.4.2 ANTECEDENTES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

1.4.2.1 Alcaloides

1.4.2.2 Flavonoides

1.4.2.3 Nafto y/o Antroquinonas

1.4.2.4 Taninos

1.4.2.5 Saponinas

1.4.2.6 Esteroides y/o Triterpenoides

1.4.2.7 Cardiotónicos

1.4.2.8 Lactonas Terpenicas

1.4.3 ANTECEDENTES BOTÁNICOS

1.4.3.1 *Tagetes Graveolens*

1.4.3.2 Clasificación Botánica

1.4.3.3 Origen y Distribución Geográfica

2. SECCION EXPERIMENTAL

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 RECOLECCION Y SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

2.1.2 OBTENCION DEL EXTRACTO DE LA PLANTA

2.2 MATERIALES E INSTRUMENTAL

2.2.1 REACTIVOS

2.2.2 EQUIPOS

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR

2.3.1.1 Análisis de Alcaloides

2.3.1.2 Análisis para Esteroides y Triterpenoides

2.3.1.3 Análisis para Flavonoides

2.3.1.4 Análisis de Nafto y/o Antroquinonas

2.3.1.5 Análisis de Taninos y Saponinas

2.3.1.6 Análisis de Cardiotónicos

2.3.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS

2.3.2.1 Determinación De La Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) De Los Extractos De *Tagetes Graveolens* En *Staphylococcus aureus*.

2.3.2.2 Prueba de susceptibilidad por difusión en disco de los extractos de *Tagetes Graveolens* en *staphylococcus aureus*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR

3.1.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACUO-ALCOHÓLICO

3.1.1.1 Extracción de Metabolitos Secundarios

3.2 ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS

3.2.1 ESPECTRO INFRARROJO

3.2.2 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

3.2.3 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN)

3.2.3.1 RMN Protónico

3.2.3.2 RMN Carbono 13

3.3 ANALISIS ESTADÍSTICO

3.3.1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA

3.3.2 PRUEBA DE MÚLTIPLE COMPARACIÓN

3.3.3 PRUEBA DE DUNCAN

3.3.4 PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

4. CONCLUSIONES

5. RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Plantas que Poseen Actividad Biológica.

Tabla 2. Escala de valores de los Precipitados.

Tabla 3. Propiedades Físicas y Químicas de la Fracción A.

Tabla 4. Datos Vibracionales y Asignaciones par la Fracción A.

Tabla 5. Propiedades Físicas y Químicas de la Fracción B.

Tabla 6. Datos Vibracionales y Asignaciones para la Fracción B.

Tabla 7. Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) de los extractos de *Tagetes Graveolens* en *Staphylococcus aureus*.

Tabla 8. Normatizaciones interpretativas de los diámetros de zonas y correlatos aproximados con la MCI.

Tabla 9.

Tabla 10.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estructura de la Morfina

Figura 2. Estructura fundamental de los Flavonoides

Figura 3. Estructura del Lapacol

Figura 4. Estructura del Ácido Hexahidroxidifenico

Figura 5. Estructura de la Criptogenina

Figura 6. Estructura del Colesterol

Figura 7. Cardiotónico extraído de la planta *Digitalis purpurea*

Figura 8. Estructura del Frulanólido

Figura 9. *Tagetes Graveolens* L'Herit

Figura 10. Análisis de Alcaloides

Figura 11. Obtención del Extracto total de *Tagetes Graveolens* para realizar análisis Fitoquímico Preliminar

Figura 12. Análisis Preliminar de Esteroides y/o Triterpenos libres, Nafto y/o Antroquinonas, Tanino, Saponinas y Flavonoides.

Figura 13. Análisis de Taninos y Saponinas

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Análisis de los Metabolitos Secundarios presentes en las Flores de *Tagetes Graveolens*.

Cuadro 2. Análisis de los Metabolitos Secundarios presentes en las Hojas y Tallos de *Tagetes Graveolens*.

Cuadro 3.

RESUMEN

Las plantas como componentes primordiales de nuestro medio, manifiestan multiplicidad de funciones que nadie desconoce. A parte de servir como alimento (agricultura), son fuente de materias primas, conservan el medio ambiente y poseen grandes propiedades medicinales. ***Tagetes Graveolens*** es una especie nativa de Colombia y de pocos departamentos entre ellos la región del Cauca; es utilizada por indígenas y campesinos como nematicida, bactericida, insecticida y estomacal.

Los extractos planteados de la parte de flores, hojas y tallos de la planta se sometió a análisis cualitativo de metabolitos secundarios y separaciones cromatográficas guiadas por bioensayos con ***Staphylococcus aureus***. Las fracciones activas fueron sometidas a nuevos análisis fitoquímicos y espectroscópicos como: IR, UV y RMN: protónico y carbono 13.

Se reconocieron algunos metabolitos secundarios como: alcaloides, taninos, esteroides y/o triterpenoides y se aisló e identificó un tipo de flavona.

La flavona presentó actividad antimicrobiana frente a la bacteria ***Staphylococcus aureus***.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las drogas vegetales ha sido profundo y ampliamente difundido en los pueblos desde los tiempos más antiguos, hasta hoy en día, en que vienen siendo utilizados indiscriminadamente para satisfacer las necesidades básicas de salud pero sin ninguna base científica. Las plantas por su amplia variedad (40.000 especies) en Colombia, merecen ser objeto de estudio por su potencial como fuente de sustancias con actividad biológica, entre otras cosas, porque la mayoría de los medicamentos que se emplean en la actualidad tienen su origen en las plantas y porque al investigar dichos constituyentes activos se puede entender mejor el papel ecológico que desempeñan.(5)

Desde hace tiempo, hasta el presente, se conoce la existencia de algunos microorganismos causantes de enfermedades infecciosas, las cuales se reconocen por la variedad que presentan en su sintomatología, por este motivo, actualmente se tienen bien establecidos los mecanismos que predisponen a éstos signos.

Uno de los agentes patógenos causantes de dichas enfermedades, es la bacteria ***Staphylococcus aureus***, la más patógena de las especies de ***Staphylococcus***, encontradas en el hombre, un microorganismo capaz de causar infección a cualquier nivel del organismo. Esta bacteria puede complicar la recuperación de infecciones virales, como la influenza.(8)

Es así, que desde hace varios años, se ha venido desarrollando la búsqueda de posibles curas de origen natural a partir de numerosos metabolitos secundarios, que se encuentran presentes en las plantas.

Tomando como referente el Departamento del Cauca, específicamente el resguardo de Tacuelló, Municipio de Toribio, se tuvo en cuenta la especie colombiana ***Tagetes Graveolens***, perteneciente a la familia *Asteraceae*, utilizada tradicionalmente por indígenas y campesinos de la región como estomacica, calmante y carminativa, también se dice que es abortiva.(7)

En estudios preliminares de la planta, llevados a cabo en el Laboratorio de Química de la Universidad del Cauca, se estableció la actividad bactericida del extracto acuo-alcohólico contra la bacteria *Staphylococcus aureus*; para ello se hizo necesario la caracterización de núcleos provenientes del extracto de la planta y la aplicación de métodos para el análisis de compuestos orgánicos. Los métodos empleados para este análisis comprenden extracción, pruebas preliminares de metabolitos secundarios, fraccionamiento, derivatización, análisis espectroscópico (IR, UV, HPLC, Carbonó 13, RMN y cromatográfico) y el tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados muestran que parte de la planta (hojas y tallos) tienen una notable actividad bactericida.

Desde el punto de vista químico se identificaron algunos metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides y esteroides. A los cuales es bien importante encontrarles alguna aplicación biológica.

a. MARCO REFERENCIAL

1.1 JUSTIFICACIÓN

En Colombia como en otros lugares del mundo, el uso indiscriminado de productos químicos sintéticos para el control de enfermedades infecciosas que atacan la salud de las personas, ha desencadenado una serie de problemas de tipo económico y del medio en general.

El estudio de productos provenientes de plantas con actividad biológica, es una alternativa para la búsqueda de sustancias naturales que contribuyan a disminuir el uso de productos sintéticos y por ende coadyuven en la protección del entorno ecológico. Por esta razón se tuvo en cuenta la especie ***Tagetes Graveolens***, especie colombiana que ha sido poco estudiada y debido a que actualmente se conocen los aportes comprobados de algunas plantas a la farmacología moderna.

Además, porque dicho estudio puede traer consigo descubrimientos de gran utilidad para el control de enfermedades bacterianas, la posibilidad de explorar otros tratamientos a enfermedades infectocontagiosas y por la necesidad sentida de los pueblos de recuperar sus plantas, su cultura y con ello su identidad.

Es evidente, que el control de enfermedades y plagas usando productos no contaminantes del medio, el explorar las posibilidades de nuevos agentes

naturales para el control de las infecciones, el conocimiento de la composición química de las plantas, el interés de aumentar el cúmulo sobre la riqueza vegetal del país son razones poderosas para justificar un proceso investigativo, que necesariamente tendrá que tomarse como prioritario en el desarrollo y cuidado de la vida sobre el planeta tierra, como son la salud y un sano ambiente ecológico. En la tabla 1, se ilustran algunas de las plantas que tienen actividad biológica sobre una u otra bacteria.

Tabla 1. Plantas que poseen actividad biológica

NOMBRE CIENTIFICO	FAMILIA	PARTE BIOACTIVA	AGENTE BIOTICO
<i>Allium sativum</i>	Liliaceae	Bulbos, tallos, hojas	Bacterias, hongos
<i>Citrus medica</i>	Rutaceae	Aceite esencial de hojas y frutos	Bacterias, hongos
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	Toda la planta	Bacterias
<i>Tagetes erecta</i>	Asteraceae	Raíces, hojas y flores	Hongos, bacterias, nemátodos
<i>Atractilis ovata</i>	Asteraceae	Toda la planta	Hongos
<i>Clinopodium vulgare</i>	Labiatae	Toda la planta	Hongos
<i>Salix purpurea</i>	Salicaceae	Hojas	Hongos
<i>Aloe barbadensis</i>	Liliaceae	Hojas	Nemátodos
<i>Angelica pubescens</i>	Apiaceae	Toda la planta	Nemátodos
<i>Carica papaya</i>	Cariaceae	Raíz, hojas y frutos	Nemátodos,

			insectos
<i>Datura metel</i>	Solanaceae	Toda la planta	Nemátodos
<i>Solanum sucrence</i>	Solanaceae	Raíz	Nemátodos
<i>Solanum ballsii</i>	Solanaceae	Toda la planta	Insectos
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	Toda la planta	Insectos
<i>Jacaranda obtusifolia</i>	Bignoniaceae	Toda la planta	Insectos
<i>Derris trifoliata</i>	Fabaceae	Raíces, corteza	Insectos
<i>Hura polyandra</i>	Euphorbiaceae	Látex, semillas	Insectos

Fuente : Memorias XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 1994. Medellín .

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la acción de los extractos acuoso-alcohólico, acetato de etilo y etéreo de *Tagetes Graveolens* sobre *Staphylococcus aureus*, usando protocolos establecidos por la fitoquímica y la microbiología, específicamente empleando el método de bioensayos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Mediante la técnica de espectroscopia y cromatografía, aislar y caracterizar los núcleos metabólicos presentes en la planta *Tagetes Graveolens*.
- Por medio del análisis Fitoquímico Preliminar, determinar los núcleos químicos presentes en *Tagetes Graveolens*, que contribuyan al control del *Staphylococcus aureus*.
- Realizar pruebas de mínima concentración inhibitoria y susceptibilidad por difusión en disco, para establecer actividad antibacterial de los extractos.

1.3 HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los diversos usos que se le han dado a la familia *Asteraceae* y el conocimiento empírico que tienen las comunidades de nuestra región, se han realizado numerosos estudios estableciendo algunas de sus propiedades químicas y biológicas.

Del genero **Tagetes** se ha comprobado que la comunidad indígena Páez los utiliza para combatir parásitos después de triturar sus hojas a manera de zumo. (4)

Por la actividad biológica que estas plantas han demostrado, se nos hace interesante examinar la actividad antibacterial de algunas especies del genero *Tagetes Graveolens*.

Se asume que algunas de las concentraciones de los extractos acuo-alcohólico, acetato de etilo o etéreo de *Tagetes Graveolens*, tienen un efecto antimicrobiano sobre alguna de las etapas de desarrollo de la bacteria *Staphylococcus aureus*, de tal manera que afecte su crecimiento poblacional en el organismo. Se espera que los extractos ejerzan efectos comparables con el *antibiótico comercial* respecto a la inhibición del crecimiento microbiano, esto demostraría la actividad antibacteriana de los extractos.

