



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN BOTÁNICA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Calendula officinalis* L., SO- BRE CEPAS DE *Salmonella enterica* y *Es- cherichia coli*

VÍCTOR ALONZO RODRÍGUEZ LÓPEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

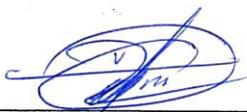
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Víctor Alonzo Rodríguez López,

Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

Ecto antimicrobiano del aceite esencial de Calendula officinalis L., sobre cepas de Salmonella enterica y Escherichia coli

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 27 de febrero de 2019



Firma del
Alumno (a)



DRA. LUCERO DEL MAR RUIZ POSADAS

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Calendula officinalis* L., sobre *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*** realizada por el alumno: **Víctor Alonzo Rodríguez López** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas

ASESOR



Dr. Julián Delgadillo Martínez

ASESOR



M.C. Rubén San Miguel Chávez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2019.

Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Calendula officinalis* L., sobre *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*

**Víctor Alonzo Rodríguez López, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019**

RESUMEN

La caléndula (*Calendula officinalis*) es cultivada en México como planta medicinal y de ornato, se conocen diversas propiedades del aceite esencial (AE) y de los extractos de esta planta, como su actividad antitumoral, antiviral, antifúngica y antioxidante. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* que tiene el AE de caléndula frente a *Escherichia coli* y *Salmonella entérica*; ya que representan un problema de salud pública debido a su virulencia y a su resistencia a antibióticos. El AE se extrajo por el método de arrastre con vapor y los extractos se obtuvieron mediante maceración en hexano, cloruro de metileno y metanol. El efecto antibacterial del AE se determinó por el método de inhibición de disco en agar, con 18 tratamientos y cuatro repeticiones. La variable respuesta fue el halo de inhibición del crecimiento bacteriano (mm). Los tratamientos de 100 y 90 a 60 % de dilución de AE, generaron halos de 30 y 29 a 26 mm respectivamente, en ambas cepas, en cambio los extractos formaron halos de bajo crecimiento bacteriano, pero no halos de inhibición como tales. El extracto con metanol y cloruro de metileno inhibieron la fermentación de la lactosa en *E. coli* lo que limita la virulencia de esta bacteria. Derivado de lo anterior, se concluye que el AE de *Calendula officinalis* tiene capacidad antibacteriana y podría considerarse una opción en el control de algunas enfermedades infecciosas.

Palabras clave: Resistencia antibacterial, coliformes, salmonelosis

**Research of the antimicrobial effect of the essential oil of *Calendula officinalis* L.,
on strain of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli***

**Víctor Alonzo Rodríguez López, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019**

ABSTRACT

Marigold (*Calendula officinalis*) is cultivated in Mexico as a medicinal and ornamental plant. Various properties of the essential oil (EO) and extracts of this plant are known, such as its antitumor, antibacterial, antifungal and antioxidant activity. In this research, the antibacterial *in vitro* effect of the EO of marigold on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* was evaluated. These bacterias represent a public health problem due to their virulence and antibiotics resistance. The EO was extracted by steam distillation method and the extracts were obtained by maceration in hexane, methylene chloride, and methanol. Antibacterial ability was determined by disc inhibition on agar method, with 18 treatments and four repetitions. The response variable was the inhibition halo of bacterial growth (mm). As a result, the levels of 100 and 90 to 60% dilution of EO, generated halos of 30 and 29 to 26 mm respectively, in both strains. However, the extracts formed halos of low bacterial growth, but not inhibition ones. The methanolic extract and methylene chloride inhibited the fermentation of lactose in *E. coli*, which limits the virulence of this bacterium. Derived from the above, it is concluded that the EO of *Calendula officinalis* has antimicrobial ability and could be considered an option on the control of some infectious diseases.

Key words: Antibacterial resistance, coliforms, salmonellosis

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero proporcionado durante la realización de mis estudios de maestría y al Colegio de Postgraduados.

A la **Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas** por su gran apoyo como Consejera y Directora de tesis, por darme la oportunidad y tenerme la confianza para permitirme hacer este trabajo, que con su experiencia y paciencia supo guiarme de manera correcta hasta la culminación del mismo, dándome consejos personales y académicos.

Al **Dr. Julián Delgadillo Martínez, M.C. Rubén San Miguel Chávez** y al **Dr. Israel Castillo**, que de manera cordial y atenta me brindaron su apoyo como asesores, sus valiosas contribuciones al trabajo y su buena disposición de ayudarme con mis dudas.

A mi amada esposa, **Ing. Sonia Teresa** por su inconmensurable amor

A **mi Familia**, mi madre **Patricia**, Padre **Jaime**, abuela **Otelina**, hermanos: **Cheli, Meli, Jaime** y a mi primo **Yahir**. Por su apoyo moral y amor. Los quiero con el alma.

A **Ignacio J. Zarco** y **Maribel Gonzales** por su apoyo desinteresado en laboratorio y trámites relacionados con mis estudios. Sin duda, grandes personas.

A todos los **profesores investigadores** que me impartieron cursos y que con el conocimiento adquirido en estos, me fuera de mayor facilidad la comprensión de mi trabajo de investigación.

A **Alexandra Elbakyan** por luchar para garantizar el libre acceso al conocimiento.

En general agradezco a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de este postgrado.

CONTENIDO

Página

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Hipótesis general.....	2
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivos	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Enfermedades de interés público	4
2.1.1 Infecciones gastrointestinales	4
2.1.2 Control de enfermedades gastrointestinales	5
2.2 Infección por <i>E. coli</i>	6
2.3 Infección por <i>S. enterica</i>	8
2.4 Resistencia bacteriana a antibióticos- Era post antibiótica	9
2.5 Fitoterapia.....	11
2.6 Aceite esencial.....	12
2.6.1 Biosíntesis de aceites esenciales.....	12
2.6.2 Composición de aceites esenciales	13
2.6.3 Métodos de extracción y análisis de AE.....	14
2.6.4 Importancia de los aceites esenciales.....	15
2.7 <i>Calendula officinalis</i> “Caléndula”	16

2.7.1 Toponimia	16
2.7.2 Descripción botánica	17
2.7.3 Metabolitos secundarios	18
2.7.4 Usos terapéuticos	20
2.7.5 Informes farmacológicos	21
2.7.6 Estudios clínicos	22
2.7.7 Toxicología.....	23
III. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DEL AE DE CALÉNDULA SOBRE <i>E. coli</i>	24
3. 1. INTRODUCCIÓN.....	24
3.2. MATERIALES Y METODOS.....	24
3.2.1 Producción de inflorescencias.....	25
3.2.2 Obtención del aceite esencial	27
3.2.3 Cromatografía	28
3.2.4 Bioensayos.....	29
3.2.5 Variables evaluadas.....	33
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.3.1 Aceite esencial.....	35
3.3.2 Actividad antibacteriana sobre <i>E. coli</i>	40
3.4. CONCLUSION.....	43
IV. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DEL ACEITE DE CALÉNDULA SOBRE <i>S. enterica</i>	44
4. 1. INTRODUCCIÓN.....	44
4.2. MATERIALES Y METODOS.....	44
4.2.1 Bioensayo	44
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46

4.4. CONCLUSIÓN.....	49
V. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE EXTRACTOS DE CALÉNDULA SOBRE <i>E. coli</i> Y <i>S.enterica</i>.....	49
5. 1. INTRODUCCIÓN.....	49
5.2. MATERIALES Y METODOS.....	50
5.2.1 Extracción con solventes	50
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.3.1 Actividad antibacterial de los extractos de caléndula en <i>E. coli</i>	52
5.4. CONCLUSIÓN.....	54
VI. BOTÁNICA ECONÓMICA.....	54
6.1 Posología.....	56
VII. CONCLUSION GENERAL	56
VIII. RECOMENDACIONES.....	56
IX. LITERATURA CITADA	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Constituyentes químicos identificados en inflorescencias de caléndula.	19
Cuadro 2. Rf de compuestos identificados por CCF.....	37
Cuadro 3. Principales compuestos identificados por CG/EM del aceite esencial de caléndula.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas generales de la biosíntesis de metabolitos secundarios.	13
Figura 2. Acoplamiento de unidades C5 en biosíntesis de terpenoides.	14
Figura 3. Inflorescencia de caléndula	18
Figura 4. Labores culturales del cultivo de caléndula.	26
Figura 5. Cosecha y secado de capítulos florales.	27
Figura 6. cultivo de <i>E. coli</i> en medio de cultivo Eosin Metilen Blue (EMB).	30
Figura 7. Bioensayo.....	31
Figura 8. Programas de procesamiento y análisis de imágenes	34
Figura 9. Cromatoplaaca de sílice con el aceite esencial revelado	36
Figura 10. Cromatograma obtenido por CG del AE de <i>C. officinalis</i>	38
Figura 11. Actividad bactericida del AE de <i>C. officinalis</i> sobre <i>E. coli</i>	40
Figura 12. Halos de inhibición de los diferentes porcentajes de AE.	42
Figura 13. Apariencia del cultivo de <i>S. enterica</i> en medio LB	45
Figura 14. Actividad bactericida del AE de <i>C. officinalis</i> sobre <i>S. enterica</i>	47
Figura 15. Halos de inhibición de los diferentes porcentajes de aceite esencial.	48
Figura 16. Efecto de los diferentes extractos de caléndula sobre <i>E. coli</i>	52
Figura 17. Efecto de los diferentes extractos sobre el crecimiento de <i>S. enterica</i>	53

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El riesgo de contraer enfermedades por consumir alimentos contaminados con *S. enterica* y *E. coli* es muy alto en países no desarrollados. En México son un problema de interés público debido a la multiresistencia a antibióticos que reduce las opciones de tratamiento (Hortal *et al.*, 2001). Es por esto que surge la necesidad de buscar soluciones que mitiguen estos padecimientos y que no permitan el desarrollo de resistencia, por lo que el uso de plantas aromáticas y medicinales (PAM) se convierte en una valiosa alternativa ya que su composición fitoquímica es rica en metabolitos de tipo terpenoide con actividad antimicrobiana.

En nuestro país viven alrededor de 18 a 30 mil especies de plantas, entre 10 a 13 mil son endémicas. Para el caso de plantas medicinales en México, se estima que asciende a 4,500, de las cuales, sólo el 11 % se ha estudiado químicamente, el 2.6 % de forma biodirigida y sólo el 1.9 % a nivel farmacológico y toxicológico (Cordero, 2002). Así que, considerando que la flora aún no sido investigada, se tiene una fuente de metabolitos muy importante. También, aunque hay muchas especies de las que se conocen sus propiedades empíricamente, el estudio científico de las plantas medicinales es importante para determinar su eficacia y seguridad.

Dentro del grupo de plantas medicinales usadas en México se encuentra *Calendula officinalis* L. (Palma *et al.*, 2007). Utilizada porque contiene compuestos químicos que le confieren numerosas actividades terapéuticas de interés para el sector industrial, cosmético y farmacéutico (Muley *et al.*, 2009). Sin embargo, no obstante que se ha documentado su actividad antimicrobiana. no se ha investigado detalladamente su efecto sobre bacterias que atacan el tracto digestivo. Por lo que, conocer el alcance de su actividad biológica, es un aspecto importante para explotar los probables beneficios que nos puede brindar esta planta.

1.1 Hipótesis general

El aceite esencial y extractos de *C. officinalis* inhiben el crecimiento de *S. enterica* y *E. coli*

Hipótesis específicas

El aceite esencial de *C. officinalis* inhiben el crecimiento de *S. enterica* y *E. coli*

Al menos un tipo de extracto de *C. officinalis* inhibe el crecimiento de *S. enterica* y *E. coli*

1.2 Justificación

El presente trabajo responde al interés de encontrar soluciones alternativas a problemas relacionados con la salud humana, específicamente a la prevención y en el tratamiento a enfermedades gastrointestinales provocadas por *E. coli* y *S. entérica*. Estas son enterobacterias separadas filogenéticamente (Fukushima y Cols, 2002) pero que provocan cuadros clínicos de gastroenteritis aguda. Se trata de bacteriemias que pueden provocar la muerte de personas inmunocomprometidas y que actualmente han generado niveles alarmantes de resistencia a nivel mundial; debido a la globalización, las malas prácticas de higiene, uso indiscriminado de antibióticos en la producción de alimentos y la automedicación.

Una alternativa a la problemática anterior son las plantas que desde tiempos inmemoriales han contribuido a mantener la salud de los seres humanos. En la actualidad se ha impulsado la fitoterapia debido a la aparición de nuevas enfermedades y el poco acceso a tratamientos farmacológicos en países en desarrollo.

Por lo anterior, se planteó la necesidad de realizar estudios con la inflorescencia de la caléndula para comprobar su actividad antibacterial y contribuir a su uso responsable, protegiendo a su vez, los recursos filogenéticos de la explotación indiscriminada de la flora.

1.3 Objetivos

Objetivo general:

Determinar el efecto bactericida del aceite esencial y de extractos orgánicos de *C. officinalis*, sobre especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales

Objetivos particulares:

Evaluar el efecto del aceite esencial de *C. officinalis*, sobre el crecimiento *in vitro* de *S. enterica* y *E. coli*

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del extracto con hexano, metanol y cloruro de metileno de *C. officinalis*, sobre el crecimiento de *S. enterica* y *E. coli*

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enfermedades de interés público

La salud es uno de los pilares de la vida humana. No se puede pensar en el bienestar de una persona cuando su sanidad se encuentra en riesgo. Por ello, una de las tareas del Estado es mantener sanos a todos los ciudadanos, sin distinción alguna.

En México, se tienen enfermedades de interés público crónicas, no transmisibles, como la diabetes, las enfermedades cardíacas, las cerebrovasculares, la cirrosis y el cáncer; las cuales dominan el panorama de la mortalidad. Además de los anteriores, los padecimientos por los que la población busca atención con mayor frecuencia tienen que ver con infecciones comunes; en particular, las de las vías respiratorias e intestinales.

Para el año 2016, se reportaron poco más de 41 millones de casos de enfermedad. La causa más frecuente de atención fueron las reportadas como “infecciones respiratorias agudas”, con 23.4 millones de casos, más de 56 % del total. El segundo sitio lo ocuparon las catalogadas como “infecciones intestinales por otros organismos”, con 4.47 millones de casos. Lo anterior indica que la atención médica en el país está fuertemente dirigida hacia la atención de infecciones comunes (SS-SINAVE, 2016).

2.1.1 Infecciones gastrointestinales

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también de muerte en México y en el Mundo. Por ello, se les considera un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y ancianos (León, 2002). Siendo las enfermedades diarreicas la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan el deceso de 525 mil niños cada año (OMS, 2017).

La diarrea suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, que puede estar ocasionada por diversos organismos bacterianos, víricos y parásitos. La infección se transmite por alimentos o agua contaminados, o bien de una persona a otra como resul-

tado de una higiene deficiente, o derivado de la habilidad de los microorganismos coliformes fecales para resistir el bajo pH, sobrevivir y multiplicarse en alimentos y utensilios, a temperatura ambiente y en puestos de comida (principalmente los ambulantes).

Patzi-Vargas *et al.*, 2015 realizaron un estudio de 4 años de duración sobre patógenos bacterianos que causan enfermedades diarreicas en niños mayores de 5 años en México. Se incluyeron un total de 831 niños, y la mayoría de ellos requirieron tratamiento en un hospital público en Mérida, Yucatán. La *E. coli* fue el principal agente bacteriano identificado entre estos niños (28 %), seguidos de *Salmonella* (12 %) y *Shigella* (9 %), mientras que *Campylobacter* solo se identificó en el 5 % de las muestras.

2.1.2 Control de enfermedades gastrointestinales

Estos padecimientos propios de países en desarrollo son atendidos de acuerdo a las condiciones socioeconómicas y remedios caseros al alcance de la población, debido principalmente a que no se cuenta con unidades básicas de atención médica. Es por ello que la gente recurre a diversos métodos para tratarse, los cuales incluyen: la colocación de una compresa o una bolsa de agua caliente sobre la zona abdominal, la rehidratación con jugos y remedios caseros.

La mayoría de los casos de diarrea presentan síntomas leves y se resuelven rápidamente con terapia de rehidratación oral, sin tratamiento con antibióticos. Sin embargo, los pacientes deben recibir tratamiento si están debilitados, especialmente los inmunocomprometidos, pacientes con enfermedades crónicas como diabetes o personas extremadamente jóvenes o viejos. También se recomienda el tratamiento para aquellos casos que recaen o con síntomas severos y prolongados (Casburn-Jones y Farthing, 2004).

Si bien las terapias antimicrobianas tienen éxito para el control de la enfermedad, la aparición de cepas resistentes a los antibióticos ha creado la necesidad de analizar estas cepas para desarrollar tratamientos efectivos. Diferentes estudios han informado que la mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea fueron resistentes a varios antibióticos, tales como: ampicilina, cotrimoxazol, tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, ciprofloxacino, kanamicina, oxacina, sulfonamida, cefalotina estreptomicina, medicamentos comúnmente utilizados para tratar la diarrea pediátrica (Souza *et al.*, 2009; Patzi-Vargas *et al.*, 2013).

Adicionalmente, la mayoría de los fármacos inducen diversos efectos colaterales indeseables como alergias, aplasias de médula ósea, trastornos gastrointestinales (dolor de estómago, estomatitis, constipación), anemia, glositis, conjuntivitis, reacciones dermatológicas, fiebre, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neuritis, ototoxicidad, fototoxicidad, pueden provocar alteraciones del equilibrio, sordera, lesiones renales, bloqueo neuromuscular, parálisis respiratoria y reacciones de hipersensibilidad, entre otros (PLM, 2005).

Este panorama muestra una realidad muy compleja, por un lado la ineficiencia de las políticas públicas para mantener una cobertura amplia de fármacos y por el hecho de que son medicamentos con alto costo monetario para personas de bajos recursos. Así mismo los efectos secundarios de estos, provoca que las personas no terminen los tratamientos, lo cual conlleva un efecto aún más dañino: la resistencia bacteriana a los antibióticos. Es por ello que una opción que no es tan agresiva y de bajo costo son las plantas medicinales, en las cuales México tiene una tradición milenaria

En el caso de los extractos de plantas con actividad antimicrobiana, son varios los ejemplos históricos que demuestran que los vegetales son fuentes potenciales de nuevos compuestos anti-infecciosos. Así tenemos que la artemisina, glaucarubina, benzoina y emetina, por mencionar algunos, fueron aislados de plantas usadas en medicina tradicional. Actualmente se han planteado las vacunas orales basadas en plantas, con un proceso de fabricación simple en el que no se necesitan dispositivos médicos adicionales para la inyección ya que la inmunogenicidad del antígeno, así como la actividad biológica se conservan en el tracto gastrointestinal debido a su bio-encapsulación natural en las células vegetales (Takeyama *et al.*, 2015).

2.2 Infección por *E. coli*

En 1885 Theodor Escherich identificó y caracterizó una bacteria, aislada de las heces de los recién nacidos, y la llamó *Bacterium coli commune*, la cual en 1911 se renombró en honor a su descubridor como *Escherichia coli*. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa y crece de manera óptima bajo condiciones aeróbicas a 37 °C. Es habitual en el intestino del ser humano y de otros animales, por lo que la mayoría de las cepas son inofensivas. Sin embargo, las cepas patógenas causan una variedad de enfermedades, incluyendo gastroenteritis, disentería, síndrome hemolítico urémico, infección del tracto

urinario, septicemia, neumonía, y meningitis (Leggett *et al.*, 2012). Con base en sus factores de virulencia y enfermedades que causan, las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en subgrupos distintos: *E. coli* diarreogénica (DEC), *E. coli* adhesión-difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Meng *et al.*, 2007).

La infección por *E. coli* se transmite a los seres humanos principalmente a través del consumo de alimentos contaminados, como carne cruda o poco cocida, leche cruda, la contaminación fecal del agua y vegetales. Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (Leggett *et al.*, 2012).

La principal preocupación en los últimos años ha sido un creciente número de brotes de EHEC, esta cepa causa diarrea con sangre y síndrome hemolítico urémico, se ha aislado de las heces de gaviotas, pollo, cabras, ovejas, cerdos, perros y gatos. (OMS, 2015). Así mismo, varios estudios conducidos por Estrada-García *et al.*, 2009 han documentado la presencia de ETEC, otros DAEC y patógenos entéricos en puestos de comida callejeros en la ciudad de Pachuca, México y en vegetales, frutas, jugos y otros productos agrícolas comestibles. Se han detectado ETEC en 12 % de chile serrano, 2 % en jalapeño y en 2-3 % de tomate, alfalfa y jugo fresco de remolacha, disponibles en los mercados públicos de Pachuca (Gomez- Aldapa *et al.*, 2014, Rangel-Vargas *et al.*, 2015).

En la Ciudad de México, se analizaron muestras fecales de 1000 pacientes con diarrea aguda que asistieron a varios hospitales para determinar la presencia de patógenos entéricos. ETEC se encontró en 54 muestras. Estas cepas de ETEC eran resistentes a múltiples fármacos. El 80 % de ellos eran resistentes a la rifaximina, el 30 % a ampicilina y 50-90 % a fosfomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, neomicina, furazolidona, cloranfenicol y ciprofloxacino (Novoa-Farias *et al.*, 2016).

La *E. coli* diarreogénica como patotipo merece una atención especial ya que es responsable de entre el 30 y 40 % de los episodios de diarrea aguda en niños de países en desarrollo; estas bacterias están siendo reconocidas como patógenos importantes incluso en el mundo desarrollado. Sin embargo, la importancia de la *E. coli* diarreogénica

se subestima debido a los limitados métodos de diagnóstico disponibles en los países en desarrollo

Derivado de la aparición de estas cepas virulentas y multiresistentes a antibióticos, en 2009 se creó la Coalición Latinoamericana para la Investigación de *E. coli* (LACER) para promover y ampliar los esfuerzos de investigación en el continente americano y trabajar en conjunto para mejorar el bienestar de la población. Para el 2016, el grupo LACER consistía en una red multidisciplinaria de más de 60 grupos de investigación que trabajan en diferentes aspectos de *E. coli* patógena, incluyendo la epidemiología, la patogénesis, vacunas, salud pública, vigilancia e identificación clínica y tratamiento.

2.3 Infección por *S. enterica*

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y se caracteriza por ser bacilos móviles Gram negativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos. Son considerados como habitantes de la microbiota normal, sin embargo, casi todos los miembros del género son potencialmente patógenos y en ocasiones bajo condiciones de higiene inapropiadas pueden presentarse contaminando alimentos y causar salmonelosis que actualmente es el padecimiento asociado al consumo de alimentos mayormente reportado en Estados Unidos (FDA, 2017). En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*, con frecuencia el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero.

La *Salmonella* es un patógeno transmitido por los alimentos que causa una gran cantidad de casos de fiebre tifoidea, gastroenteritis y muertes cada año en todo el mundo, los síntomas se desencadenan posterior a un periodo de incubación de 6 a 48 h, en las cuales el microorganismo se multiplica y coloniza el tracto digestivo bajo cinco diferentes síndromes clínicos: portador asintomático, gastroenteritis aguda, bacteriemia, infecciones focales (meningitis, osteomielitis o abscesos) y fiebre tifoidea (OPS, 2017).

También conocida como intoxicación alimentaria, la gastroenteritis es caracterizada por un corto periodo de incubación y un predominio de una presentación inicial de síntomas tales como náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, dolor de cabeza, calambres abdominales y

mialgias. Los niños menores de cinco años exhiben las tasas más altas de salmonelosis causando gastroenteritis aguda. Por lo general, *S. enterica* serotipo Typhimurium es el serotipo más común que puede causar una forma grave de gastroenteritis en humanos, caracterizada por afectación del colon, septicemia, fiebre y aborto (Murray *et al.*, 2013)

2.4 Resistencia bacteriana a antibióticos- Era post antibiótica

Selman Waksman, el famoso microbiólogo del suelo que descubrió la estreptomicina, propuso el término "antibiótico", aunque él y sus colegas refirieron este término para aquellos compuestos producidos por microbios para contrarrestar el crecimiento de otros microbios; sin embargo, posteriormente el término utilizó para referirse a cualquier molécula orgánica con propiedades antibacterianas (Waksman y Flynn 1973). Los microbios que producen antibióticos se estudian en gran parte para explotar su potencial terapéutico; no obstante, se sabe que estos compuestos desempeñan un papel multifacético en la comunidad microbiana, incluso actuando como moléculas de señalización (Koul *et al.*, 2016). Ahora se entiende que los antibióticos y los genes de resistencia a los antibióticos coevolucionaron en el organismo para conferir un rasgo, ventajoso para el organismo frente a la presión de selección. Entonces, la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, sin intervención humana. Sin embargo, también sabemos que el reciente aumento en la resistencia a los antibióticos se debe a la inmensa presión de selección creada en diversos niveles por las actividades antropogénicas. (Andersson y Hughes, 2010).

En el siglo pasado, los avances en las ciencias biomédicas condujeron a mejoras en la calidad de la vida humana, principalmente se desarrollaron medicamentos efectivos para la mayoría de las enfermedades infecciosas, sin embargo, el uso excesivo de medicamentos generó patógenos resistentes a dichas sustancias que conducen a formas intratables de muchas enfermedades (Arora, 2017), varios agentes patógenos bacterianos y fúngicos han vuelto y una vez más se han convertido en una necesidad clínica no satisfecha de enfermedades infecciosas (Fauci y Morens, 2012).

El uso no contabilizado de antibióticos que ha dado lugar a la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a los medicamentos es un sombrío recordatorio de la poderosa adaptación de la naturaleza (Kalia *et al.*, 2014).

Según las estimaciones actuales del Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los E.U.A., hubo dos millones de casos de infecciones con 23,000 muertes por organismos resistentes a los antibióticos en Estados Unidos solamente en 2013. Comprensiblemente, la incidencia de la resistencia a los medicamentos es de gran importancia económica debido a sus graves consecuencias para la salud y, por lo tanto, el Foro Económico Mundial enumeró la resistencia a los antibióticos como la segunda mayor amenaza para la salud humana debido al fuerte aumento de las infecciones en los últimos años (Blair *et al.*, 2015).

La frecuente prescripción de antibióticos por parte de los médicos y la costumbre de tomar antibióticos sin consultar a un profesional, especialmente en los países en desarrollo se consideran las principales causas de resistencia en bacterias contra un particular antibiótico o una combinación de antibióticos. Entre muchos países de América Latina, incluidos Brasil y México, se implementaron restricciones sobre las ventas de antibióticos sin receta en 2010 (Santa-Ana-Tellez *et al.*, 2015). Aun así en un estudio realizado por Ouyang-Latimer *et al.*, 2011, los aislados de ETEC de México, mostraron una mayor resistencia a lo largo de los años a ciprofloxacino y levofloxacino, en comparación con los aislados en América Central. Otros autores más han estudiado la prevalencia de DEC en niños con diarrea hospitalizados en la península de Yucatán, diez por ciento de los casos estaban infectados con cepas de ETEC que albergaban los llamados genes de virulencia, tales como *aap* (dispersina), *aatA* (translocador), *ast* (EAST-1), *pet* (toxina codificada por plásmido) y *cdt* (toxina distal citoquetal). Estos genes estaban presentes en 93 % de las cepas (Patz-Vargas *et al.*, 2015).

En las investigaciones sobre la información genética de estas bacterias se ha encontrado que, una cuarta parte de las cepas aisladas de niños con 5 años de edad en Bangladesh y México portan el gen del pilus Longus mayor de tipo IV de ETEC (Cruz-Cordova *et al.* 2014). En ese sentido se ha estudiado la diversidad bioquímica y genética de 166 cepas de ETEC aisladas de sujetos estadounidenses en las ciudades de Cuernavaca y Guadaluajara, México; durante los meses de verano. La mayoría de las cepas tenían toxinas termoestables (ST). Fueron identificados veinticuatro grupos clonales, lo que indica una gran cantidad de genes y a su vez la diversidad entre cepas de ETEC en estos lugares

en particular (Ouyang-Latimer *et al.*, 2010). Además, debido al lipopolisacárido de la pared celular (LPS) de varias bacterias Gram negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholera* y *Salmonella enterica* son intrínsecamente menos permeables y, por lo tanto, resistentes a muchos antibióticos hidrofóbicos, como la eritromicina, roxitromicina, claritromicina y azitromicina (Kojima y Nikaido, 2013)

Es evidente que con el tiempo hay un cambio de las cepas de bacterias en las poblaciones humanas, lo que justifica la necesidad de una vigilancia continua en los patrones de susceptibilidad en todo el mundo y recomendaciones geográficas específicas sobre la terapia de enfermedades diarreicas.

2.5 Fitoterapia

En México hay un 80 % de personas que consumen plantas medicinales para tratar diferentes enfermedades; por lo que, su demanda y la de los productos elaborados con ellas es creciente. Esto representa una alternativa económica importante a cultivos tradicionales, por lo que cada vez más aumenta la superficie de cultivo de plantas aromáticas y medicinales (Rosete *et al.*, 2013). Esta tendencia ha sido propiciada por el descubrimiento de efectos secundarios en fármacos sintéticos, el mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales, el impulso de nuevas formas de preparación y de administración de las drogas vegetales y el desarrollo de métodos analíticos que garantizan un mejor control de calidad (Sharapin, 2000; Furlan, 2005).

En México, se reconoce oficialmente el empleo de las plantas con fines terapéuticos. La Ley General de Salud, en su Capítulo IV: Medicamentos, artículo 224, inciso B, fracción III, reconoce a los medicamentos herbolarios y los define; así como a los Remedios Herbolarios, en el capítulo correspondiente al Reglamento de Insumos para la Salud (1998), Título tercero, Capítulo único, artículo 88. Más adelante, en el artículo 96 del mismo capítulo se plantea que: “La venta y suministro al público de los Remedios Herbolarios serán de libre acceso”. Gracias a estas legislaciones, el número de plantas medicinales en México asciende a la cantidad de 4,500 pero solamente 11 % se ha estudiado químicamente, 2.6 % de forma biodirigida y sólo 1.9 % a nivel farmacológico y toxicológico (Cordero, 2002). De los porcentajes estudiados en el área de la fitoquímica,

las plantas medicinales se han caracterizado por sus posibles compuestos bioactivos, ensayos de bioactividad e identificación de modos de acción potenciales.

Cuando se conocen los efectos curativos de las plantas, ya sea empírico o científico, es de suma importancia conocer la mejor manera de administración y dosificación de la droga. Los extractos, aceites esenciales, infusiones y tinturas son algunos de los preparados más utilizados en fitoterapia. Por otro lado, con formas farmacéuticas como cápsulas, comprimidos, jarabes, pomadas, se consigue mejorar la presentación y facilita su administración

2.6 Aceite esencial

El término aceite esencial (AE) es una contracción de “aceite de excelencia”. Se encuentran en distintos órganos de la planta, como flores, tallos, semillas, frutos, raíces, corteza, hojas; y se pueden encontrar almacenados en células epidérmicas, cavidades, canales o en tricomas glandulares. (Fahn, 1988). La capacidad de acumular aceites esenciales no está omnipresente en las plantas sino que es una característica de algunas familias botánicas (Hüsni *et al.*, 2006). Los AE son sustancias líquidas, volátiles, generalmente incoloras, son solubles en lípidos y en disolventes orgánicos con una densidad generalmente más baja que la del agua. Un aceite esencial definido por la Organización Internacional de Normalización (ISO) es un “producto obtenido a partir de material vegetal, ya sea con destilación por arrastre de vapor o desde el epicarpio de los frutos cítricos mediante un procedimiento mecánico” (Lubbe *et al.*, 2013).

2.6.1 Biosíntesis de aceites esenciales

En el esquema general de las reacciones biosintéticas a través de la fotosíntesis, las plantas convierten el dióxido de carbono y agua en glucosa; en la glucólisis se produce fosfoenolpiruvato, elemento clave para el shikimato. La descarboxilación de fosfoenolpiruvato da a la unidad de dos carbonos de acetato y éste es esterificado con la Coenzima-A para dar Acetil CoA, la condensación de ésta conduce a los policétidos y lípidos. La Acetil CoA también es un punto de partida para la síntesis de ácido mevalónico, que es el material de partida clave para los terpenoides como se muestra en la Figura 1.

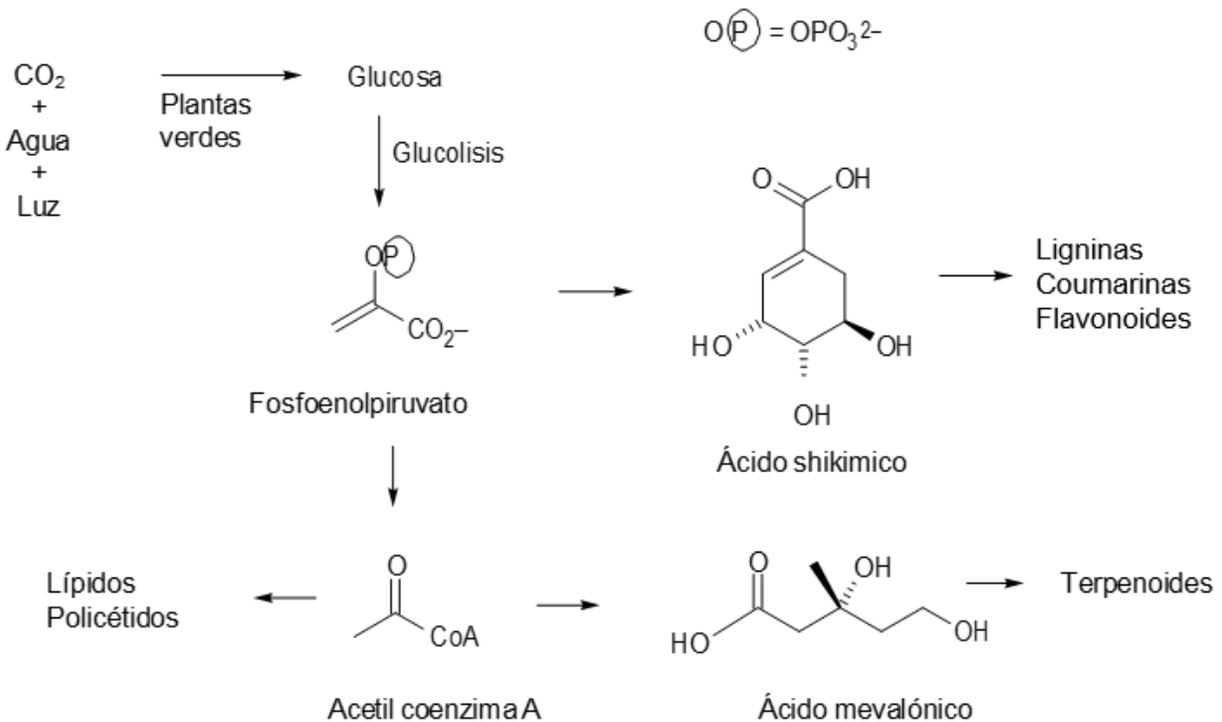


Figura 1. Rutas generales de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Sell, 2010).