Con ello se contribuye a resolver parte del problema, lo cual es una necesidad imperiosa, si se tiene en cuenta que la región es económicamente pobre, lo cual agrava mucho más el problema de salud, dado que la mayoría no tienen acceso a la medicina prepagada, ni a la gubernamental. Se espera establecer herramientas cognitivas que permitan crear un control natural de la bacteria y por ende de las enfermedades características de ésta.

1.4 MARCO TEORICO

1.4.1 ANTECEDENTES GENERALES

Con el transcurrir del tiempo, surgen evidencias científicas, que el uso de las plantas como medio para curar las enfermedades son cada vez mayor, si se tiene en cuenta la biodiversidad de plantas medicinales en la región del Cauca.

Existen especies vegetales que elaboran sustancias capaces de influir en la salud de la población, el crecimiento, la biología y el comportamiento de la especie o bacteria.

Uno de los microorganismos sobre el cual se quiere hacer énfasis es el *Staphylococcus aureus*, la más patógena de las especies de *Staphylococcus* encontradas en el hombre, un microorganismo capaz de causar infección en cualquier sitio del organismo. El problema crece ya que esta bacteria se halla ampliamente distribuida en el medio ambiente, estos microorganismos con mucha facilidad pueden modificar su estructura y hacerse resistente a los antibióticos, por lo cual se hace más difícil su erradicación del medio humano.(3)

Por tal motivo es de vital importancia retomar las plantas como una alternativa a nivel de salud; recuperarlas y determinar científicamente su actividad biológica, para de esta forma hacer posible el uso de medicamentos de herbolario que abaraten los costos para los sectores menos posibilitados y crecientes de la población.

1.4.2 ANTECEDENTES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas son fundamentales para la vida porque son capaces de convertir la energía solar en compuestos orgánicos que a su vez son utilizados para producir alimentos esenciales. Las plantas verdes tienen suficiente capacidad para elaborar carbohidratos, aminoácidos y compuestos que intervienen en la fotosíntesis, a estas sustancias que son comunes a todas las plantas se les conoce como Metabolitos Primarios. Además, en las plantas son sintetizados otros productos como alcaloides, flavonoides, esteroides, cumarinas y muchas más que no son comunes a todas las plantas y por el contrario, pueden ser una expresión de la individualidad química de un organismo, a estos compuestos se les conoce como Metabolitos Secundarios.(4)

Existen varias razones fundamentales de por qué hay un gran interés en estudiar los Metabolitos Secundarios de las plantas, entre ellas la presencia de principios activos que tienen actividad biológica científicamente reconocida como los siguientes:

1.4.2.1 Alcaloides

Son sustancias de carácter básico, contienen en su estructura nitrógeno heterocíclico, se obtienen de plantas superiores y tienen actividades fisiológicas muy marcadas; influyen en el mecanismo de duplicación del ADN, transcripción del ARN, inhibe síntesis de proteínas, altera procesos celulares, protegen a la planta del ataque de insectos y otros animales, Controlar el crecimiento. Algunos alcaloides han demostrado actividad biológica contra hongos, bacterias, mamíferos e insectos, destacándose su acción tóxica sobre ellos.

Por ejemplo la Ryanodina aislada de *Ryania speciosa*, es potente insecticida contra masticadores y perforadores.

Se conocen muchas aminas que tienen el nitrógeno sobre una cadena alifática como es el caso de la morfina, alcaloide sólido muy amargo y venenoso, que se obtiene del opio (ver figura 1).

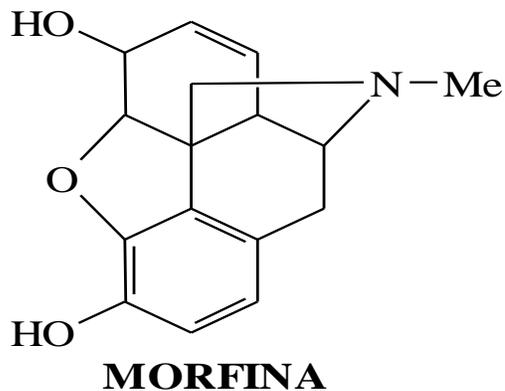


Figura 1. Estructura de la morfina.

1.4.2.2 Flavonoides

Se forman en las plantas a partir de una unidad de ácido cinámico y tres unidades de acetato, estos metabolitos secundarios están ampliamente distribuidos en los vegetales, son responsables de muchas coloraciones de las plantas y también poseen actividades biológicas muy importantes: son sustancias que facilitan la polinización, regulan el crecimiento, protegen a la planta del ataque de microorganismos, y también poseen actividad anticancer, producen sabor amargo que inhibe la alimentación.

En la figura 2 se puede ver la estructura de los núcleos fundamentales de los flavonoides, estas estructuras están marcadas por la presencia de grupos hidroxilos y acetatos.

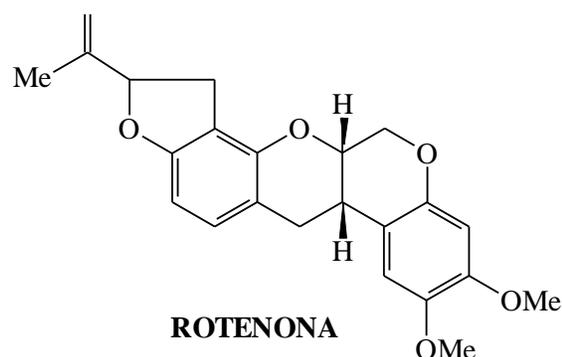


Figura 2. Estructura fundamental a partir de la cual derivan la mayoría de flavonoides.

1.4.2.3 Nafto y/o Antraquinonas

Pertencen al grupo de las quinonas distribuidas ampliamente en las plantas superiores, aunque también se han aislado de microorganismos y líquenes (4); el estudio de estas sustancias tiene gran interés por su actividad antitumoral, antimicrobiana y analgésica (6), como ocurre con el Lapacol, estructura que se muestra en la figura 3.

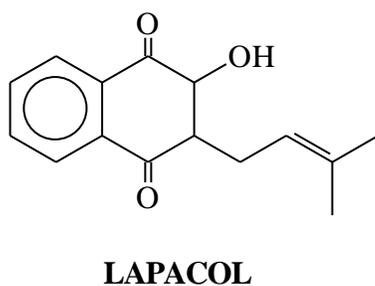


Figura 3. Estructura del Lapacol, posee actividad antitumoral.

1.4.2.4 Taninos

Con este nombre se designan a ciertos compuestos de tipo fenólico, cuyo mecanismo de acción se fundamenta en los puentes de hidrógeno que establece los grupos OH con los átomos de nitrógeno en las cadenas polipeptídicas. Se encuentran en especies maderables, aunque también se han encontrado en algunas hierbas.

Reducen las proteínas solubles de las plantas disminuyendo el valor nutricional, inhiben la digestibilidad, inhiben el crecimiento de hongos y bacterias, poseen propiedades tóxicas y causan disminución de la actividad enzimática. De acuerdo a su estructura los taninos pueden ser hidrolizables como el caso del ácido hexahidroxidifénico (figura 4), o condensados que resultan de la condensación de dos moléculas de leucoantocianidinas.

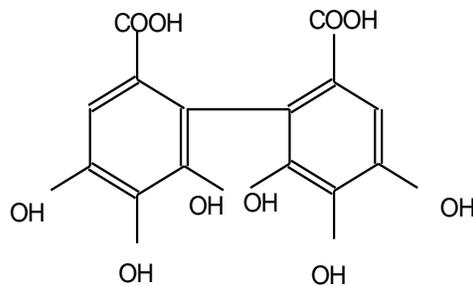


Figura 4. Estructura del Ácido Hexahidroxidifénico. Tanino hidrolizable

1.4.2.5 Saponinas

Son Glicosidos que se derivan fundamentalmente de dos núcleos, tanto las sapogeninas esteroidales como las triterpénicas, están unidas con varios azúcares por el hidroxilo del carbono 3, aunque también se han aislado de saponinas con azúcares en otras posiciones (4). Entre Las propiedades características de las saponinas están su capacidad de hemolizar los glóbulos rojos, cuando están disueltas en agua y se agitan pueden producir una espuma característica que persiste por más de 30 minutos.

Producen sabor amargo que inhibe la alimentación, producen inflamación del abdomen, inhiben respiración y la actividad enzimática de los insectos, poseen capacidades antivirales, antimicrobianas, actúan sobre la membrana celular y las hormonas sexuales (10).

Las saponinas como la criptogenina (figura 5), son tóxicas para los peces porque producen parálisis de las agallas.

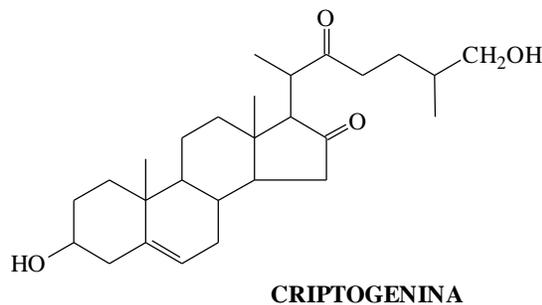


Figura 5. Estructura de la Criptogenina, saponina tóxica.

1.1.2.6 Esteroides y/o Triterpenoides

El triterpeno más sencillo y precursor de todos los esteroides y triterpenoides es el escualeno. Son compuestos amargos, hallados principalmente en especies de Rutáceas y Meliáceas, los triterpenos actúan como fago inhibidores para los insectos, debido a su sabor extremadamente amargo.

Poseen propiedades tóxicas, afectan la membrana celular, son importantes por su actividad anticancerígena y anticarcinogénicas. Las cucurbitácinas, aisladas de pepinos y calabazas; han mostrado efectos disuasores contra insectos no adaptados como los cucarroncitos de la familia coccinellidae perforadores de las hojas del género *Epilachna* (Coleóptero Coccinellidae).

Dentro de éste grupo se halla el colesterol (figura 6), que constituye el punto de partida de la síntesis parcial de varias vitaminas y hormonas.

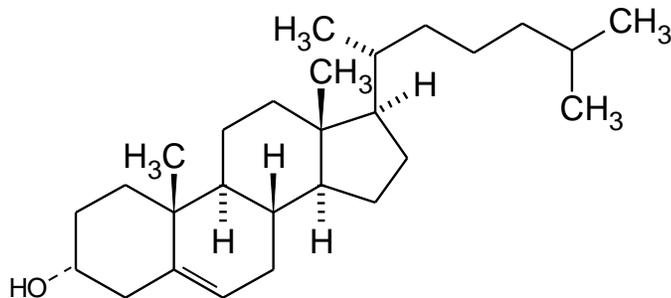


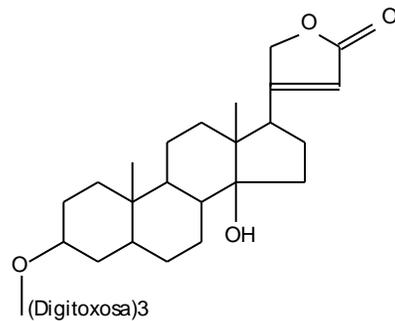
Figura 6. Estructura del Colesterol, presente en los tejidos animales.

1.4.2.7 Cardiotónicos

También se les llama glucósidos cardiacos o cardiotónicos, son sustancias amargas derivadas de los esteroides, que tienen acción sobre el corazón, son capaces de disminuir la tensión superficial cuando están disueltos en agua. (4)

Su toxicidad se debe a que inhiben las ATPasas dependientes de sodio y potasio alterando la relación sodio/potasio afectando consecuentemente la actividad del músculo cardíaco.

Los Cardiotónicos tienen mayor importancia desde el punto de vista terapéutico y se han aislado especialmente en plantas del género *Digitalis purpurea* (ver figura 7).



DIGITOXINA

Figura 7. Cardiotónico extraído de la planta *Digitalis purpurea*.

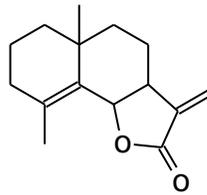
1.4.2.8 LACTONAS TERPENICAS

Las lactonas terpénicas son sustancias incoloras, amargas y relativamente estables. Son sintetizadas por las plantas por oxidación de compuestos formados por ciclación del pirofosfato de farnesilo.

Se ha demostrado que las lactonas sesquiterpénicas, causan dermatitis aguda en humanos, pueden causar toxicidad en vertebrados y causan sabor amargo en la leche de las vacas que ingieren *Helenium amarum*. Actúan sobre algunos protozoarios e inhiben el crecimiento de vegetales. También poseen actividad antimicrobiana, citotóxica y antitumoral.

Son sustancias mayoritarias en especies de la familia Asteraceae o Compositae, pero también se encuentran en Magnoliaceae y Umbeliferae, a las que protegen contra fitófagos potenciales, debido fundamentalmente a su fuerte actividad antialimentaria, son compuestos que están dentro de los más amargos. Las Lactonas

sesquiterpénicas son sintetizadas de las plantas por oxidación de compuestos formados por la ciclación del pirofosfato de farnesilo, como es el caso del Frulanólido (figura 8).



Frulanólido

Figura 8. Estructura de una Lactona Sesquiterpénica.

1.4.3 ANTECEDENTES BOTÁNICOS

La existencia de metabolitos secundarios es un indicativo de las estrategias y de la habilidad de un organismo para sobrevivir. Ellos están presentes para mantener la integridad de la planta contra competidores herbívoros y patógenos; el hecho de que numerosos compuestos se forman como respuesta al daño de los tejidos, sustenta el papel defensivo que se les conoce.

Actualmente se acepta que la diversidad de los metabolitos presentes en las plantas es el resultado de la necesidad que tienen los vegetales de defenderse químicamente.

De las especies de la familia *Asteraceas* cultivadas en Colombia, la *Tagetes Graveolens* es una de las plantas más recientemente conocidas. Los primeros cultivos se establecieron en el departamento de Boyacá, hace pocos años, luego en el Departamento del Cauca, en el Municipio de Toribio (resguardo Tacuelló).

Esta familia se caracteriza por darse en hierbas rastreras, plantas leñosas (arbustos, árboles, bejucos), hojas alternas y opuestas, simples o compuestas; flores dispuestas en capítulos con bracteas involúcras, estériles hermafroditas o unisexuales, raramente dioicas, las exteriores frecuentemente linguladas, las inferiores tubulares; cáliz reducido o desarrollado en forma de vilano o papo, corola actinomorfa o zigomorfa, generalmente pentámera, estambres con número igual al de los pétalos casi siempre con las anteras soldadas en un tubo; filamentos por lo común libres o insertos en la corola; ovario infero unicelular con un rendimiento seminal, anátropo en la base; fruto en aquenio sésil algunas veces con un apéndice y frecuentemente con un vilano adherido a la testa, semillas sin endospermo en íntimo contacto con el pericarpio.(5)

Entre los compuestos químicos que esta familia acumula están los nitrogenados, selenio, molibdeno y otros elementos. Principalmente tienen agentes como sesquiterpenos, lactonas y alcaloides de pirrolidizidina, esto indica que las flores de diferentes especies de *Tagetes* son fuentes de esteres derivados del ácido dipalmítico de luteína compuesto de interés para afecciones de la retina, cuyo contenido puede variar según el color de las flores. (3)

1.4.3.1 *Tagetes Graveolens*

Su nombre vulgar es ruda de caballo, ruda de castilla o amayuyo. (Figura 9)

Esta hierba erecta cultivada, de 50 a 80 cm de alto, bien ramificada, hojas pinnadas, pinnas dentadas, línea lanceolada aguda de color verde claro de 3 cm de largo, 5 cm

de ancho, hojas de tres a 8 cm de largo, flores femeninas de colores linguladas,
flores hermafroditas de corolas tubulosas de 6 cm de largo. (13)



Figura 9. *Tagetes Graveolens* L'Herit

1.4.3.2 Clasificación Botánica

Reino: Vegetal

Familia: Asteraceae

Nombre científico: *Tagetes Graveolens*

Duración: Perenne (más de 5 años)

Planta Bienal: Posee flores femeninas

Semillas: Angiospermas

Parte aprovechable: Tallos tiernos, hojas y flores.

Frutos: En color amarillo

Hojas: En forma alargada

Raíz: Delgada de alimentación y de almacenamiento.

Principios activos: aceites esenciales, flavonoides, cumarinas, alcaloides, entre otros.

1.4.3.3 Origen y Distribución Geográfica

De las especies de la familia *Asteraceas* cultivadas en Colombia, la *Tagetes Graveolens*. es una de las plantas más recientemente conocidas. Los primeros cultivos se establecieron en el departamento de Boyacá, hace pocos años, luego en el Departamento del Cauca, en el Municipio de Toribio, **resguardo de Tacuelló**.

Esta familia se caracteriza por darse en hierbas rastreras, plantas leñosas y por ser bien ramificada. Es usada en decocción por contener aceite esencial, como estomacica, calmante y carminativa, también se dice que es abortiva.

2. SECCION EXPERIMENTAL

2.1 METODOLOGIA

Para el logro de los objetivos propuestos emplearemos una metodología encaminada a desarrollar acciones que involucren el control de la bacteria *Staphylococcus aureus* utilizando los extractos total y/o fraccionados de la planta seleccionada.

Las actividades que se desarrollaron en la sección experimental (diagrama 1), se llevaron a cabo siguiendo las guías de Fitoquímica del profesor Antonio Sanabria del departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.(9)

Las cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas son producidas por cepas relacionadas con infecciones hospitalarias, estas especies forman colonias relativamente grandes, de 2-3 mm, después de 24 horas de incubación a 35 ° C, o hasta de 7 mm después de 48 a 72 horas de incubación. Estas cepas se reproducen en Mueller Hinton, para luego ser trasladadas a un medio de cultivo en agar base y realizar los respectivos ensayos con las diferentes soluciones de extracto, previamente preparadas.

Las pruebas para determinar la actividad bactericida son la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) y el método cualitativo de Difusión en Discos para probar la interacción y tolerancia de un aislamiento. (12)

La mayor parte de las pruebas usadas para evaluar la actividad metabólica de bacterias, por la cual puede hacerse la identificación final de la especie, se lleva a cabo mediante el cultivo y aislamiento de una serie de medios y cuyos resultados pueden interpretarse después de uno o más días de incubación. El diseño experimental que describe el tratamiento estadístico de los datos obtenidos es un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey (comparación múltiple).

2.1.1 RECOLECCION Y SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal se hizo en los alrededores del Municipio de Toribio, resguardo de Tacuelló, una vez recolectado el material, se seco a temperatura ambiente hasta que alcanzo un peso constante, es decir, cuando la planta ha perdido la humedad, luego se pulveriza y se almacena en un lugar oscuro, de acuerdo con el procedimiento de Sanabria (1983).

2.1.2 OBTENCION DEL EXTRACTO DE LA PLANTA

Para la obtención del extracto se toman 50g. de material vegetal previamente secados, se adiciona una mezcla dos solventes etanol y agua, en proporción 1:1, se coloca a extraer en un sistema de reflujo por una hora y se deja en reposo 24 horas, después se filtra y lava con el mismo solvente, posteriormente se destila el etanol y parte del agua, luego se realiza las particiones correspondientes para realizar el análisis fitoquímico preliminar y las pruebas de toxicidad.

2.2 MATERIALES E INSTRUMENTAL

2.1.2 Reactivos

Materiales básicos para la investigación:

- ❖ PLANTA *TAGETES GRAVEOLENS*: Material recolectado en el Municipio de Toribio, resguardo de Tacuelló, localizado en el departamento del Cauca, presenta una temperatura de 18°C.

- ❖ Reactivos químicos empleados: Acetona, Ácido clorhídrico, Ácido Nítrico, Ácido Sulfúrico, Anhídrido Acético, Benceno, Hidroxido de Sodio, Cloruro de Hierro, Éter de Petróleo, Éter Etílico, Cloroformo, Hexano, Acetato de etilo, n-butanol, Peroxido de Hidrógeno, Agua Destilada, Dimetilsulfoxido, Digitonina, Hidroxido de Amonio, Cloruro Férrico, Acido o-fosforico, Clorhidrato de Hidroxilamina, Digitoxina, Nitrato de Plata, Limaduras de Zn, Mg, Acetato de Sodio, Silica Gel, Agar Miuller Hinton, Agar Base (con tinción Fuscina). productos de grado analítico de las marcas: Analitycals, Merck, Carlos Erba Reagenti, ENDO, entre otras.

2.2.2 Equipos

Equipos utilizados para el análisis de las fracciones de los diferentes extractos obtenidas en la cromatografía de columna:

- ▶ Espectrofotómetro Génesis FTIR Mattson (ATT). Resolución (4000-400cm⁻¹), Laboratorio de Organometálica.

- ▶ Spectronic Génesis 5 UV visible (200-1100 nm), Laboratorio de Biología Celular y Molecular.
- ▶ HPLC, VARIAN INTRALAB, Laboratorio de Analítica.
- ▶ Cromatógrafo de gases acoplado a Masas, HEWLETT PACKARD, HP 8000 series/detector HEWLETT PACKARD 5973.
- ▶ Estufa Memmert, Modelo 5128, Laboratorio de Fitoquímica.
- ▶ pH metro marca WTW, modelo 531, Laboratorio de Organometálica.
- ▶ Balanza Metter PJ 360, Delta Range, Laboratorio de Fitoquímica.
- ▶ Centrífuga.
- ▶ Programa estadístico computarizado SPSS. Laboratorio de Microbiología.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR

2.3.1.1 Análisis de Alcaloides

Para el análisis fitoquímico preliminar de alcaloides, prueba que se realizó mediante reacciones de precipitación, utilizando los reactivos de: Dragendorff, Mayer, Valser y Reinekato, siguiendo el procedimiento general los alcaloides, se determinan en el residuo I. (anexo A)

Para la determinación cualitativa de alcaloides, se extrae el residuo I con HCL al 5%, se calienta por 15 minutos a 60 °C y se filtra, del filtrado se coloca un mililitro de la solución en 4 tubos de ensayo a los cuales le adiciona 3 gotas de los reactivos de

precipitación mencionados, de acuerdo a la intensidad del precipitado se ha determinado una escala subjetiva de valores.

Tabla 2. Escala de Valores de los Precipitados

Valores	Concentración
+++	Alta
++	Media
+	Baja

Si se presentan reacciones de precipitación, se continúa el procedimiento para la determinación de alcaloides solubles en cloroformo y en cloroformo-etanol y por último se determina la presencia o ausencia de alcaloides fenólicos y amonio cuaternario y/o óxidos de aminas.

2.3.1.2 Análisis para Esteroides y Triterpenoides

Los esteroides y/o triterpenoides se analizan en el residuo II, el cual se extrae con éter de petróleo (Anexo B), se concentra y se realiza una cromatografía de capa fina en doble sentido, en el primer recorrido se utilizan como eluentes: ciclohexano, acetato de etilo en proporción de 95:5, luego se gira, 90 grados a la izquierda y se desarrolla con la mezcla: éter etílico, éter de petróleo, ácido acético, en una

proporción de 20:80:10, luego, se revela con el reactivo Lieberman Buchardt y se calienta por 10 minutos a una temperatura de 110 a °C, deben aparecer manchas rojas, azules o verdes.

Esta prueba se realiza también por colorimetría, se coloca un ml del extracto etéreo en un tubo de ensayo, se adicionan dos mililitros de Cloroformo, gotas de anhídrido acético y ácido sulfúrico, si aparece un anillo o coloración verde, azul, café. En la interfase el resultado es positivo.

2.3.1.3 Análisis para Flavonoides

La identificación de flavonoides se da mediante reacciones coloridas, entre las pruebas que se realizan están: Cianidina, HCl y Zn. Como se describe en el procedimiento (anexo B), la prueba que da positiva es extraída nuevamente con una mezcla etanol-agua (1:7), así se obtiene la solución "F", en la cual se determinan además taninos, nafto y/o antraquinonas y saponinas.

- a. Prueba de Cianidina:** Se toman 5 ml de la solución "F" se le adicionan 0.5 g magnesio en limaduras y unas gotas de HCl concentrado, en la reacción deben aparecer coloraciones rosadas, rojizas, naranja, que indican la presencia de flavonas, isoflavonas y flavonoides, en medio ácido.

- b. Ensayo de Pacheco:** el sólido se calienta sobre una llama con unos pocos cristales de AcONa y 0.1 ml de anhídrido acético. Luego con 0.1 ml de HCl concentrado. Los dihidroflavonoles producen un color rojo característico. Las

flavonas, chalconas. Auronas, flavonoles y flavanonas dan una respuesta negativa.

- c. Reacción con Zn:** se toman 5 ml de solución "F" se le añaden un poco de Zn en polvo y unas gotas de HCl concentrado, si se presenta una coloración roja o violeta, se considera prueba positiva para dihidroflavonoles.

2.3.1.4 Análisis de Nafto y/o Antraquinonas

Este metabolito secundario se determina también con la solución "F", de la cual se toman 5 ml y se le agrega 1 ml de agua oxigenada de 20 volúmenes, 1 ml de H₂SO₄ al 50%, se calienta por 15 minutos en baño María hirviendo; se extrae con 3 ml de benceno y 1 ml de NaOH al 10%. Cuando se presentan coloraciones entre rosado y rojo, la prueba es positiva.

2.3.1.5 Análisis de Taninos y saponinas

Para identificar los taninos, se toma un mililitro de la solución "F" se le adiciona un ml del reactivo de gelatina sal y se centrifuga a 2000 revoluciones por minuto, si se forma precipitado, se decanta el líquido el sobrenadante, adicionar un ml del reactivo de urea 10 M y tres gotas de cloruro férrico al 5%. La prueba es positiva si se presentan precipitados negros, azul intenso, verdes o morados.