2.6.2 Composición de aceites esenciales

El AE es una mezcla de diferentes sustancias orgánicas liposolubles de bajo peso molecular. Puede contener de 20 a 60 componentes principalmente de naturaleza terpénica y en menor proporción compuestos aromáticos (aldehídos, alcoholes, cetonas y ésteres) y alifáticos. Los terpenos están formados por unidades de isopreno (C5) y se dividen en: monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15); cuando el número de subunidades isoprenoides es bajo (hasta 15 carbonos) suelen ser compuestos volátiles y pueden ser olorosos y servir de intermediarios para la comunicación entre organismos (Bakkali *et al.*, 2008).

Los terpenoides son el grupo más importante de productos naturales en lo que respecta a los aceites esenciales. Algunos autores, particularmente en la literatura más antigua, se refieren a ellos como terpenos, pero este término se restringe hoy en día a los hidrocarburos monoterpenoides. Son sustancias compuestas de unidades de isopreno (2-metilbutadieno). El isopreno no se encuentra a menudo en los aceites esenciales y no es

realmente un intermediario en la biosíntesis, pero el esqueleto del 2-metilbutano es fácilmente perceptible en los terpenoides. La dirección de acoplamiento de las unidades de isopreno es casi siempre en una dirección, el denominado acoplamiento de cabeza a cola, este patrón de acoplamiento se explica por la biosíntesis de los terpenoides, Figura 2. El intermediario clave es el ácido mevalónico, que está formado por tres moléculas de acetil CoA. La fosforilación del ácido mevalónico seguida de la eliminación del alcohol terciario y la descarboxilación análogo del grupo ácido adyacente produce pirofosfato de isopentenilo. Esto puede ser isomerizado para dar pirofosfato de prenilo. El acoplamiento de estas dos unidades de 5 carbonos da una unidad de 10 carbonos, geranyl pirofosfato, adiciones posteriores de isopentenil pirofosfato conducen a 15-, 20-, 25-, etc. unidades.

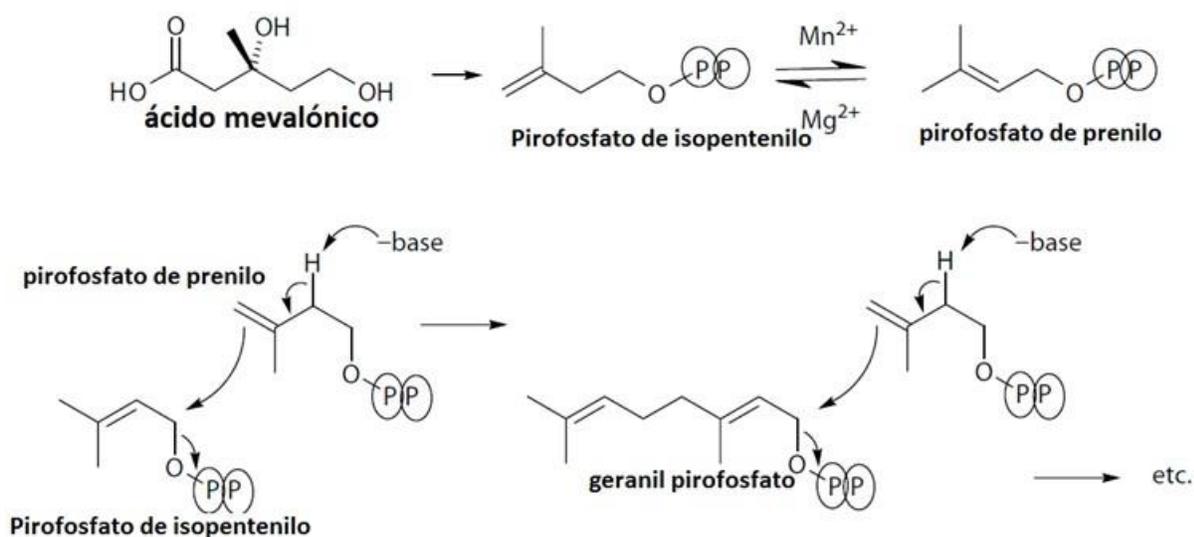


Figura 2. Acoplamiento de unidades C5 en biosíntesis de terpenoides.

2.6.3 Métodos de extracción y análisis de AE

Industrialmente se utilizan varios métodos para obtener AE. Los más comunes son la hidrodestilación y el arrastre con vapor de agua, el segundo es uno de los más importantes, en este proceso el material vegetal (intacto o picado) se coloca en un recipiente con agua y se hierva, los vapores heterogéneos se condensan en la superficie fría y por diferencias de densidad y miscibilidad el AE se separa del agua. La termo-micro destila-

ción (TAS) es otro método utilizado, el cual permite la extracción directa de los compuestos vegetales sin descomposición. (Chlodwig *et al.*, 2010). Un factor que influye en el rendimiento de la extracción de aceite esencial es el método utilizado. Para el caso de caléndula, el método que proporciona el aceite de más alta calidad (sin pigmentos) es la hidrodestilación, y contiene la mayor cantidad de compuestos, aunque requiere mucho tiempo para procesar muchas muestras de forma simultánea (Salomé-Abarca, 2015).

La obtención de extractos puede lograrse por trituración, maceración o una mezcla de los dos, y la separación de los componentes se realiza utilizando agua, hexanos, diclorometano, etanol, metanol y otros solventes orgánicos, en diferentes concentraciones. En la extracción con cloruro de metileno, el material vegetal se extrae por agitación durante 48 horas, la suspensión se filtra y se concentra con un rota evaporador. Este método es útil para extraer otro tipo de compuestos, frecuentemente incluye sustancias lipofílicas. La centrifugación es otro método que permite la separación del AE, por ejemplo, la esencia de naranja se obtiene tallando la corteza y se somete a centrifugación para separar el aceite esencial de la fase acuosa. Otras técnicas que permiten la extracción de AE son: presión en frío, extracción con CO₂, extracción con microondas y con grasas (Asbahani *et al.*, 2015).

Los métodos aplicados en el análisis de los AE permiten conocer los componentes que lo constituyen y el porcentaje de cada uno de ellos. El principal método es la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-SM). En esta técnica se identifican y cuantifican los componentes. Otra técnica que nos permite la caracterización preliminar de los aceites esenciales es la cromatografía en capa fina (CCF), la cual es muy sencilla, rápida y económica (Zellner *et al.*, 2010).

2.6.4 Importancia de los aceites esenciales

Los AE desempeñan un papel ecológico, son efectivos atrayentes de polinizadores e intervienen como moléculas de defensa frente a la pérdida de agua, patógenos y como disuasorios alimentarios. Los AE son efectivos antibacterianos, antivirales y antifúngicos debido al gran número de componentes que los constituyen. Una característica de los AE es su hidrofobicidad, ya que les permite introducirse a través de los lípidos de la membrana celular de las bacterias y causar daño a las proteínas, así mismo coagular el

citoplasma y permeabilizar la membrana provocando la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, lo cual induce la fuga de macromoléculas y consecuentemente su lisis (Bakkali *et al.*, 2008).

2.7 *Calendula officinalis* “Caléndula”

C. officinalis es originaria del mediterráneo (Naguib *et al.*, 2005), fue cultivada desde el siglo XII por egipcios, griegos, hindúes y árabes (Safdar *et al.*, 2010).

El género *Calendula* L. incluye aproximadamente 25 especies herbáceas anuales o perennes, entre las encontradas en México: *Calendula officinalis* Linn., *C. arvensis* Linn., *C. suffruticosa* Vahl., *C. stellata* Cav., *C. alata* Rech., *C. tripterocarpa* Rupr. (Baciu *et al.*, 2010). *C. officinalis* es la única cosmopolita.

Las variedades de esta planta no han sido bien descritas y certificadas, de modo que se desconoce cómo conseguirlas de manera formal. Para ilustrar, algunas variedades que se cultivan comercialmente no son homogéneas, presentan una gama amplia de características florales.

Por lo anterior, la producción de capítulos florales pueden variar de forma considerable debido a factores que afectan su crecimiento y desarrollo floral; tales como: latitud, época de cultivo, manejo del cultivo, calidad de la semilla y calidad del suelo (Coradini *et al.*, 2011).

2.7.1 Toponimia

La palabra “caléndula” viene del latín *calenda* que designaba el primer día del mes. Los romanos, sin embargo, la llamaban *solsequium*, que quiere decir “que sigue al sol”, acción que realizan las inflorescencias al igual que los girasoles.

Tiene una gran diversidad de nombres comunes. En Colombia se le llama caléndula, flor de muerto, maravillosa, botón de oro, corona de rey, caldo, flamenquilla, maravilla, caléndula oficial, chucho, espanta novios. En Estados Unidos se le conoce como pot marigold, o caléndula. Alemania: Reingelblume. En Brasil: bom-meque, mal-me-quer. En Chile: chinita. En Cuba: copetuda, mercadela, flamequilla. En España: caldo, flor de to-

dos los meses, mejicanas, flamencuella, flamequilla, tudesca, maravilla tudesca, mercadela, reinita, rosa de muertos, corona del rey. En Francia: soici, souicides jardins. México: Mercadela, maravilla, altareyna (Universidad Nacional de Colombia, 2007).

2.7.2 Descripción botánica

C. officinalis es una planta herbácea, anual, erecta, de 60 cm de altura, con tallos angulares, pubescentes y ramificados. Con hojas simples, alternas, sésiles, que pueden ser espatuladas o lanceoladas y con márgenes dentados. La hoja entera está cubierta de pelos finos muy cortos (Khalid y Teixeira, 2012).

El capítulo floral está integrado por una corola con flores liguladas y tubulares. Figura 3 Las flores masculinas tienen ovarios sólidos o uniloculares sin óvulo. En contraste, los ovarios de flores femeninas son siempre uniloculares con óvulos anátropos, unitégmicos (con un solo tegumento) y tenuinucelados. El desarrollo del saco embrionario sigue el tipo Polygonum de origen monospórico. El grano de polen maduro es del tipo de tres células (Ao, 2007). La polinización es cruzada, y el transporte de los granos de polen es realizado por diversos insectos, que son atraídos por el aroma o el color de sus flores.

El fruto es un aquenio encorvado, de 1 a 2 cm de largo, 2 a 3 mm de ancho y de 3 a 4 mm de grosor; con dos caras, una dorsal y una ventral; en la cara ventral se localiza el sitio de emergencia de la radícula durante la germinación, y en el costado dorsal se encuentran una serie de apéndices o espinas dorsales que facilitan su fijación por diferentes agentes dispersores. Dentro del fruto se encuentra la semilla y el embrión, que poseen una forma cónica. El extremo puntiagudo hacia la base del fruto corresponde a la radícula y el redondeado al ápice de los cotiledones (Victoria *et al.*, 2007).



Figura 3. Inflorescencia de caléndula, tomada en primavera de 2017 en ColPos-Montecillo

2.7.3 Metabolitos secundarios

Contiene AE compuestos por mono y sesquiterpenos oxigenados, como carbona, ionona, genarelicetona, mentona, isomentona, cariofileno, cariofilencetona, γ -terpineno, α -muuroleno, γ y δ -cadineno, pedunculatina, dihidroactiniodiólido, entre otros componentes. También contiene flavonoides, como heterósidos de isoramnetina, quercetina y numerosos compuestos saponósidos hemolíticos derivados del ácido oleanólico (calendulósidos). Sintetiza alcoholes triterpénicos como α y β -amirina, taraxasterol, calenduladiol, arnidiol, faradiol, y triterpentioles pentacíclicos. Contiene esteroides libres, esterificados y glicosilados, carotenos y xantofilas, poliacetilenos, ácidos fenólicos, taninos. Cuatro especies de caléndula han sido investigadas sus características químicas (Muley, 2009). Así mismo, Arora y Sharma estudiaron la composición química de la planta (Cuadro 1.)

Cuadro 1. Constituyentes químicos identificados en las inflorescencias de caléndula.

Metabolitos secundarios de caléndula	
Glucósidos tri-terpénicos	Calendulaglucósido A, calendulaglucósido A 6'-O- metil ester, calendulaglucósido A 6'-O- n- butil ester, calendulaglucósido B, calendulaglucósido B 6'-O- n- butil ester, calendulaglucósido C, calendulaglucósido C 6'-O- metil ester, calendulaglucósido C 6'-O- n- butil ester, calendulaglucósido D, calendulaglucósido D2, calendulaglucósido F, calendulaglucósido F 6'-O- butil ester, calendulaglucósido G 6'-O- metil ester, calendasaponinas A- D
Alcoholes triterpénicos	monoles libres y esterificados, dioles y trioles o tipo ψ - taraxastano incluyendo ψ - taraxasterol, faradiol, heliantriol B ₀ , heliantriol C, tipo taraxastano incluyendo taraxasterol, arnidiol, heliantriol B ₁ , tipo lupino incluyendo lupeol, calenduladiol, heliantriol B ₂ , tipo ursano incluyendo α - amyryn, brein, ursadiol, ursatriol, tipo oleanane incluyendo β - amyryn, maniladiol, eritrodiol, longispinogenin, heliantriol A ₁
Flavonoides	Quercetina, isoramnetina, kaempferol, rutina, hiperosido, isoquercetina, astragalina, quercetin 3-O- glucósido, quercetina 3-O- rutinosido, quercetina 3-O- neohesperidosa, quercetina 3-O- 2G- ramno- sylrutinosido, isoramnetina 3-O- glucoside, isoramnetina 3-O- rutinosido, isoramnetina 3-O- neohesperidosido, isoramnetina - O- 2G- ramnosylrutinosido
Glucósidos sesquiterpe-nos:	Officinosidos C y D
Carotenoides	Luteina, zeaxantina, flavoxantina, auroxantina, β - caroteno, luteoxantina, violaxantina, β - cryptoxantina, mutaxantina
Hidroxicoumarinas	Escopoletina, umbelliferona, esculetina
Ácidos fenólicos	ácido clorogénico, cafeico, coumarico y vanillico
Aceites volátiles	α - cadinol, T- cadinol; α - cadineno, limoneno, 1,8- cineol
Quinonas	α - tocoferol, filoquinona
Ácidos grasos:	ácido caléndico, ácido dimorfecólico
Otros:	Esteroles, mucilago, carbohidratos, resinas, taninos, aminoácidos.

2.7.4 Usos terapéuticos

Caléndula se ha extendido por todo el mundo con múltiples usos: ornamental, materia prima para la elaboración de productos de cosmetología (Andersen *et al.*, 2011), producción de tintes o de aceites (Guinot *et al.*, 2008) y para fines terapéuticos (Safdar *et al.*, 2010).

Ghorbani (2005) encontró que las partes aéreas de *C. officinalis* se usan para el tratamiento de cálculos renales y cálculos biliares. Se ha utilizado como desinfectante, anti-espasmódico y diurético (Tiwari, 2008). En España, las hojas se consideran sudoríficas. Se usa como emenagogo, diaforético y sedante (Dall, 2008). Se sabe que tiene propiedades cicatrizantes y las hojas trituradas se aplican de manera tópica sobre las heridas (Abbasi *et al.*, 2010). La cocción de las inflorescencias se ha usado para tratar quemaduras (Passalacqua *et al.*, 2007). Se ha utilizado en el tratamiento de inflamaciones de órganos internos, úlceras gastrointestinales, dismenorrea, diurético y diapofórico en convulsiones. También se usa contra las inflamaciones de la mucosa oral y faríngea, heridas y quemaduras (Yoshikawa *et al.*, 2001). La literatura ha demostrado que un té de hierbas elaborado con *C. officinalis* podría mejorar los síntomas de la colitis, las úlceras duodenales y la gastroduodenitis. Es una hierba limpiadora y desintoxicante y la infusión trata las infecciones crónicas (Blumenthal, *et al.*, 2001). Los capítulos secos se han usado como antipiréticos, antitumorales y cicatrizantes (Ukiya *et al.*, 2006). La aplicación tópica de infusión de flores se usa como antimicótico y antiséptico en heridas, esguinces y conjuntivitis (Rehecho *et al.*, 2011). El té se usa en lavados de ojos, gárgaras, erupciones de pañal y otras afecciones inflamatorias de la piel y las membranas mucosas (Safdar *et al.*, 2010).

También se ha demostrado actividad antibacterial de extractos de caléndula, para inhibir a bacterias como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus pneumoniae* y *Candida albicans* (Safdat *et al.*, 2010; Goyal y Mathur, 2011).

El extracto con cloruro de metileno-metanol (1:1) de inflorescencias ha mostrado potente actividad anti-VIH *in vitro*, basada en el ensayo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio MTT/tetrazolio. Esta actividad fue atribuida a la inhibición de HIV-1-RT, a concentraciones de 1000 µg mL⁻¹, y también como la supresión de la fusión del VIH a 500 µg mL⁻¹ (Muley *et al.*, 2009).

La planta está enlistada en la ESCOP (European Scientific Cooperative On Phytotherapy), para la cicatrización de heridas y acciones antiinflamatorias. El aceite esencial de la planta se utiliza para calmar el sistema nervioso central y como sanador de heridas (Miliauskas *et al.*, 2004).

Las preparaciones de caléndula, incluyen la pomada Traumeel®[®], carofilénica (contiene carotenoides extraídos de las flores) y tintura, es uno de los constituyentes de la medicina homeopática patentada, para el tratamiento de lesiones músculo esqueléticas.