La prueba para saponinas se realiza en la solución F, para ello se deben eliminar los taninos con oxido de magnesio y se lava con etanol hirviendo, una vez eliminados los

de taninos se la prueba de la espuma y la de hemólisis, prueba de la espuma consiste en agitar durante tres minutos un ml de esta solución, si hay formación de espuma y esta permanece por treinta minutos la prueba es considerada positiva.

La prueba de hemólisis se realiza para determinar la capacidad que tienen las saponinas de romper los glóbulos rojos, por la misma razón se lleva a cabo en presencia glóbulos rojos; se prepara una solución normalizada de glóbulos rojos, se toman 5ml se le adiciona un ml de la solución destaninizada, se observa si hay hemólisis y se mide la velocidad de rompimiento de los glóbulos rojos, como patrón comparativo se utiliza 5 ml de la solución de glóbulos rojos, más 0,5 ml de una solución de digitonina 0.01%; y como blanco se utiliza 5 ml de la solución de glóbulos rojos más un ml de agua destilada (Anexo C).

2.3.1.6 Análisis de Cardiotónicos

Los cardiotónicos se determinan presencia de diclorometano, para ello se toma el residuo III y se extrae primero con etanol al 50% v/v, se calienta hasta ebullición, después se extrae con diclorometano y se realizan las reacciones de Kéller-Killiani y Raymond.

a. Reacción de Keller Killiani.

Se evaporan 2 ml de la capa orgánica (diclorometano) hasta sequedad y el residuo se extrae con 3 ml de ácido acético glacial que contiene 2 gotas cloruro férrico al 5%, se añade cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado, se debe formar un anillo pardo rojizo en la zona de contacto y aparecer color, si la respuesta es positiva.

b. Reacción de Raymond.

Se evapora 2 ml de la capa orgánica, el residuo se extrae de nuevo con 1 ml de etanol al 50%, luego se adicionan gotas de NaOH al 20% y 1 ml de m-dinitrobenzoico, coloraciones que van del violeta al morado intenso se consideran respuestas positivas.

2.3.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS

Entre las pruebas biológicas realizadas están:

a) Tratamiento para bioensayos

Para el tratamiento de los bioensayos es importante determinar las concentraciones en las cuales la bacteria se desarrolla mejor, de acuerdo con la escala de Mafarlans, las concentraciones más representativas son: 4.5, 5.25, 6.0 y 6.75 ppm (partes por millón), para hojas y tallos.

b) Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC)

La MIC, es la menor concentración de un extracto que inhibe el crecimiento de un aislamiento de bacterias. Una vez sembradas las cajas de petri con la bacteria, se colocan los sensidiscos con las correspondientes concentraciones y un blanco, al desarrollarse la bacteria se forma un alo de inhibición en los sensidiscos que nos permite determinar que concentración es la más representativa.

Se evalúa la capacidad inhibitoria del extracto acuo-alcohólico, acetato de etilo y etéreo en concentraciones de 4.5, 5.25, 6.0 y 6.75 ppm, y sus respectivas combinaciones.

c. Difusión en disco o Prueba de Bauer–Kirby

Esta prueba se realiza para determinar la Actividad del Extracto, es una técnica sencilla donde se ensayan diferentes dosis de extractos sobre la bacteria y observamos la presencia o ausencia de alos de inhibición.

Se realizan las lecturas de los alos de inhibición, para compararla con los resultados obtenidos por el método de perforación en placa.

No se reproducen zonas de inhibición por el métodos de difusión, pero es importante determinar dicha concentración para establecer aproximadamente el valor de la menor concentración activa del antimicrobiano.

d. Prueba de difusión en agar.

Para realizar esta prueba, primero se preparan las soluciones para cada una de las concentraciones establecidas 4.5, 5.25, 6.0 y 6.75 ppm, para los extractos de *Tagetes Graveolens*, este procedimiento se lleva a cabo en condiciones estrictas de esterilización para evitar la contaminación en las cajas de Petri.

Para realizar la prueba de difusión en agar, se toman 15 ml de medio de cultivo, se le adiciona 5 gotas de fuscina, para evidenciar el alo del sensidisco, se mezcla homogéneamente, y por cada caja de petri se colocan tres sensidiscos con una

concentración determinada y los antibióticos correspondientes, además se coloca un blanco absoluto (sin extracto).

Para controlar el desarrollo de la bacteria se mide el diámetro del alo de crecimiento en milímetros cada seis horas hasta completar 120 horas, tiempo en que la bacteria alcanza su mayor desarrollo.

2.3.2.1 Determinación De La Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) De Los Extractos De *Tagetes Graveolens* En *Staphylococcus aureus*.

Las concentraciones escogidas para preparar cada uno de los extractos fue determinada de acuerdo a la escala de Mafarlans, que representa la MIC, definida como la concentración mínima de antibiótico en µg/ml que impide el crecimiento bacteriano in vitro. (tabla 3)

TABLA 3. Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) de los extractos de *Tagetes Graveolens* en *Staphylococcus aureus*.

PARTE DE LA PLANTA	<i>Staphylococcus aureus</i> (MIC ppm)													
	EXTRACTOS (ppm)												ANTIBIÓTICOS (µg/ml)	
	Extracto acu-alcohólico				Extracto éter de petróleo				Extracto acetato de etilo				A ₁	A ₂
Flores	4.5	5.25	6.0	6.75	4.5	5.25	6.0	6.75	4.5	5.25	6.0	6.75	15	30
Hojas y tallos	4.5	5.25	6.0	6.75	4.5	5.25	6.0	6.75	4.5	5.25	6.0	6.75	15	30

- A₁(GENTAMICINA), A₂ (VANCOMICINA).

Para mayor progreso en las pautas de laboratorio al realizar las pruebas de susceptibilidad, se tiene en cuenta el desarrollo de procedimientos normatizados que han sido ampliamente adoptados. El Comité Nacional para la normatización de los laboratorios clínicos (NCCLS), tabla 4, publica normas para estas y otras pruebas sobre la base de continuidad. (8)

TABLA 4. Normatizaciones interpretativas de los diámetros de zonas y correlatos aproximados con la MCI.

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de zona, en mm			Correlatos aproximados de la MIC	
		Resistente	Intermedio	Moderadamente Susceptible	Susceptible	R
Gentamicina	15 µg/ml	≤ 16	11-12	8	≥ 13	- ≤1µg/ml
Vancomicina	30 µg/ml	≤ 9	10-11	-	≥ 12	- ≤5µg/ml

R (resistente), S (susceptible)

*Método normatizado e interpretación sugerida por el NCCLS.

Fuente (8)

2.3.2.2 Prueba De Susceptibilidad Por Difusión En Disco De Los Extractos De *Tagetes Graveolens* En *Staphylococcus aureus*.

Para el análisis estadístico se tienen en cuenta dos tipos de variables: independientes, como la concentración y el tratamiento y dependientes, como el

diámetro de inhibición. En el análisis se observan dos tipos de factores de tipo cualitativo y cuantitativo respecto a las variables mencionadas. (Tabla 5)

En la siguiente tabla se especifican los extractos correspondientes a cada uno de los tratamientos.

TABLA 5. Variables a Interpretar

VARIABLES		EXTRACTO	N
CON	4.50		54
	5.25		54
	6.0		54
	6.75		54
TTO	1.0	Acuo-alcohólico	54
	2.0	Acetato de Etilo	54
	3.0	Etéreo	54
	4.0	Gentamicina	54
	5.0	Vancomicina	54
	6.0	Flavona	54

- **CON:** concentración, **TTO:** tratamientos, **N:** número de casos leídos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se reportan los resultados experimentales obtenidos en el transcurso de la investigación, en forma de tablas, figuras y cuadros; los cuales se irán discutiendo durante el desarrollo del siguiente capítulo.

3.1 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR

Utilizando la metodología expuesta en la Parte Experimental fue analizada la especie *Tagetes Graveolens* perteneciente a la familia Astearceae.

Los resultados del análisis de metabolitos secundarios para *Tagetes Graveolens* se resumen en los cuadros 1 y 2.

En los cuadros 1 y 2 se muestran los resultados del análisis preliminar de las flores y hojas-tallos de la planta, referenciando la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, naftoquinonas y/o antroquinonas, saponinas, esteroides y/o triterpenoides, lactonas terpénicas y cardiotónicos.

❖ Extracto acuo-alcohólico de las flores de *Tagetes Graveolens*:

Alcaloides: siguiendo el protocolo establecido (anexo A), se obtienen resultados sobre la presencia de alcaloides solubles en cloroformo- etanol (3:2), lo que indica una polaridad relativamente alta, de acuerdo a la abundancia de los precipitados, la prueba de Dragendorff es positiva, presenta una alta abundancia (tabla 2), la prueba de Mayer y Valser dan positivo, pero con poco precipitado.

Flavonoides: la prueba de la Cianidina es positiva, se observa una coloración rojo intenso, lo que indica prueba positiva para sustancias que poseen en su estructura el núcleo de la γ -benzopirona (flavonas, flavonoles).(9)

La prueba de Pacheco es negativa, no hay un cambio de color en la solución, las flavonas, flavanonas y flavonoles dan una respuesta negativa.

La prueba de Zn es negativa, solamente los dihidroflavonoles producen coloraciones rojo-violeta. Las flavononas y flavonoles producen color o coloraciones rosadas débiles.(9)

Nafto y/o Antroquinonas: es prueba positiva por la coloración amarillo tenue que presenta la solución.

Taninos: prueba positiva, ya que al agregar el reactivo de gelatina-sal se obtiene un precipitado soluble en urea 10M y al agregarle cloruro ferrico el precipitado se torna verde.

❖ Extracto etéreo de las flores de *Tagetes Graveolens*:

Las pruebas en su mayoría son negativas, pero la prueba de Dragendorff para alcaloides es positiva en una proporción baja de precipitado.

❖ Extracto acetato de etilo de las flores de *Tagetes Graveolens*:

Alcaloides: las pruebas de Dragendorff, Mayer y Valser son positivas en proporciones media y baja respectivamente.

Esteroides y/o triterpenoides: prueba positiva, al revelar la placa cromatográfica con el reactivo de Liebermann-Burchard se observan manchas de color rojo.

En el cuadro 2, para el extracto de hojas-tallos se observa:

➤ Extracto acuo-alcohólico de las hojas-tallos de *Tagetes Graveolens*:

Alcaloides: la prueba de Dragendorff y Valser es positiva, en proporciones media y baja respectivamente, de acuerdo a la cantidad de precipitado que se presento.

Mayer y Reinekato es prueba negativa, demostrando éste ultimo la carencia de alcaloides de amonio cuaternario.

Flavonoides: el ensayo de Cianidina es positivo, en la solución acuo-alcohólico se produce una coloración rosada tenue al agregar Mg seguido de HCl, permite identificar núcleos de benzopirona.

Los ensayos de Pacheco y Zn/HCl son negativos, lo que indica ausencia de dihidroflavonoles y flavanonas respectivamente.

Las pruebas para identificar nafto y/o antroquinonas, taninos y saponinas son negativas.

Esteroides y/o triterpenoides: la prueba de Liebermann-Burchard es positiva, presenta un anillo color violeta, que puede ser para triterpenoides pentacíclicos.(10)

➤ Extracto etéreo y acetato de etilo de las hojas-tallos de *Tagetes Graveolens*:

La mayoría de métodos para identificar la presencia de metabolitos secundarios fueron negativos, solo para identificar alcaloides las pruebas de Dragendorff dieron positivo, pero con poca presencia de precipitado, para los dos extractos analizados.

Teniendo en cuenta la determinación de los metabolitos secundarios presentes en la planta, se espera que estos presenten actividad bactericida considerable sobre ***Staphylococcus aureus*** .

CUADRO 1. Análisis de los Metabolitos Secundarios presentes en las Flores de *Tagetes Graveolens*

IDENTIFICACION		OBSERVACIONES			
Metabolitos	Prueba	Ext. Acuo- alcohólico	Ext. Éter de petróleo	Ext. Acetato de etilo	
Alcaloides	Dragendorff	+++	+	++	
	Mayer	+	-	+	
	Valser	+	-	-	
	Reinekato	-	-	-	
Flavonoides	Cianidina	Rojo intenso	-	-	
	Pacheco	-	-	-	
	Zn	-	-	-	
Nafto y/o Antroquinonas	Bortrager-Krauss	Coloración Amarillo	-	-	
Taninos	Reactivo gelatina-sal	+	-	-	
Saponinas	Hemólisis	-	-	-	
	Espuma	No se mantuvo la espuma	-	-	
Esteroides y/o Triterpenoides	Liebermann-Burchar	-	-	+	
Cardiotonicos	Kéller Kiliani	-	No apareció anillo	-	
		Placa W	Placa X	Placa Y	Placa Z
Cardiotónicos	Cromatografía de capa delgada		Prueba negativa	Prueba negativa	
Lactonas terpenicas		Prueba negativa			Prueba negativa

CUADRO 2. Análisis de los Metabolitos Secundarios presentes en las Hojas-Tallos de *Tagetes Graveolens*.