2.7.5 Informes farmacológicos

La literatura disponible revela que de entre 12 y 20 especies de *Calendula*, solo tres especies, es decir, *C. officinalis*, *C. arvensis* y *C. suffruticosa* han sido evaluadas por sus actividades farmacológicas.

Se ha evaluado el efecto inmunomodulador *in vitro*, sobre linfocitos de sangre periférica y timocitos, de los extractos etanólicos (Amirghofran y cols, 2000). Extractos de diferentes polaridades de flores, exhibieron efectos antioxidantes sobre la peroxidación lipídica liposómica inducida por Fe²⁺ y ácido ascórbico (Popovic *et al.*, 2000). En un sistema de prueba en membranas bucales porcinas, se observaron procesos adhesivos, esto sugiere que los polisacáridos de la planta pueden contribuir a los efectos terapéuticos en el tratamiento de la mucosa irritada (Schmidgall *et al.*, 2000). El aceite esencial de las flores inhibió el crecimiento *in vitro* de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*. Extracto con acetona, de etanol y agua inhibieron el crecimiento *in vitro* del hongo *Neurospora crass*. Una fracción de flavonoides aislada de las flores, inhibió el crecimiento *in vitro* de *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida monosa*. El extracto de etanol al 50 % de la planta mostró actividad

espermicida en ratas a la concentración de 2 %. También inhibió el crecimiento de microorganismos patógenos como: *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens* (Radioza *et al.*, 2007). En cuanto a la actividad anti-fúngica se analizó el aceite esencial de las flores contra varias cepas de hongos (principalmente *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *Rhodotorella* spp. (Muley *et al.* 2009).

2.7.6 Estudios clínicos

En mujeres con heridas quirúrgicas, la aplicación local de una mezcla que contenía 70 % de extracto oleoso de *Hypericum perforatum* y 30 % de extracto oleoso de *Calendula* sp. mejoró la tasa de curación, en comparación con los controles (Lavagna *et al.*, 2001). La actividad antiinflamatoria demostrada junto con su poder cicatrizante y regenerador de epitelios justifica su amplia utilización en diversas alteraciones de la piel y en la cicatrización de heridas quirúrgicas. Relacionada con esta acción, se realizó un estudio con 245 pacientes operadas de cáncer de mama. Estas pacientes recibieron caléndula o trolamina (un rutinario tratamiento de aplicación tópica durante la radioterapia postintervención) y los resultados mostraron que la presentación de dermatitis aguda grado 2 o más alta fue significativamente más baja en pacientes que usaron caléndula en vez de trolamina (Pommier y cols, 2004); Por otro lado, Wong *et al.*, observó que la evidencia es débil para la efectividad en el tratamiento de la toxicidad cutánea inducida por la radiación. A pesar de la fuerte evidencia en el laboratorio que respalda el mecanismo de acción de la caléndula para prevenir la toxicidad cutánea inducida por la radiación, los estudios clínicos han demostrado resultados mixtos. (Kodiyan y Amber, 2015). El examen clínico de una pomada con extracto de *C. officinalis* se llevó a cabo en 34 pacientes con llagas abiertas de la pierna. Un total de 21 pacientes con 33 llagas abiertas fueron tratados con un ungüento, aplicado dos veces al día durante 3 semanas. En siete pacientes, se logró la epitelialización completa. En el grupo de control hubo una disminución del 14.52 %. Hubo una aceleración estadísticamente significativa de la cicatrización de heridas en el grupo experimental ($P < 0,05$), lo que sugiere los efectos positivos de la pomada con extracto de caléndula sobre la epitelización de las llagas abiertas (Duran *et al.*, 2005).

Otros ensayos en los que se estudia su acción antiinflamatoria son los estudios realizados en niños que presentan otalgias asociadas a otitis medias, en los que se ha comparado el tratamiento con gotas de un producto compuesto de extractos de varias plantas (*Calendula officinalis*, *Allium sativum*, *Verbascum thapsus*, *Lavandula angustifolia*, *Hypericum perforatum*) con anestésicos en gotas convencionales con o sin amoxicilina. El porcentaje de reducción del dolor en el grupo tratado sólo con el extracto es mayor que los grupos tratados con antibióticos y/o anestésicos (Sarrel y cols, 2003).

Dada la potencial promesa de caléndula como antiinflamatorio y antioxidante, ha habido numerosos desarrollos en el entorno clínico. Se ha observado que aumenta la cicatrización de la piel en la mucositis oral después del tratamiento con 5-fluorouracilo (Tanideh *et al.*, 2013). Asimismo, en un estudio aleatorizado de 40 pacientes con cáncer de cabeza y cuello que recibieron radioterapia, los que recibieron enjuague con caléndula tuvieron una intensidad menor de mucositis orofaríngea. La eficacia en estos casos se ha atribuido a flavonoides y sustancias fenólicas, conocidas por sus capacidades de eliminación de radicales libres y quelantes (eliminación de metales pesados del cuerpo) (Babae *et al.*, 2013).

Moradkhani *et al.* (2015) encontraron que la administración oral de un extracto hidroalcohólico de caléndula mejoró el aprendizaje de evitación pasiva (PAL) y la memoria de las ratas de control. La evaluación *in vivo* e *in vitro* del extracto de flor reveló que tiene un profundo efecto sobre la defensa antioxidante del sistema nervioso.

C. officinalis fue eficaz para el tratamiento de vaginosis bacteriana en mujeres en edad reproductiva, sin efectos secundarios (Pazhohideh *et al.*, 2018)

2.7.7 Toxicología

Los estudios de toxicidad aguda en ratas y ratones indican que el extracto no es tóxico. Las pruebas en animales mostraron como mínimo una irritación mínima de la piel, y ninguna sensibilización o fototoxicidad. Se observó irritación ocular mínima con una formulación y ninguna irritación con otras. Seis saponinas aisladas de flores de *C. officinalis* no fueron mutagénicas en una prueba de Ames (ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim*), y un té no fue genotóxico en *Drosophila melanogaster*. No

se cuenta con datos de carcinogenicidad o toxicidad reproductiva y de desarrollo. Las pruebas clínicas de formulaciones cosméticas que contienen el extracto provocaron poca irritación o sensibilización, aunque según este estudio habría que realizar más ensayos (Autores no listados, 2001).

En general, la caléndula es segura, aunque conlleva un pequeño riesgo de inducir dermatitis de contacto, a diferencia de otros polifenoles tópicos (Calapai *et al.*, 2014). Las concentraciones convencionales de formulaciones tópica, incluyendo el extracto de flor que varía desde concentraciones de 0.0001 % a 0.8 % y aceite de flores desde concentraciones de 0.02 % a 0.1 %, son seguras.

Por otra parte Re *et al.*, (2009) demostraron mediante análisis toxicológicos que un extracto alcohol/agua con dosis de hasta 500 mg kg⁻¹ día⁻¹ no producían cambios significativos en la masa corporal en ratas; además, establecieron una dosis de seguridad de 300 mg para una persona de 60 kg.

III. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DEL AE DE CALÉNDULA SOBRE *E. coli*

3.1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es parte de la flora normal en el intestino en humanos y animales. Sin embargo, también es la causa más frecuente de infecciones urinarias, infecciones en el torrente sanguíneo en todas las edades, meningitis en recién nacidos y uno de los principales agentes de infecciones transmitidas por alimentos en todo el mundo, provocando aproximadamente 280 millones de casos de diarrea y 400,000 muertes anualmente en el mundo, la mayoría de ellas en niños pequeños (Steffen *et al.*, 2015).

Aunado a lo anterior, la resistencia a los antimicrobianos de esta bacteria se ha detectado en todas partes del mundo y es uno de los mayores desafíos para la salud pública, por lo que este trabajo presenta una alternativa a este problema con el uso de plantas aromáticas, específicamente el efecto antibacterial del aceite esencial de caléndula

3.2. MATERIALES Y METODOS

Todas las fases de experimentación se llevaron a cabo en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Está ubicado en: Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo,

Texcoco 56230, Estado de México a 2250 m de altitud entre las coordenadas N 19°28'4.26" y W 98°53'42.18". El clima es templado con lluvias en verano, temperatura media anual de 15.9°C y una precipitación media anual de 710.3 mm.

3.2.1 Producción de inflorescencias

Identificación taxonómica

Se colectaron semillas y plantas de los jardines del Colegio de Postgraduados (CP) Campus Montecillo, Las plantas fueron identificadas en el herbario del posgrado de Botánica del CP.

Propagación

La producción de caléndula consistió en sembrar semillas en bolsas negras de polietileno de 5 cm de diámetro en un sustrato: turba: agrolita: suelo (2:2:1 v/v). Así mismo se trasplantaron plántulas con 10 cm de altura para acelerar el proceso de producción. Esta actividad se realizó en el mes de febrero de 2017 con condiciones de 20 a 30° C.

Trasplante

Después de 120 días de la propagación (tamaño de 10 a 15 cm), se trasplantaron al campo experimental Montecillo lote 8b en una superficie de 200 m². La distancia entre surcos fue de 70 cm y entre plantas 30 cm para obtener una densidad aproximada de 420 plantas. Este diseño topológico se recomienda para lugares de producción bajo temporal y a una hilera. Se aplicó Fusilade ® (Fluazifop) un herbicida sistémico post-emergente para el control de gramíneas a una dosis de 1 L ha⁻¹.

Labores culturales en campo

Los cuidados más frecuentes fueron el riego, la eliminación de malezas y el control de plagas y enfermedades.

Durante su desarrollo en campo al cultivo se le aplicó riego por gravedad una vez por semana. Los deshierbes dependieron de la aparición de malezas, por lo menos cada tres semanas se llevaron a cabo dada la incidencia de éstas: Lengua de vaca (*Rumex* sp.), coquillos (Cyperaceae), diversos tipos de gramíneas, quelites (*Amaranthus* sp.), son

ejemplos de las malezas que se presentaron. Durante el periodo de floración se realizaron aporques para disminuir la compactación del suelo y facilitar su aireación.

Con respecto a la fertilización, se usó 10 kg de fertilizante mineral a base de fosfato diamónico DAP (18-46-00), tres veces en el ciclo de producción.

Las plagas encontradas fueron principalmente pulgones (*Myzys* sp.), minadores de la hoja (*Liromiza* sp.) y larvas de lepidópteros. Se presentó, principalmente, en la etapa previa a la floración y se controlaron sus poblaciones con una aplicación de cipermetrina a dosis de 0.5 L/ha. Figura 4.



Figura 4. Labores culturales del cultivo de caléndula. a) en época de lluvias las malezas compiten demasiado con el cultivo, b) se realizaron deshierbes manual y químico, y c) fue necesaria la aplicación de un insecticida.

Cosecha

La cosecha de capítulos florales se hizo cuando la inflorescencia estuvo en floración plena en verano de 2017. Figura 5. a). El corte se hace en el pedúnculo (de 0.5 cm), en

forma manual y escalonada, es decir, a medida que las flores abren por completo. Se obtuvieron ocho cortes.

Secado de capítulos florales

Los capítulos cosechados fueron secados por 7 días a la sombra a temperatura ambiente (18° C) como se observa en la Figura 5. b). Posteriormente pesados en una balanza analítica.



Figura 5. Cosecha y secado de capítulos florales de caléndula, a) cosecha manual en las primeras horas del día, b) secado de inflorescencias.

3.2.2 Obtención del aceite esencial

Método de arrastre de vapor

El material vegetal para extracción de AE consistió de capítulos florales secos de caléndula cosechados de julio a noviembre de 2017.

El material se colocó en un destilador para arrastre de vapor de AE con capacidad de 30 L, y se destiló durante 2 h.

Una vez transcurrido este tiempo, se recuperó la emulsión de agua con aceite y éste se extrajo con 50 mL de cloruro de metileno (CH_2Cl_2) por tres veces, también se le agregó

sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) con el objetivo de retirar el agua que pudo haber quedado en la muestra. Posteriormente se concentró en un rotavapor Büchi B-480® con vacío y baño María a 20 °C hasta evaporar la mayor cantidad de disolvente (cloruro de metileno) posible. El aceite que quedó depositado en el matraz se transfirió a un vial de 1.5 mL con ayuda de una pipeta Pasteur y se guardó a 4° C.

Cálculo de rendimiento

El rendimiento de aceite se calculó multiplicando el peso del aceite libre de solvente por 100 y dividiéndolo entre el peso del material vegetal seco inicial. Se hicieron cuatro repeticiones para este método.

3.2.3 Cromatografía

Cromatografía en capa fina

En la cromatografía en capa fina, se usaron disolventes grado analítico y placas de sílica gel (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV), 0.20 mm de espesor, de 5 X 5 cm. Con ayuda de una microjeringa se aplicaron 20 µL de la muestra de aceite esencial. La placa se colocó en una cámara con un eluyente compuesto de tolueno-acetato de etilo (93:7 v/v); cuando el sistema se saturó la placa se colocó en la campana de extracción para que se evaporara el disolvente.

Cuando la placa se secó, se observó a luz ultravioleta para marcar los compuestos presentes en el AE. Posteriormente la placa fue asperjada con un revelador de vainillina-ácido sulfúrico y se calentó durante 5 minutos a 100°C en una estufa marca LC-Oven LAB-LINE.

Para obtener el valor del R_f (Relación de frentes), el cual es una relación de distancias, y se expresa como el cociente entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por el disolvente hasta el frente

Se calculó con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se midió desde el centro de la mancha.

Análisis del aceite esencial por cromatografía de gas

La composición química del aceite esencial de caléndula se obtuvo al correr las muestras en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria de la Facultad de Química – UNAM, en un Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas marca GC-MS (por sus siglas en inglés) LECO, modelo Pegasus 4D, con analizador Tiempo de Vuelo. El sistema GC-MS usó una columna HP-5MS (DB5) / 10m x 0.18mm x 0.18 mm de grosor de fase estacionaria, Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza) como gas acarreador, a un flujo de 1 mL min⁻¹.

3.2.4 Bioensayos

Cultivo de la cepa E coli

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* EHEC (enterohemorrágica) donada por el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Esta cepa presenta multiresistencia a los antibióticos: amoxicilina / ácido clavulánico, colistina, eritromicina, gentamicina y neomicina (Gómez-Aldapa *et al.*, 2016)

La batería se activó y cultivó en una placa Petri con medio de cultivo sólido eosina azul de metileno agar (EMB) (BD®), medio para el aislamiento y la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos (Enterobacteriaceae y diversos otros bacilos Gram negativos).

Se sembró haciendo estrías con una asa impregnada de la cepa *E. coli* y se colocó en una incubadora BD 53 L - Binder a 36°C durante 24 h.

Trascurrido ese tiempo, se colectó todo el crecimiento bacteriano en un tubo Falcon® de 50 mL con agua destilada y estéril, se colocó a refrigeración 4° C para su uso posterior.



Figura 6. Apariencia del cultivo de *E. coli* en medio de cultivo Eosin Metilen Blue (EMB).

Actividad antibacteriana del AE

La actividad antibacteriana del AE de caléndula frente a *E. coli* se evaluó mediante el protocolo de prueba de susceptibilidad a la difusión del disco Kirby-Bauer. Se preparó medio de cultivo EMB, se esterilizó y se vació en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Derivado de la cuenta en placa por diluciones seriadas se preparó el inóculo bacteriano estandarizado en 1×10^8 células mL^{-1} de cada bacteria, en la cual las colonias individuales no fueron evidentes a través de la placa, por lo que el inóculo no fue demasiado. De este inóculo se vertieron 100 μL en cada caja Petri y con una varilla de vidrio tipo Drigalski, esterilizada a la llama, se estrió en un patrón radial.

El AE de cada tratamiento se diluyó con cloruro de metileno a diferentes concentraciones: 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y AE puro. Después se colocó un disco de papel filtro Whatman® N°1 esterilizado de 5 mm de diámetro en el centro de las cajas Petri, previamente saturado con 10 μL de la concentración correspondiente de AE. Cada disco se presionó hacía el medio de cultivo para garantizar el contacto completo con la superficie del agar para no producir halos de zonas irregulares. Se tuvieron 13 tratamientos del aceite esencial se evaluaron concentraciones de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, testigo con agua destilada, testigo positivo con amikacina y testigo con solvente cloruro de metileno.

Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h en incubadora BD 53 L – Binder. Se colocaron de tal manera que la tapa quedara hacia abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersaran su crecimiento.

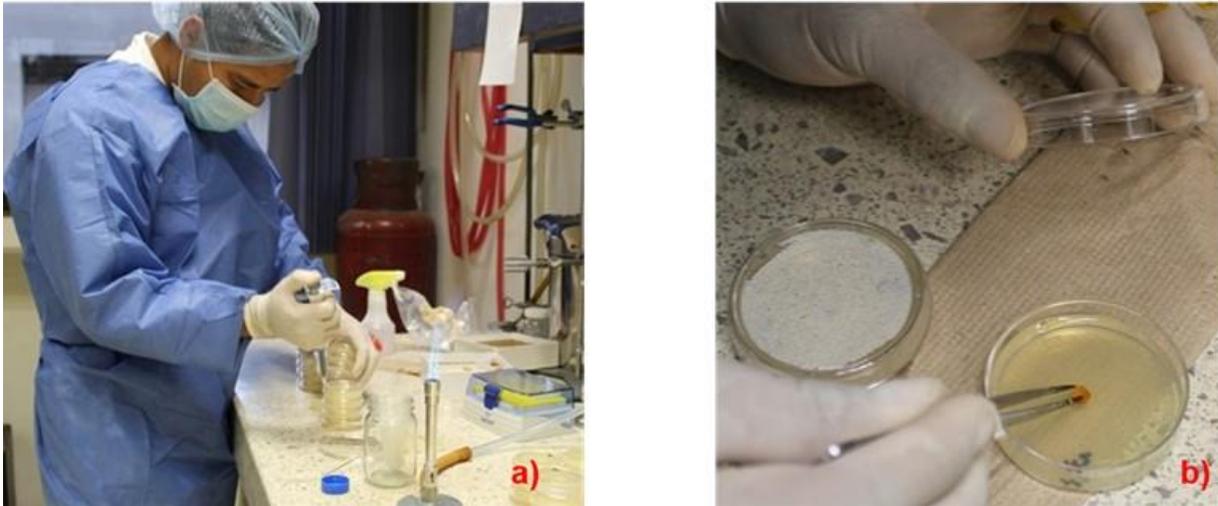


Figura 7. Bioensayo. a) Sembrado y estriado, b) colocación de papel filtro Whatman® impregnado con un tratamiento.

Cuenta en placa diluciones seriadas

Con el propósito de saber el contenido de microorganismos viables inoculados en cada caja Petri se procedió con la técnica de cuenta en placa diluciones seriadas, la cual se basa en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un gramo o mililitro de muestra.

El procedimiento consistió en hacer diluciones de una muestra. En este caso se tomaron 100 μ L de la solución de bacterias de los tubos Falcon® mencionados anteriormente, se colocó en un tubo Eppendorf® con un mL de agua destilada y estéril. Se agitó con un vórtex, enseguida se tomó 100 μ L de esta solución y se procedió de la misma manera 9 veces para tener diluciones 10^{-1} hasta 10^{-8} . Una vez teniendo las diferentes diluciones se procedió a sembrar las alícuotas en medio EMB, con cuatro repeticiones. Se incubaron las cajas de Petri a 35° C durante 24 h. Pasado el tiempo se evaluó la cantidad de microorganismos creciendo en los medios de cultivo, se calculó el promedio y la concentración de las UFC.

Concentración mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizó por medio de la técnica de dilución en agar. La CMI es la concentración mínima de un fármaco que extermina al 99.9 % del inóculo. El método se basó en la preparación de una serie de cajas Petri con medio de cultivo EMB, a los cuales se le agregó el AE de caléndula en distintas concentraciones. Luego se inocularon cada una de las placas con una suspensión estandarizada de 10^8 UFC de *E. coli*. Las pruebas se examinan después de incubar a $35 \pm 2^\circ$ C por 24 horas bajo condiciones aeróbicas y se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del AE frente al *E. coli*.

El valor de CIM utilizados para indicar que se trata de una cepa sensible es ≤ 4 ($\mu\text{g/mL}$), intermedio de 8 a 16 $\mu\text{g/mL}$ y de ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ para cepas resistentes.

Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de ± 1 dilución. Para evitar gran variabilidad en los resultados, se debe estandarizar y controlar cuidadosamente la prueba de dilución

Control positivo sulfato de amikacina

El sulfato de amikacina (equivalente a 500 mg de amikacina) fue obtenido de Laboratorios Pisa, S.A. de C.V. lote B17D560. Pertenece al grupo de los aminoglucósidos, bactericidas que detienen el crecimiento bacteriano actuando sobre sus ribosomas y provocando la producción de proteínas anómalas. Su modo de acción es a nivel de ribosomas en la subunidad 30S bacteriana, y por ende, a nivel de síntesis de proteínas. Tienen actividad especialmente en contra de bacterias Gram negativas y aeróbicas. La amikacina tiende a ser especialmente efectiva en contra de organismos resistentes. Aun así los mecanismos de resistencia están dados por la producción de enzimas inactivantes en plásmidos, por la disminución de la entrada del antibiótico y por la alteración de las proteínas ribosómicas diana.

3.2.5 Variables evaluadas

Diámetro de inhibición

Las repeticiones de los tratamientos y las múltiples mediciones eliminan el error por zonas irregulares debido al contacto incompleto del papel filtro.

Luego de la incubación, todas las cajas Petri fueron fotografiadas y escaneadas con una multifuncional HP Deskjet con la finalidad de medir digitalmente los halos de inhibición que rodea al disco, usando el software libre GIMP (GNU Image Manipulation Program) se editó el umbral de las imágenes con el fin de transformarlas en imagen blanco y negro, donde los pixeles blancos representan los pixeles de la imagen cuyo valor está en el intervalo del umbral, y los negros el valor que está fuera de éste. Lo anterior para tener una medición cómoda y confiable. Se midieron los tamaños de la zona al milímetro más cercano usando el programa de procesamiento de imagen digital IMAGEJ. Se incluyó el diámetro del disco en la medición. Al medir los diámetros de zona, se redondeó siempre al siguiente milímetro.

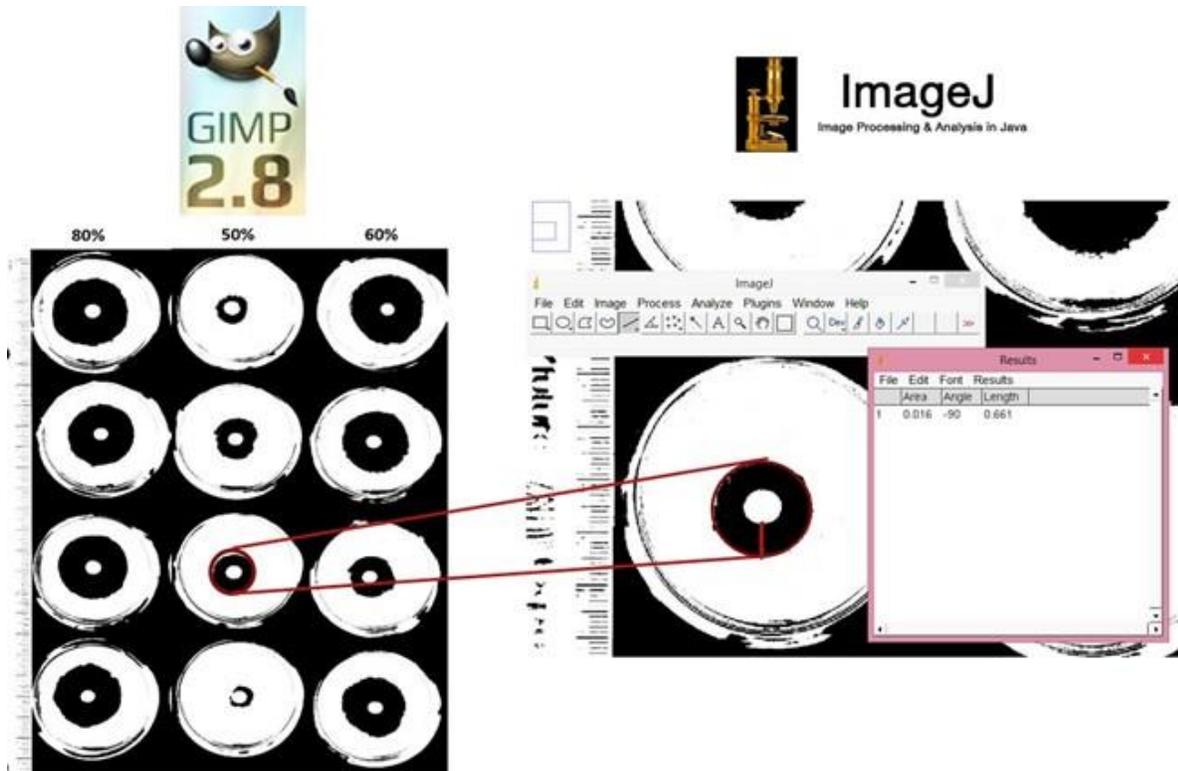


Figura 8. Programas de procesamiento y análisis de imágenes con los que se midieron las zonas oscuras que representan los halos de inhibición

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DECA) con el modelo lineal general. La unidad experimental fue una caja Petri con la cepa bacteriana. Se tuvieron 18 tratamientos con 4 repeticiones, sumando 72 unidades experimentales. Se realizó análisis de varianza, y comparación de medias con Tukey (α , 0.05). Se utilizó el paquete estadístico SAS® versión 9.0.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Aceite esencial

Rendimiento

El rendimiento fue de 0.122 mg de AE g⁻¹ de materia seca, es decir 122 mg kg⁻¹ de capítulos florales secos de caléndula. El porcentaje es de 0.012 %. El rendimiento encontrado en la literatura es variable y va desde 0,02 % (Iordanov, 1976) 0.2 % (PDR, 2000) y 0.3 % en el experimento por Chalchat *et al.*, 1991, cultivadas en la región del macizo central francés, donde esta planta es nativa y crece a bajas temperaturas.

Los valores de rendimiento son variables toda vez que éstos dependen del material fresco o seco (Okoh *et al.*, 2008) debido a que los componentes que se pierden en las partes secas, son aquellos almacenados en o cerca de las superficies de las flores. El secado de la planta tiene gran importancia para la preservación de los principios activos. Desde 1984, Omelchuk planteó la necesidad de secar las flores inmediatamente después de su colecta ya que su almacenamiento por 3.5 h en sacos de polietileno conllevan una pérdida del 28-30 % de los carotenoides y del 24-26 % de los flavonoides; se recomienda la temperatura de 80 °C para secar el material vegetal porque se obtienen los mayores rendimientos de carotenoides y flavonoides.

Análisis del aceite esencial por cromatografía de capa fina

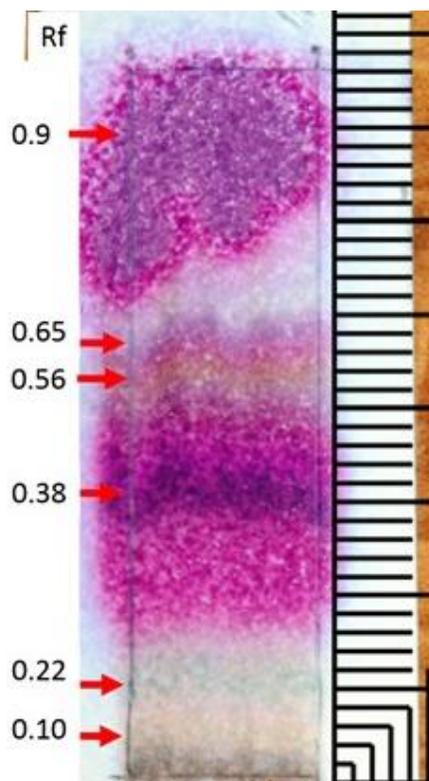


Figura 9. Cromatoplaqueta de sílice con el aceite esencial revelado en donde se observan los diferentes Rf de sus componentes.

Los resultados en las placas de sílica gel con la aplicación de revelador de Vainillina-Ácido Sulfúrico se muestran en la Figura 9.

En el Cuadro 2 se describen los Rf para cada compuesto observado. Los Rf obtenidos coinciden con los que han sido reportados en la literatura, tomando en cuenta que un mismo compuesto eluye igual en cromatogramas realizados en las mismas condiciones (mismo soporte y mismo eluyente).

La observación semicuantitativa de las manchas más grandes corresponde a los compuestos más abundantes, es decir; el germacreno y el cadineno tienen más concentración en el aceite de caléndula.

Cuadro 2. Rf de compuestos identificados por CCF.

Mancha	Color (revelado con Vainillina - Ácido Sulfúrico)	Rf	Compuesto	Referencia
1	Amarillo	0.10	Cubebeno	Rasgado <i>et al.</i> , 2016
2	Verde	0.22	Cariofileno	Wagner y Bladt, 2001
3	Morado fuerte	0.38	Germacreno	Cunico <i>et al.</i> , 2007
4	Amarillo	0.56	No identificado	
5	Lila	0.61	No identificado	
6	Morado	0.9	Cadineno	Wagner y Bladt, 2001

En el trabajo de Cunico *et al.*, 2007 encontraron actividad antimicrobiana en compuestos de caléndula con Rf 0.3 que posteriormente se identificaron como: α -copaeno (Rf 0.35) y β -cariofileno (Rf 0.30). El compuesto con Rf 0.3 también contenía cantidades más pequeñas de α -cubebeno, y germacreno.

Análisis de los compuestos químicos del AE por CG/EM

El aceite esencial se clasifica como sesquiterpenoide debido a que está compuesto por 95.85 % de sesquiterpenos y un 4.15 % de hidrocarburos encontrados en ceras. La composición química del aceite de los capítulos de *C. officinalis* se resume en el Cuadro 3. Los dos componentes más abundantes encontrados (germacreno y cadineno) son sesquiterpenos no oxigenados que representan el 76.4 % de la totalidad del aceite. Esto concuerda con Salome, 2015 que encontró al cadineno como el compuesto más abundante en todos los morfotipos florales de caléndula que estudió.

Como se observa en la Figura 10. La forma bien definida de los picos muestra la mejor eficiencia de separación de un isómero del germacreno.

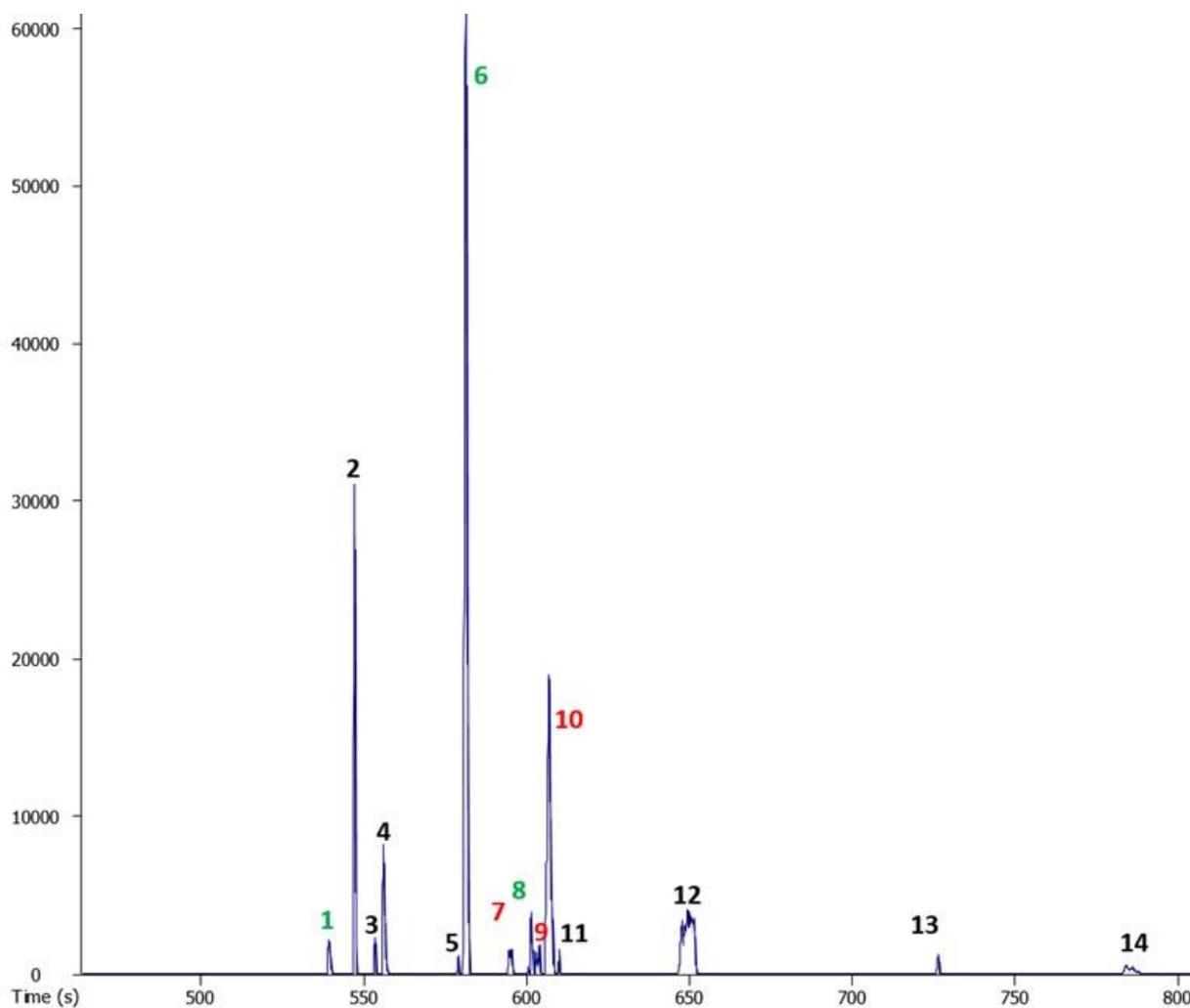


Figura 10. Cromatograma obtenido por CG del AE de *C. officinalis*

Cuadro 3. Principales compuestos identificados por CG/EM del aceite esencial de las florales frescas de caléndula.

N°	Nombre químico	Nombre común	Área (%)	TR (s)
1	(-)- α -cubebeno	Cubebeno	2.29	549.8
2	(-) - α -copaeno	Copaeno	1.00	555
3	(\pm) - α - humuleno	Alfa cariofileno	2.31	581.6
4	Isoledeno	Isoledeno	1.60	584.9
5	Naftalen, 1,2,4a,5,6,8a- hexahidro-4,7- dimetil-1-(1- metiletil)- (1S-cis)-	Alfa amorfeno	12.37	597.9
8	1,6-Ciclododecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-, [s-(E,E)]-	Germacreno D	22.58	604

9	Naftalen, 1,2,3,5,6,8a- hexahidro-4,7- dimetil-1- (1- methylethyl)-, (1S-cis)-	Cadineno	41.51	606.9
11	Seychellene	Seycheleno	4.64	612.1
12	α -Muurolene	Muuroleno	7.57	649.5
13	Eicosane	Icosano	2.64	727.7
14	Heptadecano, 2,6,10,15- tetrametil-	Heptadecano	1.50	785.7

Los germacrenos se producen típicamente en especies de plantas con propiedades antimicrobianas e insecticidas y en este caso, en abundancia con cadineno, contrario a lo que menciona Setzer (2008), que señala que los aceites esenciales que contienen altas concentraciones de germacreno tienen menores proporciones de cadineno.