IDENTIFICACION			OBSERVACIONES		
Metabolitos	Prueba		Ext. Acuo- alcohólico	Ext. Éter de petróleo	Ext. Acetato de etilo
Alcaloides	Dragendorff		++	+	++
	Mayer		-	-	-
	Valser		+	-	+
	Reinekato		-	-	-
Flavonoides	Cianidina		Rosado tenue	-	-
	Pacheco		No hay color	-	-
	Zn		No hay color	-	-
Nafto y/o Antroquinonas	Bortrager-Krauss		-	-	-
Taninos	Reactivo gelatina-sal		-	-	-
Saponinas	Hemólisis		-	-	-
	Espuma		No se mantuvo	-	-
Esteroides y/o Triterpenoides	Liebermann-Burchard		Presencia de un anillo color violeta	-	-
Cardiotonicos	Kéller Kiliani		-	-	-
Lactonas Terpenicas	Tollens		No se formo espejo de plata	-	-
		Placa W	Placa X	Placa Y	Placa Z
Cardiotonicos	Cromatografía De capa delgada	Prueba Positiva Rf 1.02	Prueba Negativa	Prueba Negativa	Prueba Positiva Rf 1.04
Lactonas Terpenicas					

3.1.1 ANÁLISIS DEL EXTRACTO ACUO-ALCOHÓLICO DE LAS FLORES DE *Tagetes Graveolens*

Para dicho análisis se partió del extracto acuo-alcohólico debido a que presenta mayor número de metabolitos secundarios, como aparece en el cuadro 1, además por que se disuelven en proporciones significativas cuando se extraen al reflujo con etanol del 95%.

El extracto obtenido se evapora con calentamiento no superior a los 50°C y se le hacen particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo y n-butanol, debido a sus diferentes polaridades. Las sustancias apolares quedan en la fase etérea, las medianamente polares en la fase acetato de etilo y las más polares en el n-butanol. Cada una de estas tres fracciones es analizada por métodos espectroscópicos y cromatografía en capa fina (CCF). Para el análisis por CCF del extracto acuo-alcohólico se usan mezclas de cloroformo/acetato de etilo (60:40) y acetona/cloroformo (25:75).

Posteriormente se preparó una columna cromatográfica, usando la mezcla acetona/cloroformo (25:75), para separar las sustancias presentes en el extracto acuo-alcohólico de la planta.

3.1.1.1 Extracción de Metabolitos Secundarios

Una vez separadas las fracciones correspondientes a la columna, se procedió a realizar pruebas específicas para la identificación de flavonoides, de estas fracciones solo una, dio prueba positiva, a la cual se le llamara muestra A.

Las características más importantes de la muestra A aparecen consignadas en la **tabla 8.**

TABLA 8. Propiedades Físicas y Químicas de la muestra A

CARACTERÍSTICAS	
ESTADO	Sólido
COLOR	Amarillo tenue
PUNTO DE FUSION	182 ⁰ C
ESTRUCTURA	Polvo
SOLUBILIDAD	Cloroformo, Metanol, Etanol.
INSOLUBILIDAD	Solventes no polares, benceno y hexano
OLOR	Inoloro
PESO DEL PRODUCTO OBTENIDO	0.7362 g

3.2 ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS

3.2.1 Espectroscopia Infrarroja

El espectro IR (figura 10), proporciona la siguiente información: una banda ancha entre 3313-3470 cm^{-1} correspondiente a hidroxilos asociados, la función carbonilo es sugerida por el alto desplazamiento de la señal del C=O a 1655.66 cm^{-1} . La

aromaticidad es evidente por la débil banda de vibración de tensión 3000 cm^{-1} y por las bandas a 1499.72 y 1450.63 cm^{-1} .

Este producto muestra máximos de absorción correspondientes a uniones C-H alifáticas a 2957.12 cm^{-1} .

TABLA 9. Datos Vibracionales y Asignaciones para la Fracción B.

Componente de la Sustancia	Grupo Funcional	Intervalos de Frecuencia (cm^{-1})
Aromáticos	Tensión C-H	$\approx 3100-3300$
	Vibración de tensión C=C	$1600-1500$
Alcoholes y Fenoles	OH	$3470.67-3313.00$
Grupos carbonilos	R-C(O)-Y	1655.66

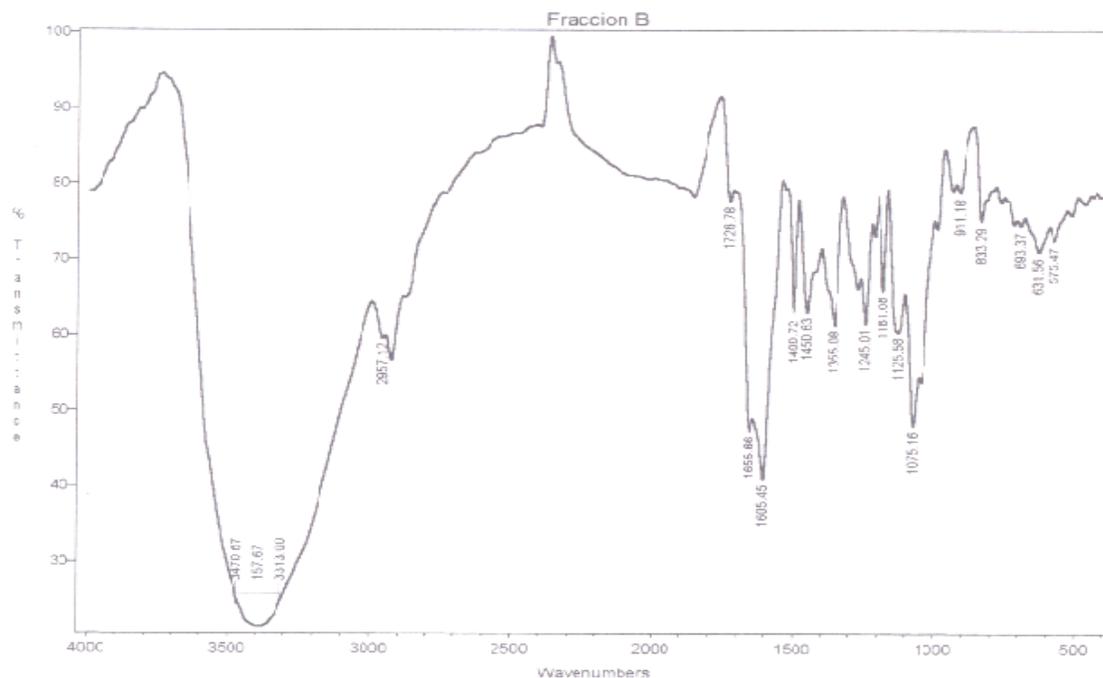


Figura 10. Espectro IR de la muestra A

3.2.2 Espectroscopía Ultravioleta-Visible

Los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos.

De acuerdo al espectro ultravioleta del compuesto que aparece en la figura 11, se encuentra una banda I a 354.03 nm asociada al cinamoilo y la banda II, a una longitud de onda de 294.0 nm debida a la contribución del anillo aromático (asociación benzoilo).

La literatura reporta para las flavonas, dos bandas definidas: La banda I, de mayor apreciación de onda en el rango 300-390 nm asociada con la parte del cinamoilo, y la

banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático, aunque a veces se observan otras bandas de apreciación. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-360 nm, los flavonoles 3-O-sustituidos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm. (12)

3.2.3 RESONANCIA MAGNEATICA NUCLEAR

3.2.3.1 Espectro de RMN Protónico (^1H)

En el espectro de RMN ^1H de la figura 12, se observa que los protones 5, 2_a y 6_a están representados por un multiplete deformado a 7.7 ppm. La integración corresponde exactamente a tres protones. Los protones 3_a y 5_a, dan un doblete abultado, con desplazamiento químico promedio de 6.8 ppm. Los tres singletes que siguen están a 6.7, 6.5 y 6.3 ppm y corresponden a los protones 3, 6 y 8 respectivamente ; no se nota acoplamiento con otros protones.

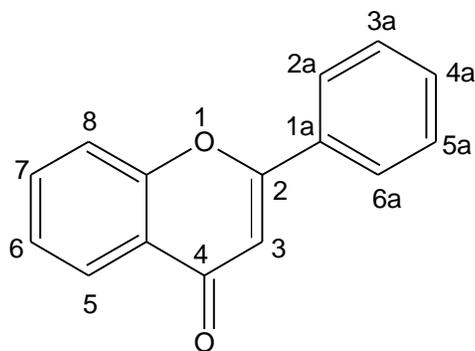
A 5.15 y 5.1 ppm aparecen los protones anoméricos, que a juzgar por el tipo de señal, podrían corresponder a protones β y α respectivamente.

Por otra parte, se observa un multiplete a 3.65-3.4. Esta señal integra para 8 protones, lo mismo ocurre a 3.25-3.1 ppm, región en la que se observa un multiplete que integra para un protón.

Las señales a 4.5 y 3.8, podrían provenir de impurezas, ya que están acopladas con las señales ubicadas a campo más bajo 1.2 y 0.8 ppm, que no son del compuesto propuesto.

Las señales a 7.7 y 6.8 ppm, significan que están en el mismo anillo, los protones correspondientes.

Las apreciaciones anteriores conducen a un flavonoide cuyo esqueleto fundamental tiene la estructura de una flavona, es decir que su formula condensada sería $C_{15}H_{10}O_2$.



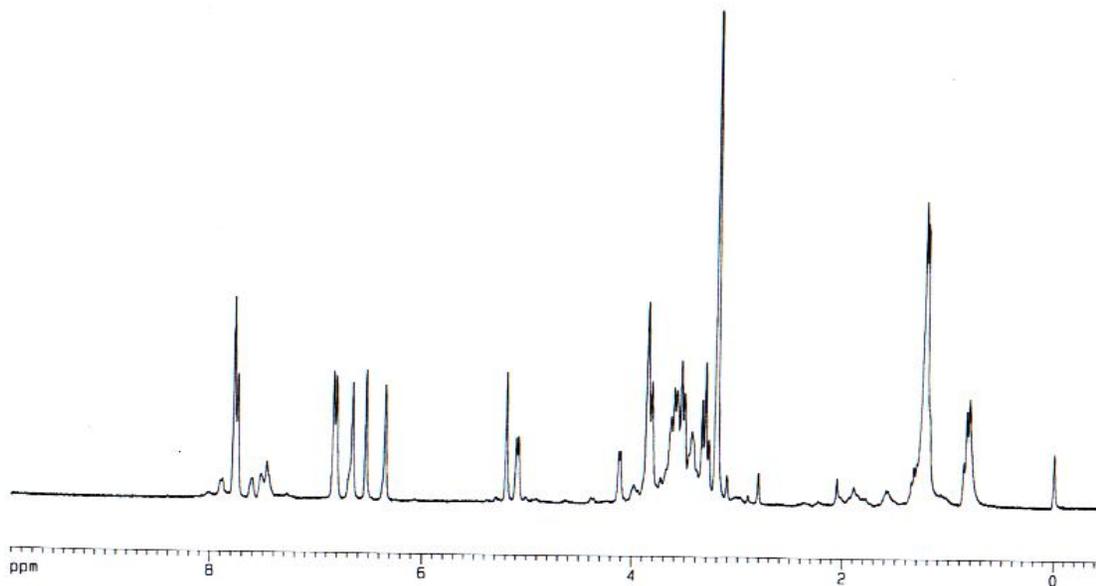
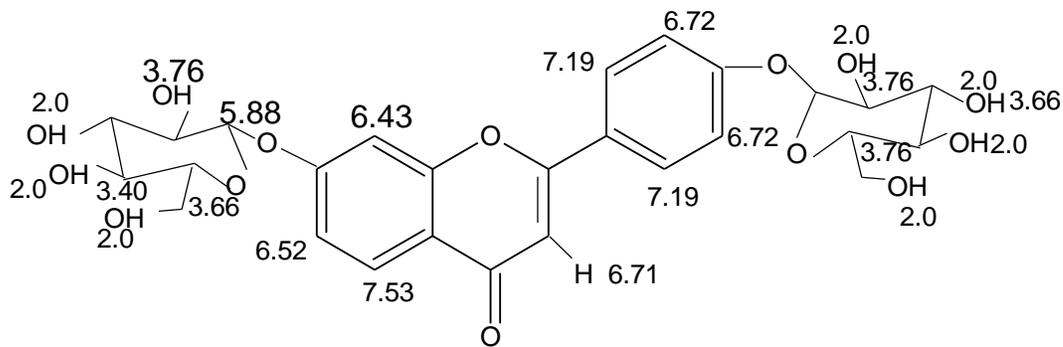


Figura 12. Espectro RMN ¹H de la Muestra A

De acuerdo a las apreciaciones del espectro de RMN ¹H de la muestra A, se puede plantear la siguiente estructura con sus respectivas señales:



3.2.3.2 Espectro de RMN Carbono 13 (^{13}C)

Los espectros de RMN ^{13}C de la figura 13, revelan la presencia de un carbonilo α , β -insaturado, correspondientes a una señal de 185 ppm.