Aunque el efecto antibacteriano de un aceite esencial depende de la mezcla de metabolitos, se puede atribuir su actividad a sus componentes mayoritarios, tal es así que, cadineno es antiinflamatorio, diurético y antiséptico (Kaufman *et al.*, 1999), el germacreno tiene efectos disuasorios contra herbívoros, actividad insecticida, repelente contra áfidos y garrapata, actividad antimicrobiana (De Lima *et al.*, 2010), citotóxico (Palazzo *et al.*, 2009) y antibacterial contra *Pseudomonas syringae*. Šarac *et al.*, 2014 observaron en estudios *in silico* el efecto inhibitorio del germacreno en la proteína del citoesqueleto FtsZ (un homólogo procariótico de tubulina) inhibiendo la división celular de las bacterias. El cariofileno ha demostrado ser activo contra *S. aureus* (De Lima *et al.*, 2010), el cubebeno inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Sharifi-Rad, 2014) finalmente, el copaeno tiene propiedades antimicrobianas.

En el caso de los AE, la calidad se determina por su composición química, ya que de ella dependen las propiedades que se atribuyen a estas sustancias. La mayor cantidad relativa del cadineno es la característica que más se valora, aunque dado el efecto sinérgico que existen entre constituyentes, una cantidad excesivamente alta de un único componente tampoco es deseable.

Es importante mencionar que su composición química, como toda planta medicinal, varía de acuerdo con la forma, tiempo de colecta, secado, a las condiciones climáticas, al suelo

y a las distintas técnicas de cultivo, por lo que no es raro encontrar en la literatura diferentes compuestos y sus concentraciones.

El factor edáfico también es importante, ya que el suelo donde se cultivaron las plantas es salino, lo que se correlaciona con Khalid y Teixeira, 2012 que encontraron que la irrigación con agua salina aumentó el contenido de cadinol y cadineno, como una respuesta al estrés.

3.3.2 Actividad antibacteriana sobre *E. coli*

Diámetro de inhibición

El AE mostró tener un gran potencial de la actividad antibacteriana contra *E. coli*, esto de acuerdo a la interpretación de las zonas de inhibición (en mm) para la prueba de susceptibilidad a antibióticos Kirby-Bauer y a las diferencias significativas en las diferentes concentraciones del aceite.

Con el análisis estadístico se encontraron grupos de susceptibilidad que se muestran en la figura 11. Esta bacteria resultó ser susceptible a los tratamientos de 100 a 70 % de dilución del AE, con diámetros promedios de 30, 28, 27 y 26 mm respectivamente, mientras que las concentraciones de 60-40 % tuvieron un efecto intermedio (23, 20, 16 mm), por su parte los niveles de 30-10 % permitieron a la bacteria crecer relativamente sin problemas. Todos los niveles de dilución mostraron un efecto visible y tuvieron un brillo verde metálico debido a la rápida fermentación de la lactosa y producción de ácidos fuertes, como se muestra en la Figura 12.

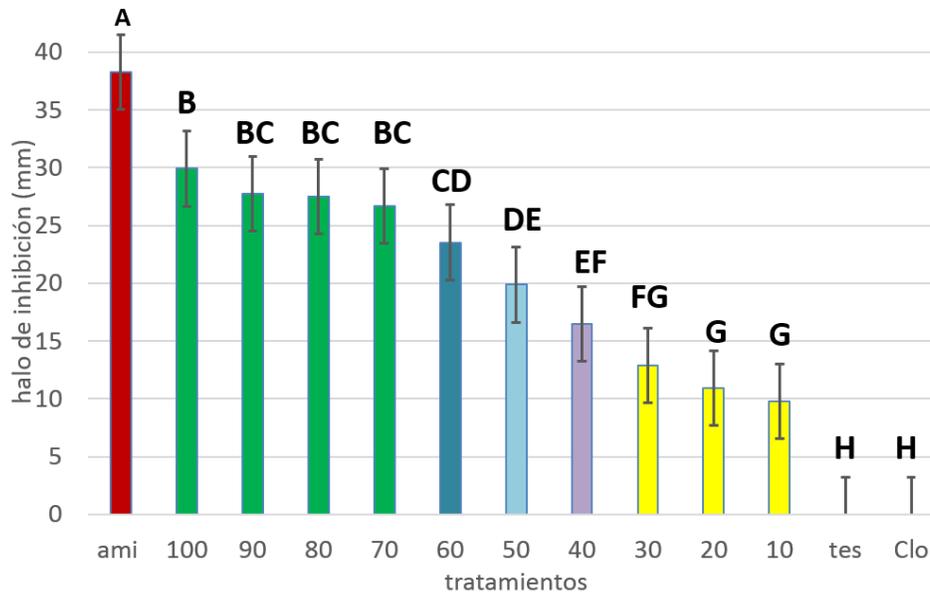


Figura 11. Actividad bactericida del AE de *C. officinalis* sobre el crecimiento de *E. coli*. Tratamientos expresados en porcentaje de AE (100-10 %), testigo positivo: amikacina (ami), testigos negativos: agua destilada (tes) y CH_2Cl_2 (Clo). Cada punto es el promedio de 4 repeticiones \pm Es. Letras diferentes corresponden a tratamientos estadísticamente distintos ($p > 0.0001$, $\alpha = 0.05$, Tukey).

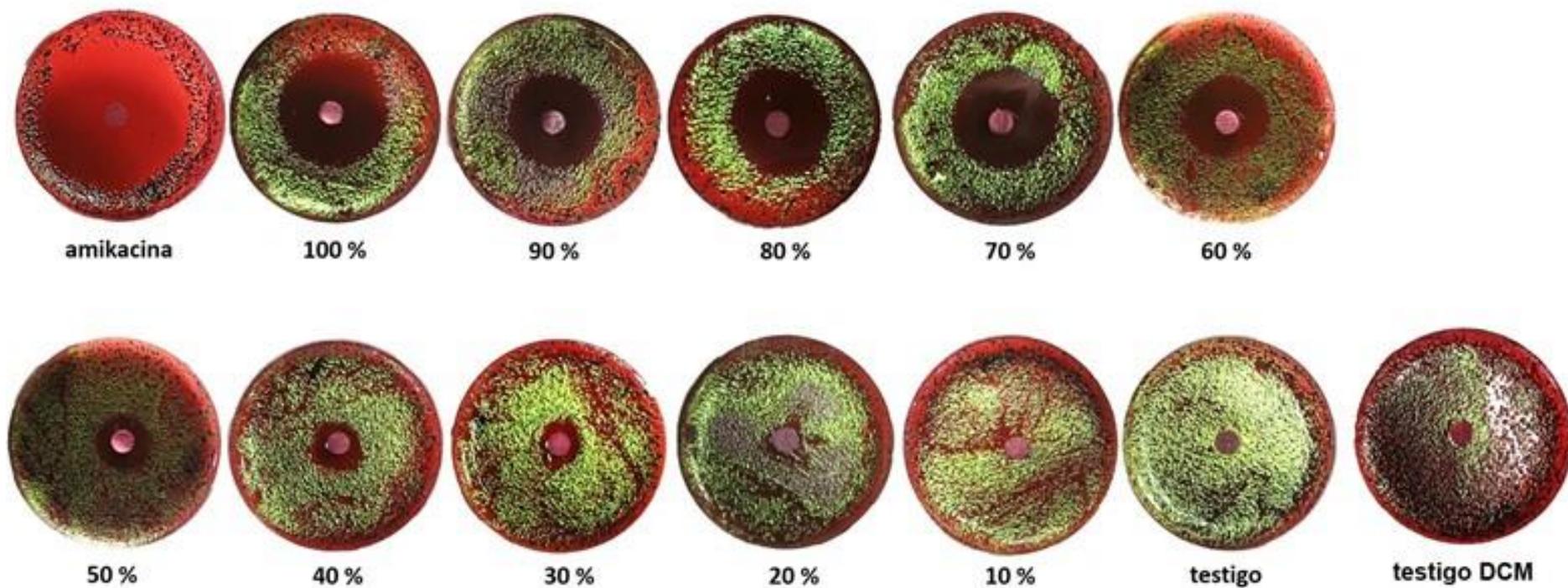


Figura 11. Halos de inhibición de los diferentes porcentajes de AE. Los niveles van de 100% hasta 10% y se comparan con un antibiótico comercial (amikacina), el testigo (agua destilada) y el testigo DCM (cloruro de metileno). Estos resultados son similares a lo reportado por Radioza *et al.*, 2007 que encontró que el AE de caléndula inhibió el crecimiento *in vitro* de *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, esto se debe a que su AE es rico en sesquiterpenos los cuales actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos que son capaces de intercalarse en los lípidos de la membrana celular bacteriana, distorsionando su estructura y haciéndola más permeable (Devi *et al.*, 2010).

Aunque el efecto antibacteriano de un AE depende de la mezcla de metabolitos, se pueden atribuir su actividad a sus componentes mayoritarios, este AE es rico en compuestos como cadineno (Salome-Abarca *et al.*, 2015) el cual es antiinflamatorio y antiséptico (Kaufman *et al.*, 1999); germacreno que tiene actividad insecticida contra mosquitos, además de su conocida actividad antimicrobiana (De Lima *et al.*, 2010), citotóxico (Palazzo *et al.*, 2009) y antibacterial contra *P. syringae*; el cariofileno ha demostrado ser activo contra *S. aureus* (De Lima *et al.*, 2010), el cubebeno inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Sharifi-Rad, 2014).

A partir de las evidencias encontradas en la literatura científica y los resultados en este trabajo, se considera que los sesquiterpenos podrían ser el principio activo más importante en la acción antibacterial de esta planta debido tanto a sus acciones farmacológicas como a su abundancia en la planta, aunque no se descarta la acción de otros principios activos como flavonoides a los que se les atribuye acciones antibacterianas y antialérgicas, además se correlaciona con la fecha de siembra, en la que los mayores contenidos de flavonoides se registran en siembras del mes de junio (Russo *et al.*, 2015).

Concentración mínima inhibitoria

Las pruebas realizadas demostraron que la CMI del aceite esencial de *C. officinalis* contra *E. coli* fue de 70 µg/mL por lo que se coloca en el límite entre susceptibilidad e intermedio. Para esta especie Shah y Williamson reportan CMI de 50 - 70 mg/ml para el extracto metanólico en la misma bacteria, debido a la gran diferencia de compuestos que presenta el aceite esencial respecto a cualquier extracto.

3.4. CONCLUSION

El aceite esencial de *C. officinalis* podría ser considerado como un posible candidato para ser utilizado como un remedio de origen herbolario para tratar la infección causada por *E. coli*.

IV. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DEL ACEITE DE CALÉNDULA SOBRE *S. enterica*

4. 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por *Salmonella* son otro importante problema de salud pública en todo el mundo. La salmonela es un agente infeccioso causante de enfermedades, que se transmite por los alimentos en los seres humanos a nivel mundial. Con aproximadamente 1,700 millones de casos de enfermedades diarreicas cada año (WHO, 2017). La diarrea es una de las principales causas de malnutrición y la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años, y mata a 760,000 niños menores de cinco años cada año. En nuestro país no existen datos epidemiológicos y los costos que genera, pero en los Estados Unidos de América en 2011, el costo para los pacientes hospitalizados que padecen infecciones gastrointestinales fue de más de \$ 6,7 mil millones de dólares (USDHHS, 2011). Por ello, las gastroenteritis por *Salmonella* spp. es una carga considerable tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo, siendo la principal causa de hospitalización (35 %) y muerte (28 %) por enfermedad diarreica.

Por si fuera poco, esta bacteria ha creado multirresistencia debido al uso indiscriminado de antibióticos comerciales. Esta situación, así como la aparición de efectos secundarios de ciertos antibióticos, requiere buscar nuevas alternativas antimicrobianas en las plantas. Evaluar el efecto de plantas tradicionalmente usadas como antimicrobianos da certidumbre científica a su uso, en este caso, se midió el efecto del aceite esencial de caléndula sobre esta enterobacteria.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1 Bioensayo

Cultivo de la cepa *Salmonella enterica*

Se utilizó la cepa de *S. enterica* serotipo Typhi, donada por el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Para activar la cepa bacteriana se cultivó en una placa Petri con medio de cultivo sólido Luria Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 1 L de agua destilada). Utilizando una asa bacteriológica se hicieron estrías en el medio, posteriormente se colocó en una incubadora BD 53 L - Binder a 36°C durante 24 h.

Trascurrido ese tiempo, se colectaron todas las bacterias en un tubo Falcon® de 50 mL con agua destilada y estéril, se colocó a refrigeración 4° C para su uso posterior.

El medio de cultivo utilizado para *S. enterica* no fue EMB como en el caso de *E. coli* debido a que los miembros del genero *Salmonella* sp. no poseen enzimas para fermentar la lactosa y las colonias se observan incoloras o con tonalidad ámbar, lo mismo que con el medio LB.



Figura 123. Apariencia del cultivo de *S. enterica* en medio LB, después de 48 h de incubación.

Actividad antibacteriana del AE

La actividad antibacteriana del AE de caléndula frente a *S. enterica* se evaluó mediante el protocolo de prueba de susceptibilidad a la difusión del disco Kirby-Bauer. Se preparó medio de cultivo LB, se esterilizó y se repartió en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Derivado de la cuenta en placa por diluciones seriadas se preparó el inóculo bacteriano estandarizado en 1×10^8 células mL^{-1} de cada bacteria, en la cual las colonias individuales no fueron evidentes a través de la placa, por lo que inóculo no fue demasiado ligero y la prueba es válida. De este inóculo se vertieron 100 μL en cada caja Petri y con una varilla de vidrio tipo Drigalski esterilizada a la llama se estrió en un patrón radial.

El AE de cada tratamiento se diluyó con cloruro de metileno a diferentes concentraciones de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %. Después se colocó un disco de papel de filtro Whatman® N°1 esterilizado de 5 mm de diámetro en el centro

de las cajas Petri, previamente saturado con 10 μ L de la concentración correspondiente de AE. Cada disco se presionó hacia el medio de cultivo para garantizar el contacto completo con la superficie del agar para no producir formas de zonas irregulares. Se tuvieron 13 tratamientos del aceite esencial se evaluaron concentraciones de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, testigo con agua destilada, testigo positivo con amikacina y testigo con solvente cloruro de metileno.

Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h en incubadora BD 53 L – Binder. Se colocaron de tal manera que la tapa quedara hacia abajo para evitar que gotas de agua condensada pudieran caer sobre los microorganismos y dispersaran su crecimiento.

Concentración mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizó por medio de la técnica de dilución en agar. La CMI es la concentración mínima de un fármaco que extermina al 99.9 % del inóculo. El método se basó en la preparación de una serie de cajas Petri con medio de cultivo LB, a los cuales se le agregó el AE de caléndula en distintas concentraciones. Luego se inocularon cada uno de las placas con una suspensión estandarizada de 10⁸ UFC de *S. enterica*. Las pruebas se examinaron después de incubar a 35 \pm 2° C por 24 horas bajo condiciones aeróbicas y se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del AE frente a la bacteria.

El valor de CIM utilizados para indicar que se trata de una cepa sensible es \leq 4 (μ g/mL), intermedio de 8 a 16 μ g mL⁻¹ y de \geq 32 μ g/mL para cepas resistentes.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La bacteria fue susceptible a los tratamientos del 100 al 60 % de dilución del AE, con diámetros promedios de 29, 28.5, 28, 27 y 26 mm respectivamente, mientras que las concentraciones de 50 y 40 % tuvieron un efecto intermedio (15 mm), por su parte los niveles de 30-10 % permitieron a la bacteria crecer relativamente sin problemas.

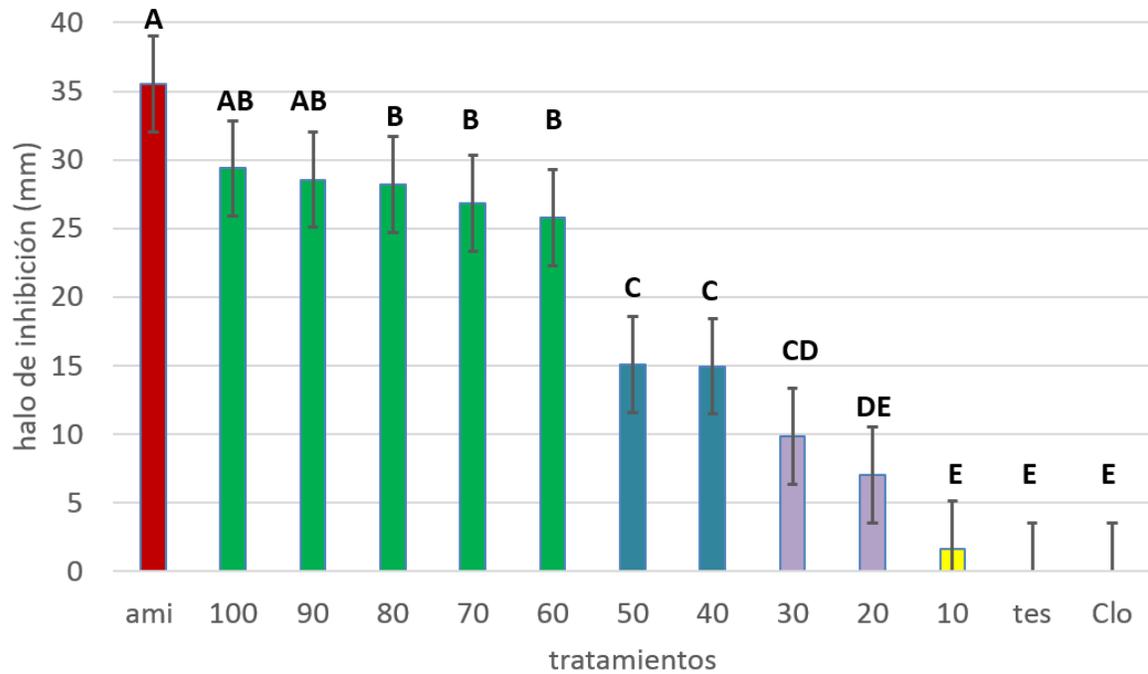


Figura 134. Actividad bactericida del AE de *C. officinalis* sobre el crecimiento de *S. enterica*. Tratamientos expresados en porcentaje de AE (100-10 %), testigo positivo: amikacina (ami), testigos negativos: agua destilada (tes) y CH_2Cl_2 (Clo). Cada punto es el promedio de 4 repeticiones \pm Es. Letras diferentes corresponden a tratamientos estadísticamente distintos ($p > 0.0001$, $\alpha = 0.05$, Tukey).