4 señales entre 168 – 160 ppm corresponden a 3 carbonos aromáticos (168, 158, 164), desplazados a campo bajo por la influencia de dos grupos éteres y un carbono olefinico cuaternario a 160 ppm, el β -carbonilo, que generalmente esta más desprotegido. El otro carbono olefinico da señal a 98 ppm.

Las señales a 134, 131, 125, 118, 108, 105 y 104 ppm, siete en total, son típicas de carbonos aromáticos. Estas señales coinciden con el número de carbonos aromáticos de la estructura propuesta. Se tiene en cuenta que las señales de los carbonos 2_a y 3_a son equivalentes a las de 5_a y 6_a respectivamente.

A 101 y 102 ppm aparecen las señales de los carbonos anoméricos, más desplazados a campo bajo; probablemente coincidan con las de los carbonos de la galactosa y glucosa respectivamente.

Los otros carbonos de las dos unidades de azúcar están comprendidas entre 81 y 64 ppm, presentando un total de 10 señales, para 10 carbonos (figura 14).

Las señales en la región alta del espectro, probablemente corresponda a impurezas o rastros de solvente.

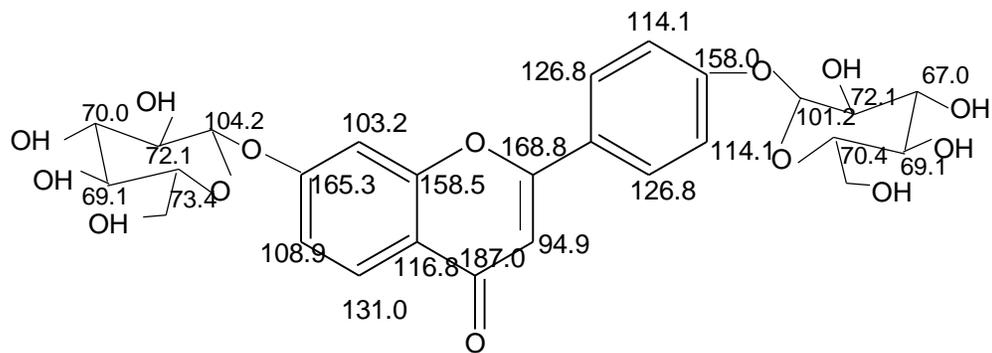
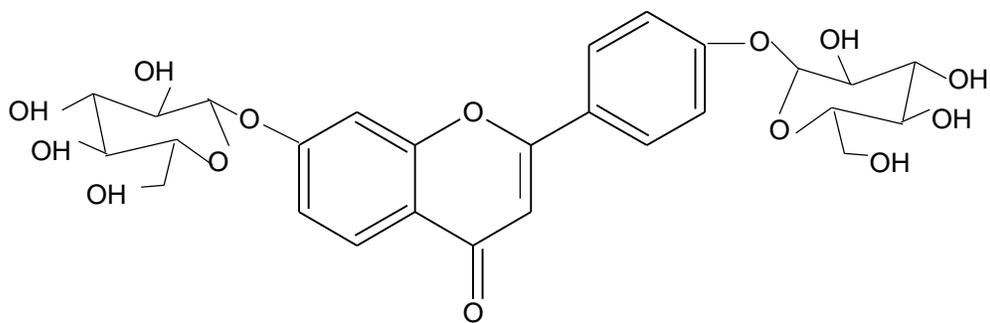


Figura 14. Estructura de la muestra A con sus respectivas señales.

Las unidades anteriores, permiten proponer como estructura preliminar la siguiente flavona con dos unidades de azúcares:



3.3 ANALISIS ESTADÍSTICO

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los bioensayos y la prueba de difusión en disco se usa el programa estadístico SPSS, que emplea el análisis de varianza (ANAVA), y la prueba de Tukey o múltiple comparación.

Las variables que se tienen en cuenta son: la concentración y el tratamiento que representa los diferentes extractos y antibióticos usados. (Tabla 5)

Para cada tratamiento se hacen tres montajes experimentales, cada uno con dos repeticiones, por lo tanto en la **tabla 10**, aparecen los datos agrupados con su respectiva media, la cual más adelante nos permite seleccionar la significancia de las variables.

La media representa la medida en diámetro (mm) de los alos de inhibición de cada tratamiento.

TABLA 10. Medias Estimadas para las Variables

VARIABLE		MEDIA	ERROR ESTANDAR
Con	4.5	17.8333	.138
	5.25	16.0926	.138
	6.0	15.7593	.138
	6.75	15.2963	.138
TTO	1.0	12.7500	.169
	2.0	7.6389	.169
	3.0	10.7222	.169
	4.0	30.0000	.169
	5.0	25.0000	.169
	6.0	11.3611	.169

*Variable dependiente: **DIAM**

3.3.1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA

Teniendo en cuenta el análisis de varianza, se determinó interacción entre la concentración y el tratamiento, determinando así la media y la desviación estándar, de esto se puede decir que los tratamientos 1.0 y 6.0 (extractos acuo-alcohólico y metabolito respectivamente), presentan actividad biocida, comparada con los tratamientos 4.0 (Gentamicina) y 5.0 (Vancomicina) que representan los antibióticos comerciales (figura 1).

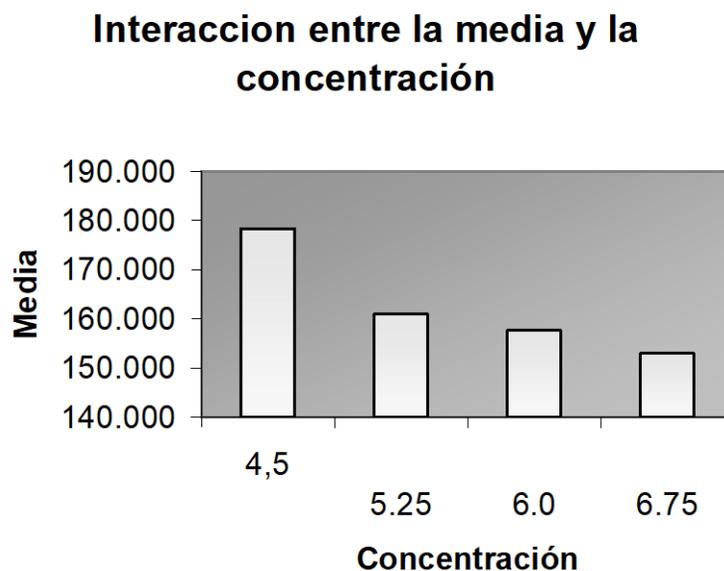


Figura 1. Gráfico de relación entre la concentración de los tratamientos y la media.

Analizando la **tabla 11** se concluye que:

- La concentración en la que hay mejores alos de inhibición es la de 4.5 ppm, para los tratamientos 1.0 (acuo-alcohólico) y 6.0 (metabolito).

- El extracto acetato de etilo, posee mejor actividad biocida de 9.5556 mm, en una concentración de 6.75 ppm.
- Para el extracto etéreo, la mejor concentración es la de 4.5 ppm, con una medida de 12.2222 mm.
- El efecto bactericida disminuye para el metabolito en la concentración de 6.75 ppm, comparado con las otras concentraciones.
- Los antibióticos comerciales mantienen su efectividad, en las diferentes concentraciones.

En la figura 2, se observan los tratamientos en las diferentes concentraciones con su respectivo diámetro en mm; el mayor alo de inhibición lo presentan los antibióticos comerciales: Gentamicina y Vancomicina, luego los extractos: acuo-alcohólico, metabolito, etéreo y acetato de etilo, respectivamente.

Se puede observar que la concentración que mejor actividad biocida presenta para el metabolito (flavonoide) es la de 5.25 ppm.

TABLA 11. Estadística Descriptiva

Interaccion CON TTO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	N
------------------------	-------	------------------------	---

DIAM	4.5	1.0	15.0000	1.2247	9
		2.0	9.3333	1.0000	9
		3.0	12.2222	1.2019	9
		4.0	30.0000	.0000	9
		5.0	25.0000	.0000	9
		6.0	15.4444	.5270	9
		Total	17.8333	7.3786	54
	5.25	1.0	11.5556	.8819	9
		2.0	5.0000	.0000	9
		3.0	10.0000	.0000	9
		4.0	30.0000	.0000	9
		5.0	25.0000	.0000	9
		6.0	15.0000	.0000	9
		Total	16.0926	8.7938	54
	6.0	1.0	12.4444	1.3333	9
		2.0	6.6667	2.5000	9
		3.0	10.4444	.8819	9
		4.0	30.0000	.0000	9
		5.0	25.0000	.0000	9
		6.0	10.0000	.0000	9
		Total	15.7593	8.7522	54
	6.75	1.0	12.0000	1.7321	9
		2.0	9.5556	2.7437	9
		3.0	10.2222	.6667	9
		4.0	30.0000	.0000	9
		5.0	25.0000	.0000	9
		6.0	5.0000	.0000	9
		Total	15.2963	9.1747	54
Total		1.0	12.7500	1.8574	36
		2.0	7.6389	2.6635	36
		3.0	10.7222	1.1859	36
		4.0	30.0000	.0000	36
		5.0	25.0000	.0000	36
		6.0	11.3611	4.3171	36
		Total	16.2454	8.5465	216

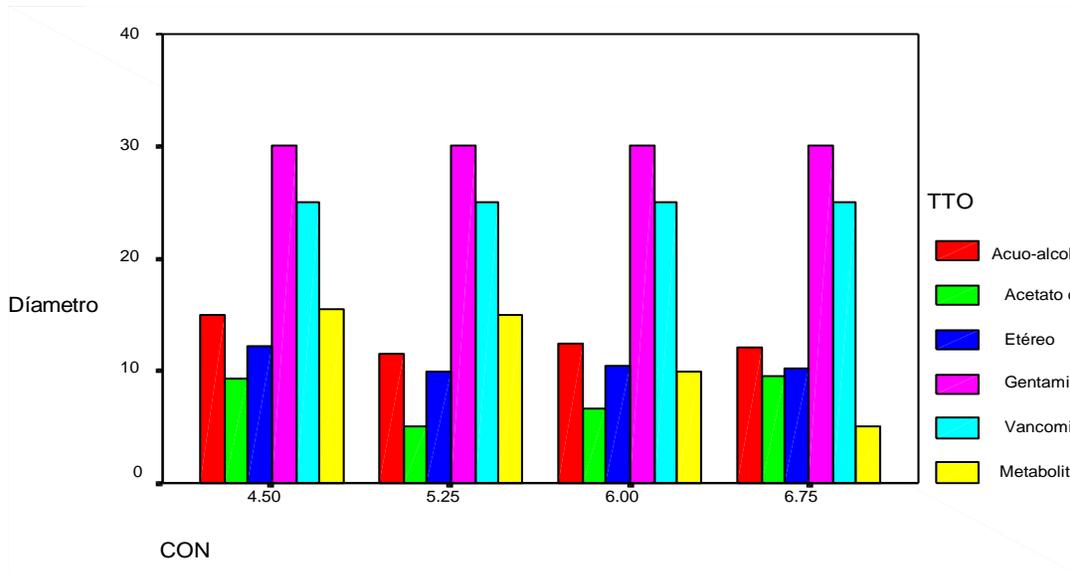


Figura 2. Comparación de los alos de inhibición del crecimiento de *S. aureus*, teniendo en cuenta la interacción entre el tratamiento y la concentración.

3.3.2 PRUEBA DE MÚLTIPLE COMPARACIÓN

Esta prueba se utiliza cuando el número de muestras o tratamientos es considerable ($n \geq 6$), se considera un valor de significancia de $\alpha = 0.05$. Cualquier dato que este por debajo de este valor se considera significativo y por ende se tiene en cuenta en el análisis.

De la **tabla 12** se puede concluir:

- Por el método Duncan, se establecen comparaciones de uno de los tratamientos con el resto, lo que nos permite ver su comportamiento.
- Se observa que las mejores medias las presentan los tratamientos 5.00 y 6.00 correspondientes a los antibióticos comerciales, Gentamicina y Vancomicina, respectivamente (figura 3).