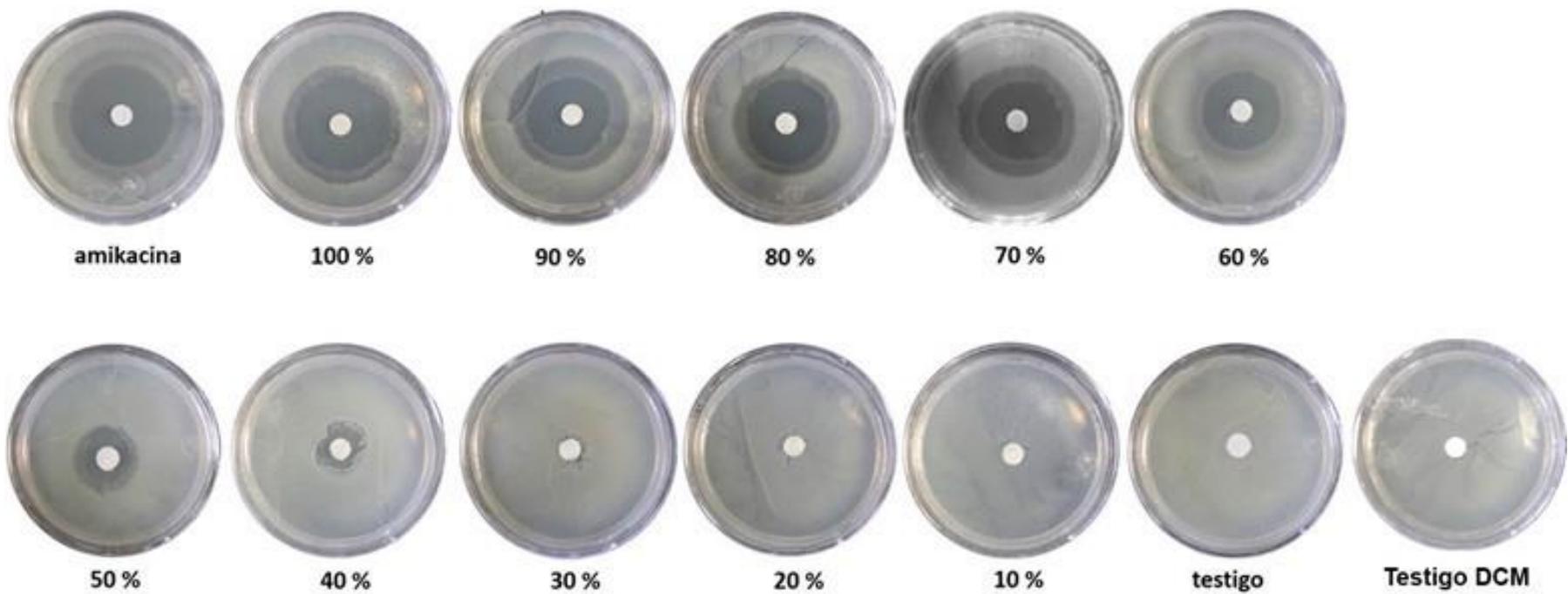


Figura 145. Halos de inhibición de los diferentes porcentajes de aceite esencial. Los niveles van de 100% hasta 10% y se comparan con un antibiótico comercial (amikacina), el testigo (agua destilada) y el testigo DCM (cloruro de metileno).

Se ha reportado que el AE de caléndula inhibió el crecimiento *in vitro* de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. (Radioza *et al.*, 2007), esto es de esperarse ya que su AE es rico en sesquiterpenos los cuales actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas que son capaces de intercalarse en los lípidos de la membrana celular bacteriana, distorsionando su estructura y haciéndola más permeable (Devi *et al.*, 2010)

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las pruebas realizadas demostraron que la CMI del aceite esencial de *C. officinalis* contra *S. enterica* fue de 6 µg/mL. Los efectos reportados pueden estar relacionados con la presencia de germacreno en este aceites esenciales, que actúan directamente sobre la membrana bacteriana inhibiendo el crecimiento de microorganismos fúngicos y bacterianos (Cava *et al.*, 2012). Por otro lado, Tong *et al.* (2005) encontraron que los aceites esenciales pueden inhibir el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) del metabolismo de la respiración bacteriana, afectando el consumo de oxígeno de las bacterias, causando su muerte.

4.4. CONCLUSIÓN

El aceite esencial de *C.officinalis* podría ser considerado como un posible candidato para ser utilizado como un remedio de origen herbolario para tratar la infección causada por *S. enterica*

V. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE EXTRACTOS DE CALÉNDULA SOBRE *E. coli* Y *S.enterica*

5. 1. INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente y forman parte de la flora intestinal normal de los animales, sin embargo, pueden llegar a actuar como patógenos oportunistas y producir enfermedad convirtiéndose en graves problemas públicos, aunado a lo anterior, su gran capacidad de adaptación a través de mecanismos de mutaciones y recombinaciones génicas, que les permiten adquirir características de resistencia a antibacterianos y otros factores de virulencia, hacen

muy difícil su control. El uso de plantas aromáticas y medicinales es una alternativa debido a la cantidad de metabolitos secundarios que dependen de las condiciones ambientales.

Dentro de la gran diversidad de plantas usadas en México se encuentran los extractos de *C. officinalis* y en particular los de sus flores que muestran un amplio espectro de acciones farmacológicas, de ahí la gran importancia de estudiar su actividad biológica en bacterias de importancia mundial como lo son *E. coli* y *S. enterica*

5.2. MATERIALES Y METODOS

5.2.1 Extracción con solventes

Extracción con solventes de diferente polaridad

Se probaron como disolventes de extracción: hexano, cloruro de metileno, y metanol de grado analítico (J.T. Baker®). Se pesaron 20 g de material vegetal seco y se les agregaron 500 mL del disolvente de poca polaridad (hexano), se maceró por dos días, después el extracto se filtró y enseguida se le agrego el solvente cloruro de metileno, se procedió de la misma manera para finalizar con el metanol

Cada extracto se concentró en un rotavapor Büchi B-480® con vacío a 30 °C, hasta evaporar la mayor cantidad de disolvente posible. Los compuestos que quedaron depositado en el matraz se transfirieron a un vial de 1.5 mL con una pipeta Pasteur y se dejó evaporar el resto del solvente al ambiente en una campana de extracción.

Actividad antibacterial de los extractos de caléndula

La actividad antibacteriana de los extractos de caléndula frente a *S. enterica* y *E. coli* se evaluaron mediante el protocolo de prueba de susceptibilidad a la difusión del disco Kirby-Bauer. Se preparó medio de cultivo LB y EMB, se esterilizó y se repartió en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Derivado de la cuenta en placa por diluciones seriadas se preparó el inóculo bacteriano estandarizado en 1×10^8 células mL⁻¹ de medio de cultivo, cada bacteria; en el cual las colonias individuales no fueron evidentes a través de la

placa. De este inóculo se vertieron 100 μ L en cada caja Petri y con una varilla de vidrio tipo Drigalski esterilizada a la llama se estrió en un patrón radial.

Cada tipo de solvente se probó con diferentes concentraciones, 10, 25, 50 y 75 mg de extracto diluido en 100 μ L de su respectivo solvente, de tal modo que se tuvieron 17 tratamientos para cada cepa bacteriana, incluyendo los testigo con solvente metanol, testigo con solvente cloruro de metileno, testigo con solvente hexano, testigo positivo con amikacina y testigo negativo.

Se colocó un disco de papel de filtro Whatman® N°1 esterilizado de 5 mm de diámetro en el centro de las cajas Petri, previamente saturado con 10 μ L de cada tratamiento. Cada disco se presionó sobre el medio de cultivo para garantizar el contacto completo con la superficie del agar para no producir formas de zonas irregulares. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h en incubadora BD 53 L – Binder. Se colocaron de tal manera que la tapa quedara hacia abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersaran su crecimiento.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Actividad antibacterial de los extractos de caléndula en *E. coli*

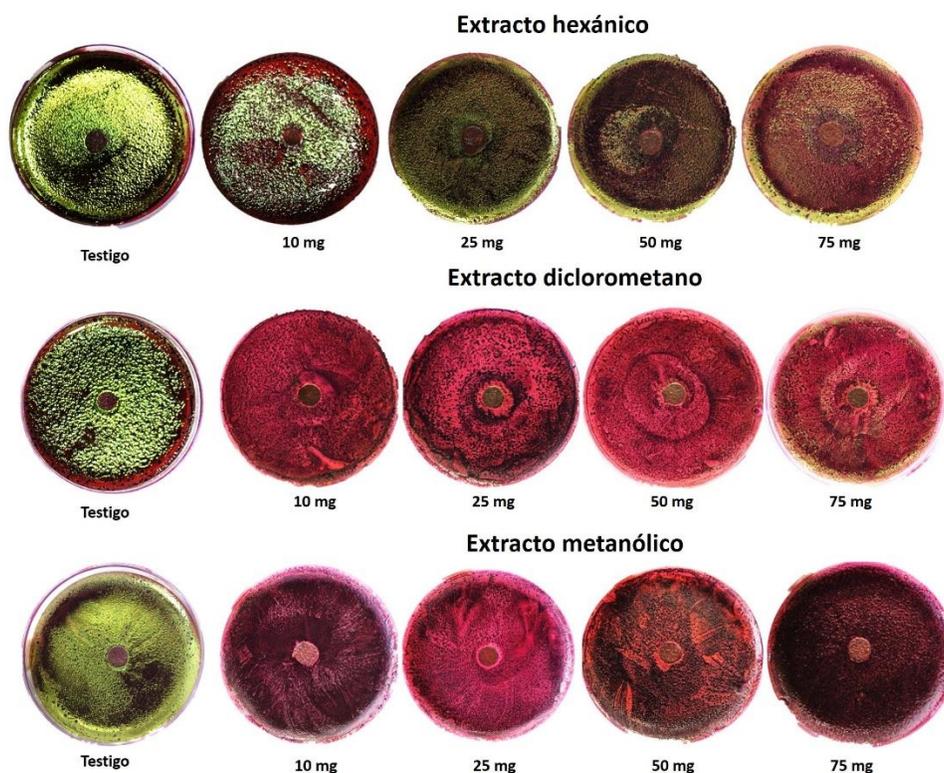


Figura 156. Efecto de los diferentes extractos de caléndula sobre *E. coli*. Las concentraciones de los diferentes extractos van de 10 a 75 mg, no se observan halos de inhibición definidos pero si una clara diferencia de color por la inhibición de la fermentación de la lactosa

El medio de cultivo EMB, con sustratos cromogénicos enzimáticos, está basado en la detección de actividad enzimática específica. En el ensayo con extractos de cloruro de metileno y metanol no se observó la fermentación de la lactosa, mientras que el extracto hexánico dejó fermentar a la bacteria.

Lo anterior es relevante porque la vía para la utilización de la lactosa en *E. coli* no sólo se debe al operón lac (Los genes en el operón codifican las proteínas que permiten que las bacterias utilicen la lactosa como fuente de energía) descubierto por Jacob y Monod a fines de la década de 1950, si no que Kaznadzey *et al.*, 2018 demostraron que los genes *yih* de *E. coli*, previamente vinculado con la degradación de la sulfoquinovosa

(monosacárido), también están involucrados en el catabolismo de la lactosa, lo que sugiere que estos extractos inhiben estas dos vías metabólicas, provocando problemas en el desarrollo bacteriano como consecuencia de una mala nutrición.

Actividad antibacterial de los extractos de caléndula en *S. enterica*

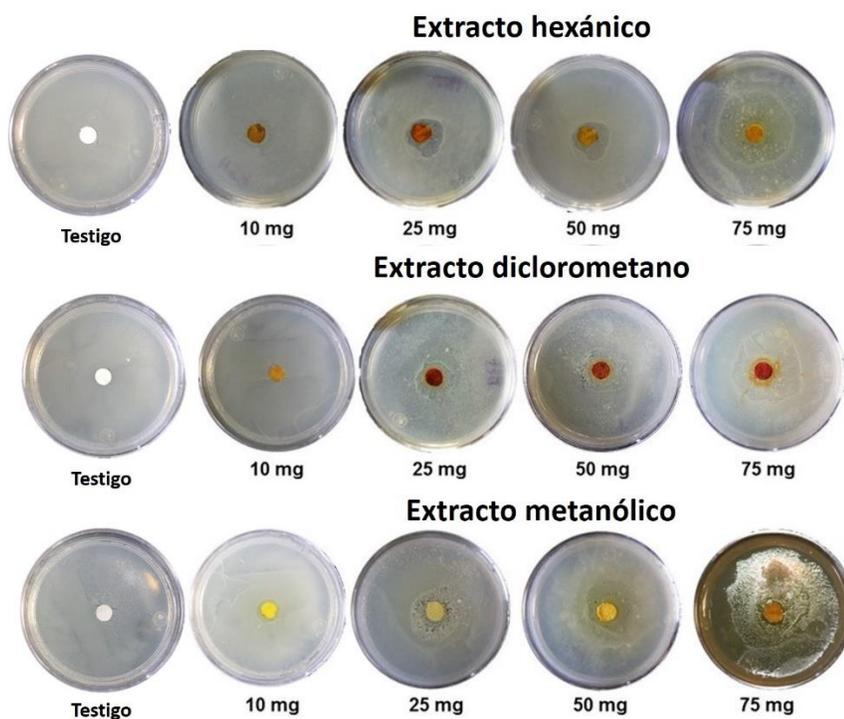


Figura 167. Efecto de los diferentes extractos sobre el crecimiento de *S. enterica*

Todos los extractos probados, generaron una zona de bajo crecimiento bacteriano, sin formar halos concéntricos definidos. Esto se debe a que la extracción con solventes es muy importante para obtener extractos ricos en flavonoides que son excelentes antioxidantes, precursores de vitaminas, atraen polinizadores, sirven de defensa contra el herbivorismo, pero no son estrictamente bactericidas.

Por su parte Roopashree *et al.*, 2008 revelaron que en el extracto metanólico no existen grasas, aceites y terpenos que actúen como fitoalexinas con efecto antimicrobiano.

Aun así el metanol es usualmente considerado como el mejor solvente para extraer polifenoles, en el estudio de Pazhohideh *et al.*, 2018 utilizaron un extracto metanólico de

caléndula para eliminar la vaginosis bacteriana, y otros estudios han demostrado que este extracto tiene mejor actividad antimicrobiana que el del etanol.

La humedad de la materia prima también es relevante, como lo reportado por Bissa y Bohra, 2011 que encontraron que los extractos acuoso, alcohólico, de cloroformo y éter de partes frescas tuvieron menor efecto bactericida que los extractos con partes secas de la planta, en ese sentido, nosotros encontramos que es muy difícil extraer el agua de los solventes más polares.

Según Roopashree *et al.*, 2008 el extracto hexánico presenta triterpenos, grasas y aceite, esto es indicio para explicar la fermentación de la lactosa; sin embargo, no inhibió el crecimiento de *E. coli*, lo mismo ha sido reportado para el extracto de éter de petróleo en concentraciones de 300 a 500 mg mL⁻¹. Ambos solventes tienen polaridad semejante.

Muley, 2009 encontró que los extractos de éter de petróleo, metanólicos y etanólicos no mostraron ninguna inhibición en, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* otra bacteria Gram negativa como *Salmonella* sp. y Castillo- Archila *et al.*, 2016 encontraron halos de inhibición para *E. coli* de 0.5 ± 0.1 , 0.5 ± 0.1 y 0.9 ± 0.1 de los extractos acetónicos de *Peumus boldus*, *Plantago major* y *Cucurbita pepo*.

Por su parte el extracto de cloruro de metileno de los capítulos de la planta presenta ésteres del ácido faradiol-mirístico, el ácido faradiol-palmítico y el alpha-taraxasterol (Muley, 2009) los cuales poseen actividad antiedematosa, pero no se mencionan las propiedades antibacteriales

5.4. CONCLUSIÓN

Los extractos de *C. officinalis* no tuvieron un efecto antibacteriano evidente, por lo que no son candidatos a ser utilizados para el control de enfermedades por enterobacterias.

VI. BOTÁNICA ECONÓMICA

Esta parte está orientada para pensar e investigar acerca del empleo de los recursos que la planta de caléndula puede proporcionarnos, tales como ornato, medicinal, farmacológico, cosmetología, etc. Sin embargo el conocimiento aun imperfecto por parte de la terapéutica oficial impide un uso más extendido de esta planta maravillosa.

Para clasificar el uso de esta planta se tomaron 216 referencias bibliográficas, 54 % de las cuales la colocan como planta de ornato en escuelas, parques, hospitales, áreas recreativas, etc, 23 % para usos terapéuticos tales como: antiinflamatorias, antieméticas, antisépticas, antiespasmódica, antibacteriana, fungicida, espermicida, cicatrizante, antiulcerosa, astringente, afrodisiaca, calmante, antivenenosa, cardiotónica, diaforetica, hemostática, uterotónica, vasodilatadora, depurativa, emoliente, emenagoga, antiparasitaria, colérica y contiene flavonoides y antioxidantes, 8 % en cosmetología, 5 % insumo agrícola como insecticida o fungicida, 5 % como excelente polinizadora, 5 % otros (fabricación de galletas, caramelos, colorante natural de la mantequilla o como sucedáneo del azafrán).

Derivado de la importancia económica que representa esta planta Palma-Tenango *et al.*, 2007 realizaron un análisis de la producción y comercialización en el Municipio de Texcoco, Estado de México, concluyendo que: la producción intensiva bajo invernadero es rentable sólo si se lleva hasta su industrialización, el estudio de mercado señaló la preferencia por consumir caléndula en sobres de té por la facilidad de su consumo a un precio accesible, que existe en el mercado una gran cantidad de productos como aceites, extractos, pomadas y suplementos, sin embargo, la crema corporal es la más ofrecida al consumidor final.

Así mismo Palma-Tenango *et al.*, 2007 midieron la rentabilidad de la producción de la planta. Considerando un rendimiento promedio de 8.5 kg de capítulos secos envasados en frascos de 50 g cada uno a un precio de 35 pesos. Obtuvieron una relación beneficio costo de 2.8, la cual se obtuvo dividiendo los ingresos totales entre el costo total de la producción, lo que demostró su rentabilidad.

La comercialización de materias primas es sumamente importante, pero para beneficiar más a los productores se debe pensar en el valor agregado en la cadena de valor, que puede dársele al producto mediante una presentación o formulación.

De acuerdo a nuestros resultados de rendimientos de aceite esencial y extractos de esta planta se evaluó la baja rentabilidad de realizar formulaciones con estos compuestos. Por lo que de acuerdo a la encuesta realizada por Palma-Tenango *et al.*, 2007 El té es

un producto infaltable en la alacena de los hogares texcocanos, dado que el resultado de las encuestas refleja que el 74 %, seguida de pomada y flores en maceta.

6.1 Posología

Existe la creencia de que la fitoterapia es una maravillosa medicina natural sin riesgos ni efectos secundarios. Sin embargo una de sus desventajas es que en muchas ocasiones no están bien definidas las dosis a las cuales deben emplearse los diferentes extractos y/o partes de las plantas con actividad medicinal. Además los componentes químicos principales, están en función de la genética de la planta y las condiciones ambientales. Aunado a lo anterior las mezclas con otras sustancias, las malas prácticas agronómicas y de inocuidad dificultan la estandarización de los compuestos y sus beneficios.

Aún con lo anterior, Hernández y Rodríguez, (2001) recomiendan la decocción de 10 g de hojas y flores en 1 litro de agua por 2 min. Mendoza *et al.*, (2002) prescriben un cocimiento de 8 g de planta en dos litros y medio de agua, dejando hervir por 5 min, colar y beber cuatro vasos durante el día. Pahlow (1985) recomienda verter un cuarto de litro de agua hirviendo sobre uno o dos cucharaditas de la planta seca

La caléndula, en cualquiera de sus usos, está contraindicada en paciente con hipersensibilidad a las asteráceas. Debido a la falta de estudios no se recomienda en el embarazo y período de lactancia.

VII. CONCLUSION GENERAL

Con base a los resultados presentados, se concluye que el AE de caléndula tiene un gran potencial como compuestos antimicrobianos contra microorganismos y podrían ser considerados como candidatos que se utilizarían para el el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos resistentes.

VIII. RECOMENDACIONES

Si el destino de la producción de caléndula es medicinal, el manejo agronómico debe ser orgánico o agroecológico para evitar contaminación con productos plaguicidas.

Realizar ensayos en superficies vivas de alimentos en una concentración de 10^6 a 10^{10} unidades formadoras de colonias debido a que esta es la dosis infecciosa de estas bacterias (Nataro y Kaper 1998); posteriormente llevar a cabo ensayos clínicos en modelos animales.

Realizar estudios de factibilidad de la comercialización como té u otras formulaciones.

IX. LITERATURA CITADA

Abbasi, A.M., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Jahan, S., Sultana, S. (2010). Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacol.* 128:322–335.

Amirghofran, Z., Azadbakht M., Karimi, M.H. 2000. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol.* 72:167–172.

Andersen, F. A., F. W. Bergfeld, V. D. Belsito, A. R. Hill, D. C. Klaassen, C. D. Liebler, G.J. Marks, C. R. Shank, J. T. Slaga and W. P. Snyder. (2011). Final report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel amended safety assessment of *Calendula officinalis* derived cosmetic ingredients. *International Journal of Toxicology.* 221–243.

Andersson, D.I., Hughes D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology.* 8(4):260-271.

Ao, C. (2007). Comparative anatomy of bisexual and female florets, embryology in *Calendula officinalis* (Asteraceae), a naturalized horticultural plant *Scientia Horticulturae.* 114:214–219.

Arora, D, Rani A, Sharma A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Reviews.* 7 (14):179-187.

Arora, G., P. Talwar., G. Grewal, R. Kukreti, (Eds.). (2017). *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer* Springer International Publishing Switzerland. 629 p.

Asbahani, A., Miladi K, Badri W, Sala M, Addi E, Casabianca H, Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud F, Elaissari A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 483: 220–243.

- Autores no listados (2001). Final report on the safety assessment of *Calendula officinalis* extract. Int J toxicol. 20(2): 13-20.
- Babae, N., Moslemi D., Khalilpour M., Vejdani F., Moghadamnia Y., Bijani A., Baradaran M., Kazemi M.T., Khalilpour A., Pouramir M. (2013). Antioxidant capacity of *Calendula officinalis* flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: A randomized controlled clinical study. Daru. 21:18.
- Baciu, A.D., Mihalte L., Sestras A.F., Sestras R.E. (2010). Variability of decorative traits, response to the *Aphis fabae* attack and RAPD diversity in different genotypes of *Calendula*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj. 265–270.
- Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology 46: 446–475.
- Bauer, A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 45:493–496.
- Bayat, H., M. Alirezaie, H. Neamati. (2012). Impact of exogenous salicylic acid on growth and ornamental characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.) under salinity stress. Journal Stress Physiology and Biochemistry 81:258–267.
- Blair, J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 13:42–51.
- Blumenthal, M, Goldberg A, Brinckmann. (2001). J. American Botanical Council, Integrative Medicine Communications; Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs; Austin, TX pp. 376–378.
- Calapai, G., Miroddi M., Minciullo P.L., Caputi A.P., Gangemi S., Schmidt R.J. (2014). Contact dermatitis as an adverse reaction to some topically used European herbal medicinal products-part : *Achillea millefolium*–*Curcuma longa*. Contact Dermat. 71:1–12.
- Casburn-Jones A, Farthing M. (2004). Management of infectious diarrhoea. Gut 53:296–305.
- Chlodwig, F., Johannes N. (2010). Sources of Essential Oils. K. Can HB, Buchbauer G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. US: CRC Press, 39-73.

- Coradini, C. Z., V. Tabără, I. Petrescu y C. Giuchici. (2011). Correlative bindings between mmb and seeds number germinated to *Calendula officinalis* L. Research Journal of Agricultural Science 43:31-36.
- Cordero, C. (2002). La industria farmacéutica en busca de nuevos elementos: explora la biodiversidad. Conabio 1-4.
- Cruz-Cordova A, Espinosa-Mazariego K, Ochoa SA, Saldana Z, Rodea GE, Cazares-Dominguez V, Rodriguez-Ramirez V, Eslava-Campos CA, Navarro-Ocana A, Arrellano-Galindo J, Hernandez-Castro R, Gomez-Duarte OG, Qadri F, Xicohtencatl-Cortes J. (2014). CS21 positive multidrug-resistant ETEC clinical isolates from children with diarrhea are associated with selfaggregation, and adherence. Front Microbiol 5:709.
- Cunico, Miriam M., Lopes, André R., Côcco, Liliam C., Yamamoto, Carlos I., Plochanski, Rubia C. B., Miguel, Marilis D., G. Junior, Albino, Auer, Celso G., & Miguel, Obdulio G. (2007). Phytochemical and antibacterial evaluation of essential oils from *Ottonia martiana* miq. (Piperaceae). J. Braz. Chem. Soc. 18(1):184-188.
- Dall'Acqua, S., Cervellati R., Loi M.C., Innocenti G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. Food Chem. 106:745–749.
- De Lima, S.G., Cito A.M.G.L., Lopes J.A.D. (2010). Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx baill* – Euphorbiaceae. Rev Latinoamer Quím 38: 133 – 144.
- Devi, K.P., Nisha S.A., Sakthivel R., Pandian S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. Journal of ethnopharmacology. 130 (1):107-15.
- Duran, V., Matic M., Jovanovć M., Mimica N., Gajinov Z., Poljacki M., (2005). Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. Int J Tissue React.27:101–106.
- Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C., Thompson-Bonilla R., Abonce M., Lopez-Hernandez D., Santos J.I., Rosado J.L., DuPont H.L., Long K.Z. (2009). Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. J Clin Microbiol 47(1):93–98.

- Fauci, A.S., Morens D.M. (2012). The perpetual challenge of infectious diseases. *N Engl. J Med* 366:454–461.
- Fahn, A., (1979). *Secretory Tissues in Plants*. London, U.K.: Academic Press.
- FDA. Food and Drug Administration. La FDA Investiga Múltiples Brotes de Cepas de *Salmonella* Vinculadas a Papayas. 2017. Consultado en www.fda.gov/food/recallsoutbreaksemergencies/outbreaks/ucm568393.htm el 20 de marzo de 2018.
- Furlan, M.R. (2005). *Cultivo de plantas medicinales*. SEBRAE/MT. Cuiabá, Brasil. 140 pp.
- Ghorbani, A. (2005). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran: General results. *Journal of Ethnopharmacol.* 102. 58–68.
- Gomez-Aldapa C.A., Rangel-Vargas E., Bautista-De Leon H., Castro-Rosas J., (2014). Presence of non-O15H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* and *Salmonella* in fresh beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice from public markets in Mexico. *J Sci Food Agric* 94 (13).
- Gómez-Aldapa C.A., J.A. Segovia-Cruz, J.F. Cerna-Cortes, E. Rangel-Vargas. (2016). Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. *Food microbiology* 59, 97-103.
- Goyal, G. and R. Mathur. (2011). Antimicrobial effects of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 5:97-101.
- Guinot, P., Gargadennec, A., Valette, G., Fruchier, A. y Andary, C. (2008). Flavonoides primarios en colorante de caléndula: extracción, estructura y participación en el proceso de teñido. *Phytochem. Anal.* 46-51.
- Hernández-Cortez C., Aguilera-Arreola M.G., Castro-Escarpulli G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol.* 31 (4): 137-151.
- Hortal, M., Lovgren M., De la Hoz F., Agudelo C.I., Brandileone M.C., Camou T. (2001). Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six Latin American countries: 1993-1999 surveillance. *Microb Drug Resist.* 7:391-401.
- Hüsnü, K., Can Başer y Gerhard Buchbauer (Eds.). 2006. *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. 2nd Edn. CRC Press, U.S.A. 1128 p.
- Iordanov, D. (1976). *Fitoterapia*. Sofia: Ed. Medicina y Educación Física. 121 p.

- Kalia, V.C., Wood T.K., Kumar P. (2014). Evolution of resistance to quorum-sensing inhibitors. *Microb Ecol* 68:13–23.
- Kaufman, P. B., Cseke, L. J., Warber, S., Duke, J. A., Briemann, H. L. (1999). *Natural Products from Plants*. United States of América: CRC Press. 343 p.
- Khalid, K. A. y J. S. Teixeira. (2012). Biology of *Calendula officinalis* Linn focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 6:12–27.
- Kodiyan, J., Amber, K.T. (2015). A Review of the Use of Topical *Calendula* in the Prevention and Treatment of Radiotherapy-Induced Skin Reactions. *Antioxidants*. 4:293-303.
- Kojima, S, Nikaido H. (2013). Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 110:629–634.
- Koul, S., Prakash J., Mishra A., Kalia V.C. (2016). Potential emergence of multi-quorum sensing inhibitor resistant (MQSIR) bacteria. *Indian J Microbiol* 56:1–18.
- Lavagna, S.M., Secci D., Chimenti P., Bonsignore L., Ottaviani A., Bizzarri B. (2001). Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in child-birth with caesarean section. *Farmaco*.56:451–453.
- Leggett, H., Cornwallis C., West S. (2012). Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites. Springer New York. *PLoS Pathog* 8:2.
- León-Ramírez S. (2002). Shigelosis (disentería bacilar). *Sal en Tab.* 8:22-25.
- Lubbe A, Verpoorte R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products* 34: 785–801.
- Meng, L, Schroeder C. (2007). *Escherichia coli*. En Simjee S. *Infectious Disease: Foodborne Diseases*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 132 p.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85:231–237.
- Moradkhani, S., Salehi I., Abdolmaleki S., Komaki A. (2015). Effect of *Calendula officinalis* hydroalcoholic extract on passive avoidance learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ancient Sci Life.* 34:156-61.

- Muley, B. P., S. S. Khadabadi y N. B. Banarase. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review Tropical Journal of Pharmaceutical Research 8 (5): 455-465.
- Murray, P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (2013). Medical Microbiology 7 edition. Elsevier Health Sciences. 899 p.
- Naguib, N.Y., Y. M. Khalil, E. S. Sherbeny. (2005). A comparative study on the productivity and chemical constituents of carious sources and species of calendula plants as affected by two foliar fertilizers. Journal of Applied Sciences 176-189.
- Nataro, J.P., Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11(1):142–201.
- Novoa-Farias O., Frati-Munari A.C., Peredo M.A., Flores-Juarez S., Novoa-Garcia O, Galicia-Tapia J., Romero-Carpio C.E. (2016). Susceptibility of bacteria isolated from acute gastrointestinal infections to rifaximin and other antimicrobial agents in Mexico. Rev Gastroenterol Mex 81(1):3–10.
- Okoh, O. O., A. P. Sadimenko, O. T. Asekun, A. J. Afolayan. (2008). The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. African Journal of Biotechnology 7:1500–1502.
- Omelchuk, M.A., Krivut B.A., Voroshilov A. (1984). Efectos de las condiciones de secado en la calidad de la *Calendula officinalis* como materia prima para medicamentos. Khim Farm Zh.18 (3):329-31.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Mayo 2015. Disponible en www.who.int.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2017. González- Ayala S.E., Cecchini D.M. Diagnostico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. <http://new.paho.org/arg>.
- Ouyang-Latimer J., Jafri S., VanTassel A., Jiang Z.D., Gurleen K., Rodriguez S., Nandy R.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., McKenzie R., Steffen R., DuPont H.L. (2011). In vitro antimicrobial susceptibility of bacterial enteropathogens isolated from international travelers to Mexico, Guatemala, and India from 2006 to 2008. Antimicrob Agents Chemother 55(2).

- Palazzo, M.C., Agius B.R., Wright B.S., Haber W.A., Moriarity D.M., Setzer W.N. (2009). Chemical compositions and cytotoxic activities of leaf essential oils of four Lauraceae tree species from Monteverde, Costa Rica. *Rec Nat Prod* 3: 32-37.
- Palma-Tenango, M. Passalacqua N.G., Guarrera P.M., De Fine G. (2007). Mercadela: cultivo y usos terapéuticos. Chapingo, México: Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Programa Universitario de Medicina Tradicional y Terapéutica Naturista, Fitoterapia. 78:52–68.
- Patzi-Vargas S, Zaidi M., Bernal-Reynaga R., León-Cen M., Michel A., Estrada-Garcia T. (2013). Persistent bloody diarrhoea without fever associated with diffusely adherent *Escherichia coli* in a young child. *J Med Microbiol* 62:1907–1910.
- Patzi-Vargas S., Zaidi M.B., Perez-Martinez I., Leon-Cen M., Michel-Ayala A., Chaussabel D., Estrada-Garcia T. (2015). Diarrheogenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 9(3).
- Pazhohideh Z., Mohammadi S., Bahrami N., Mojab F., Abedi P., Maraghi E. (2018). The effect of *Calendula officinalis* versus metronidazole on bacterial vaginosis in women: A double-blind randomized controlled trial. *J Adv Pharm Technol Res* 9:15-9.
- PLM. (2017). Diccionario de especialidades farmacéuticas, edición 63, México.
- Pommier, P., Gomez F., Sunyach M.P., D’Hombres A., Carrie C., Montbarbon X. (2004). Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J Clin Oncol.* 22:1447–1453.
- Popovic, M., Kourinovic B., Mimica-Dukic N., Vojinovic-Miloradav M., Djordjevic A. (2000). Combined effects of plant extracts and xenobiotics on liposomal lipid peroxidation. Part II. Marigold extract-CCI4/fullerenol. *Oxid Commun.* 23:178–186.
- Radioza, S