- El extracto acuo-alcohólico comparado con el metabolito presenta una media similar, por lo tanto hay significancia.
- El extracto acetato de etilo es menos eficiente comparado con el metabolito.
- El extracto etéreo, tiene significancia con los extractos acuo-alcohólico y el metabolito.
- El extracto que presenta menor media es el de acetato de etilo, lo que significa que de los extractos probados es el que menos capacidad biocida presenta.
- Los valores negativos en la medias son los que mejor capacidad biocida presentan.

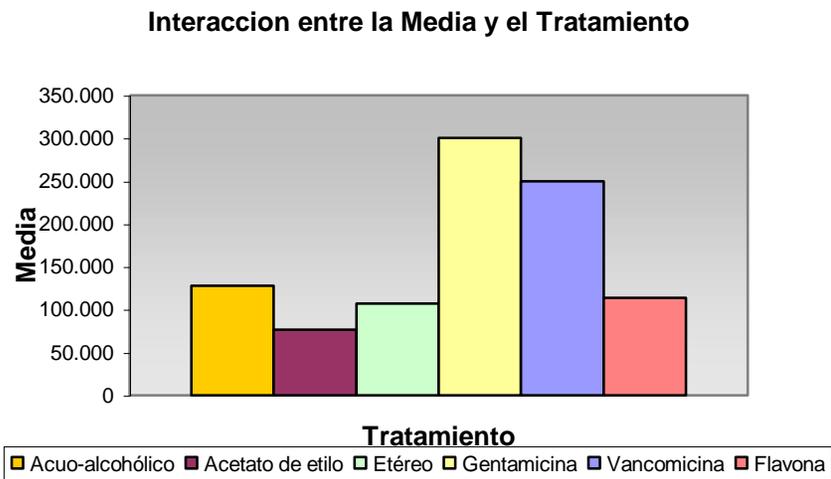


Figura 3. Gráfica comparativo del mejor tratamiento de acuerdo a su media.

TABLA 12. Prueba de Múltiple Comparación

(I) TTO	(J)TTO	DIFERENCIA DE MEDIA (I-J)	ERROR ESTANDAR	LIMITE DE SIGNIFICANCIA	INTERVALO CONFIANZA (95%)		
					BAJO	SUPERIOR	
Duncan	1.0	2.0	5.1111*	.239	.000	4.3058	5.9164
		3.0	20278*	.239	.000	1.2225	2.8330
		4.0	-17.2500*	.239	.000	-18.0553	-16.4447
		5.0	12.2500*	.239	.000	-13.0553	-11.4447
		6.0	.3889*	.239	.000	.5836	2.1942
	2.0	1.0	-5.1111*	.239	.000	-5.9164	- 4.3058
		2.0	-3.0833*	.239	.000	-3.8886	-2.2781
		3.0	-22.3611*	.239	.000	-23.1664	- 21.5558
		4.0	-17.3611*	.239	.000	-18.1664	- 16.5558
		5.0	-3.7222*	.239	.000	-4.5275	- 2.9170
	3.0	1.0	-2.0278*	.239	.000	-2.8330	- 1.2225
			3.0833*	.239	.000	2.2781	3.8886
			-19.2778*	.239	.000	-20.0830	- 18.4725
			-14.2778*	.239	.000	-15.0830	- 13.4725
			-.6389	.239	.218	-1.4442	.1664
	4.0	1.0	17.2500*	.239	.000	16.4447	18.0553
		2.0	22.3611*	.239	.000	21.5558	23.1664
		3.0	19.2778*	.239	.000	18.4725	20.0830
		5.0	5.0000*	.239	.000	4.1947	5.8053
		6.0	18.6389*	.239	.000	17.8336	19.4442
5.0	1.0	12.2500*	.239	.000	11.4447	13.0553	

	2.0	17.3111*	.239	.000	16.5558	18.1664
	3.0	14.2778*	.239	.000	13.4725	15.0830
	4.0	-5.0000*	.239	.000	-5.8053	- 4.1947
	6.0	13.6389*	.239	.000	12.8336	14.4442
6.0	1.0					
	2.0	-1.3889*	.239	.000	-2.1942	-.5836
	3.0	3.7222*	.239	.000	2.9170	4.5275
	4.0	.6389	.239	.218	-.1664	1.4447
	5.0	-18.6389*	.239	.000	-19.4442	-17.8336
		-13.6389*	.239	.000	-14.4442	-12.8336

3.3.4 PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

En las figuras 13-14 se observan algunos resultados obtenidos en la prueba de difusión en disco sobre *staphilococcus aureus*.



Figura 14. Prueba de difusión en disco para el extracto acuo-alcohólico.



Figura 15. Prueba de difusión en disco para el extracto acuo-alcohólico en una concentración de 4.25ppm.



Figura 16. Prueba de difusión en disco para el extracto acuo-alcohólico en una concentración de 5.25ppm.



Figura 16. Prueba de difusión en disco para el extracto acuo-alcohólico en una concentración de 6.0ppm.



Figura 17. Prueba de difusión en disco para el extracto acuo-alcohólico en una concentración de 6.75ppm.

CONCLUSIONES

El estudio proveniente de las plantas con actividad biocida, es de gran importancia por el aporte de sustancias naturales que contribuyen a disminuir el uso de productos sintéticos, éste fue el interés que propicio esta investigación y de la cual podemos concluir:

- ☺ De acuerdo a los resultados obtenidos: experimentales, espectroscópicos y el análisis realizado a la metodología seguida para extracción de metabolitos secundarios a partir del extracto de plantas, se obtuvieron los resultados esperados en cuanto a la presencia de sustancias con actividad biológica.
- ☺ En el análisis de los metabolitos secundarios presentes en las flores de ***Tagetes Graveolens*** se observa que el extracto que mayor reacciones positivas presenta es el acuo-alcohólico, comparado con el etéreo y el acetato de etilo; esto puede ser debido a la polaridad que presenta. En los extractos para las hojas-tallos de la planta se dan menos reacciones positivas. Los resultados muestran que la parte aérea de la planta tiene una notable y mayor actividad biocida contra el ***Staphylococcus aureus***.

- ☺ En cuanto a las fracciones obtenidas por cromatografía de columna en sílica gel, es muy importante saber que todas presentaron una gran gama de compuestos orgánicos (alcaloides, flavonoides , nafto y/o antroquinonas, taninos). De estas fracciones se escogió la que mejor prueba de identificación para flavonoides presento, esto con el fin de cumplir con uno de los objetivos propuestos, por medio del análisis Fitoquímico Preliminar, determinar los núcleos químicos presentes en *Tagetes Graveolens*, que contribuyen al control del *Staphylococcus aureus*.

- ☺ Los extractos de *Tagetes Graveolens* muestran buenos resultados en la prueba que establece la mínima concentración inhibitoria para *Staphylococcus aureus*, todos los extractos muestran una MIC correspondiente a 4.5, 5.25, 6.0 y 6.75 ppm. El extracto acuo-alcohólico muestra la mejor actividad biocida a un valor de 4.5 ppm, lo cual se hace comparable con los antibióticos comerciales (Vancomicina y Gentamicina). Hecho que se corrobora con la prueba de Difusión en Disco, en la cual se observan halos de inhibición aceptables para todos los extractos por ser mayores de 10mm, que es el valor requerido para aceptar un bioensayo.

- ☺ La mejor prueba de difusión en disco para el metabolito (flavona) se muestra a una concentración de 5.25 ppm, este hecho se puede observar y corroborar con la estadística realizada.

☺ La información Espectroscópica permite elucidar una posible estructura para el metabolito hallado en la planta *Tagetes Graveolens*, observando algunas bandas características en el IR como son la presencia de anillos aromáticos, grupos carbonilos, grupos OH, entre otros; el UV nos permite ver la contribución de toda la molécula y bandas características para flavonoides; el RMN nos da una idea de la posición de los protones en la molécula.

RECOMENDACIONES

Este estudio se considera como un programa de investigación amplio para buscar las sustancias responsables de la acción biocida de la planta *Tagetes Graveolens*.

BIBLIOGRAFÍA

1. BARRIGA. G. Hernando. Flora Medicinal Colombiana. Tomo I. Ed. Tercer Mundo, 1.992.
2. BERNART, Henry *et al.* Especies Vegetales Promisorias. Tomo VI. Bogota, 1.991.
3. BRUNETON, Jean. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia S.A. 1.991. Pág. 450.
4. CALDERON, Carlos E. Manual Para la Interpretación de Espectros Infrarrojos. Ed. Guadalupe LTDA. Bogotá 1985 Pág. 37-85.
5. CONLEY, R. T. Espectroscopia Infrarroja. Ed. Alambra. España 1989. Pag 80-99.

6. DOMÍNGUEZ, Jorge. Método de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. España 1985. Pag. 7-28
7. FONT, Pio. Plantas Medicinales. Ed. Labor S.A.Tomo I. Barcelona 1993 Pág. 140.
8. GROS, Eduardo. Introducción al Estudio de Productos naturales. Ed. Eva 1985. Pág. 77, 95.
9. HARBONE. J. B. Introducción a la Bioquímica ecológica. Ed. Academia Press. Londres, 1977.
10. HERNÁNDEZ, Ernesto. Las Plantas y el Territorio. Ediciones Abya-Yala. Quito, 1996.
11. INSUASTY, Braulio, *et al.* Uso de la Espectroscopia Ultravioleta e Infrarroja en Análisis Orgánico. Universidad del Valle 1993. Pag. 9-49
12. J.J. MABRY. *et al.* The Systematic Identification of Flavonoids. Ed. Springer Verlag. Berlin 1990. Pag 3-15.
13. KENNETH, R. Markhman. *et al.* Phytochemistry. Volumen 42 No 1 Gran Bretaña 1996. Pág. 205-210
14. KONEMAN, Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Panamericana, Buenos

Aires, 1.992.

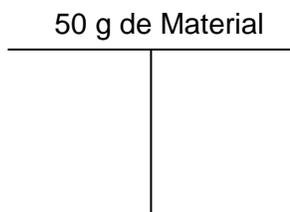
15. MARTINEZ, A. Notas del curso de Farmaconogsia y Fitoquímica. Medellín, Universidad de Antioquia. 1991.
16. MARTINEZ, V.Juan. Evolución de los Métodos para la Determinación Estructural de los Compuestos Orgánicos. Universidad Nacional de Colombia. Bogota 1986. Pág. 24-41.
17. SANABRIA, Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Bogotá, 1.983. Pág. 10-11.
18. STUART, Levy. Investigación y Ciencia. Ed,. Prensa Científica S.A. Barcelona No 260 1998 Pág. 14-21.
19. TORRES, Eduardo. Elementos de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno Ed. Iberoamérica. México. 1993 Pág. 3-42
20. Universidad de Antioquia. Memorias: Simposio sobre Plantas Medicinales y/o Tóxicas, 1.994.
21. VALENCIA ORTIZ, Ciria. Fundamentos de Fitoquímica. Ed. Trillas. México 1995. Pág. 125-128.

22. VILAS, Armesto. Diseño de Síntesis Orgánica. Ed. Alambra. España 1983
Pág. 149-151

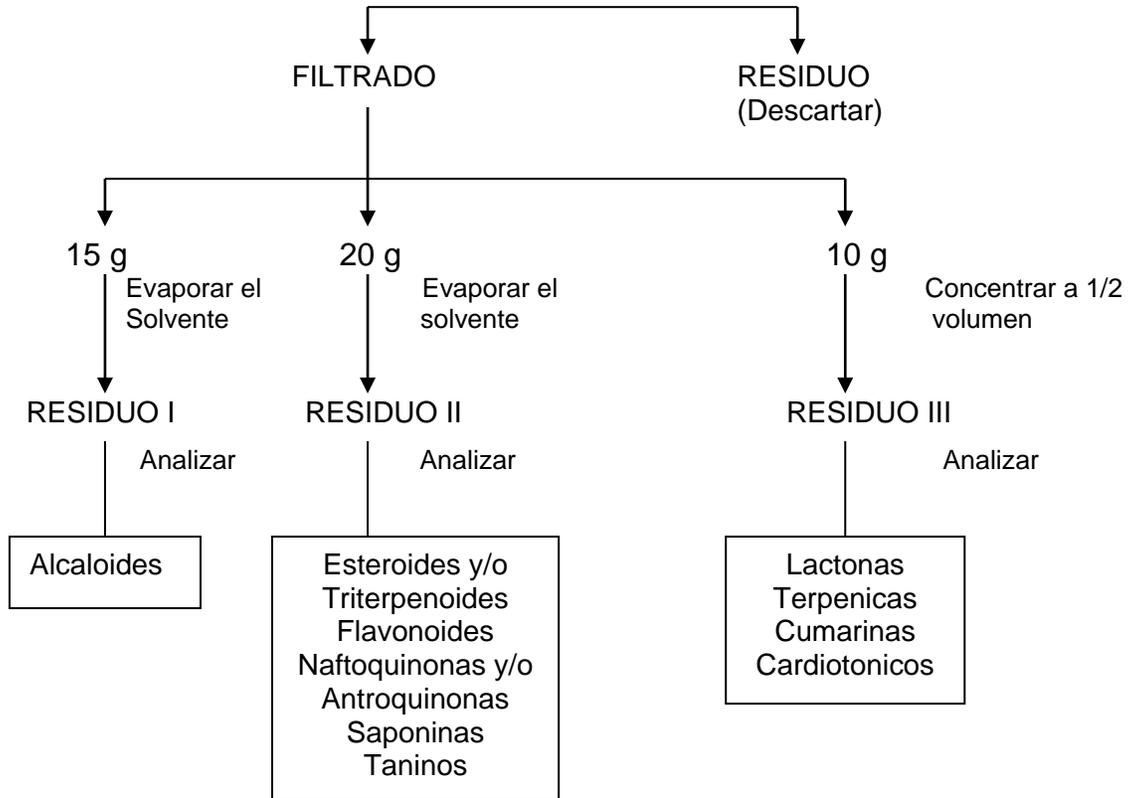
23. VILLACRÉS, Víctor. Bioactividad de Plantas Amazónicas. Ed. Abya-Yala. Quito
1.995. Pág. 40-45.

ANEXO A

Figura 10. Obtención del Extracto total de *Tagetes Graveolens* para realizar análisis
Fitoquímico Preliminar

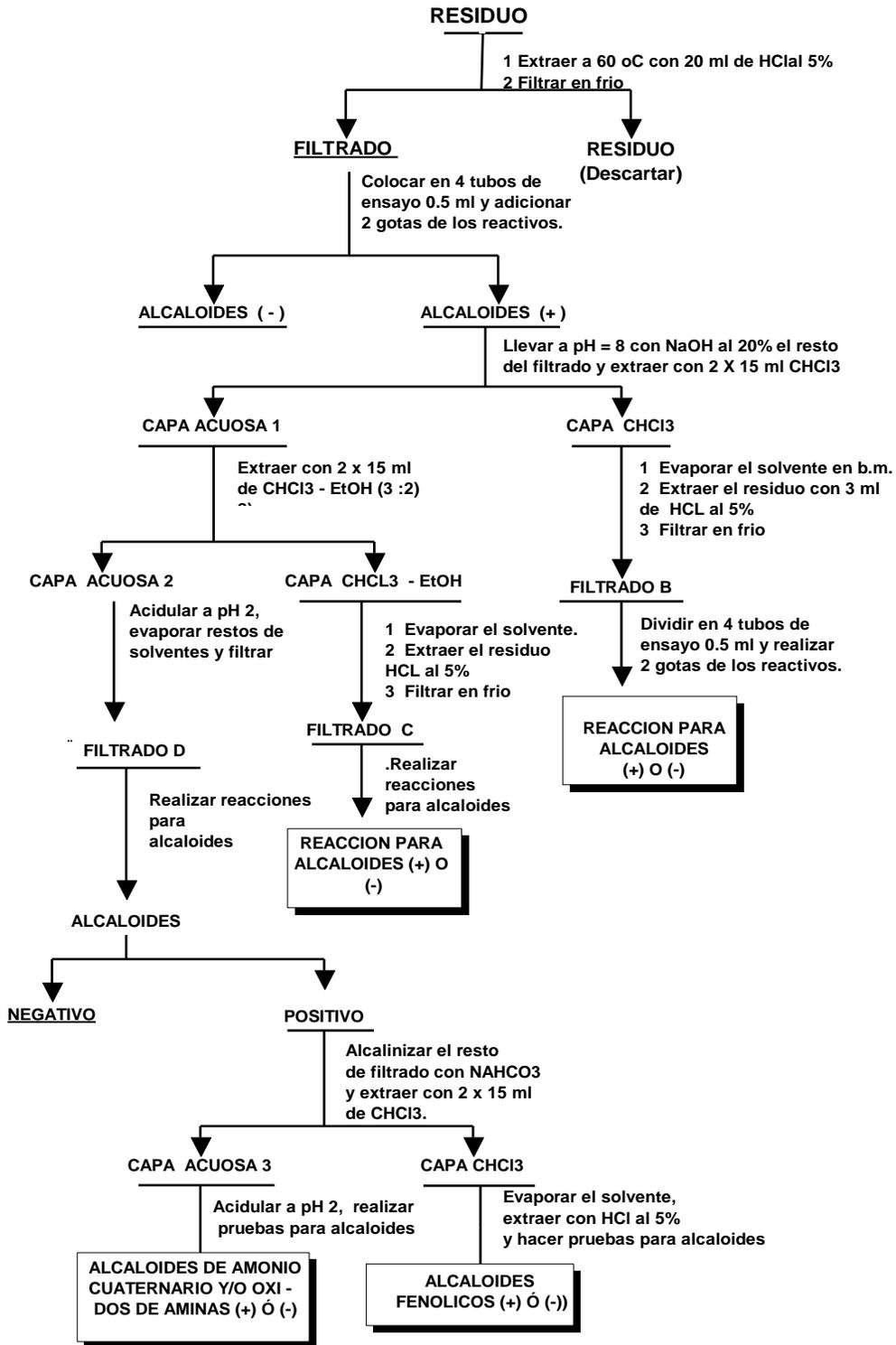


1. Macerar 12 a 15g con 500 o 600ml de Etanol del 95%
2. Colocar a reflujo durante 1H
3. Filtrar en frío y lavar el residuo con 100ml de etanol



Fuente: SANABRIA, Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar.

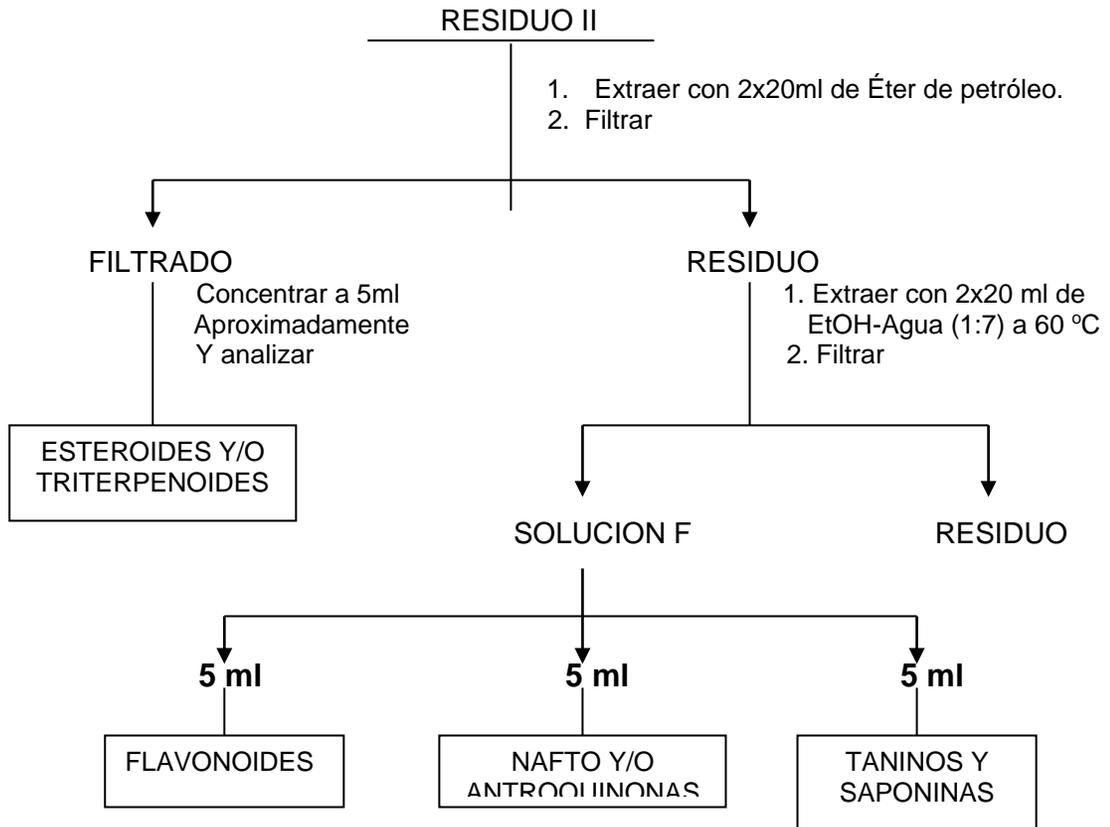
Figura 3. Análisis de Alcaloides



Fuente: SANABRIA, Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar.

ANEXO B

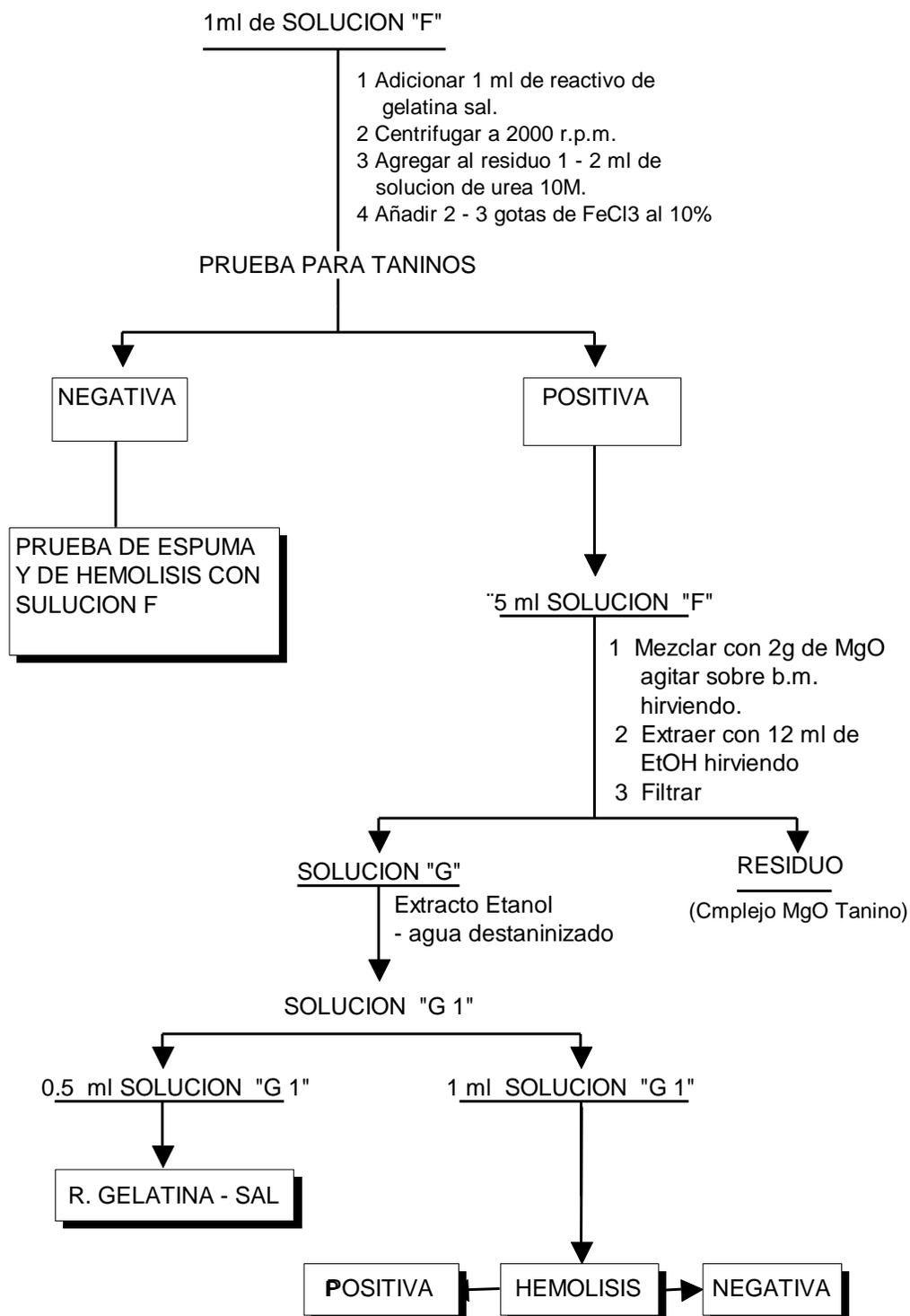
Figura 11. **Análisis Preliminar de Esteroides y/o Triterpenos libres, Nafto y/o Antroquinonas, Tanino, Saponinas y Flavonoides.**



Fuente: SANABRIA, Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar.

ANEXO C

Figura 5. Análisis de Taninos y Saponinas



Fuente: Sanabria G Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar.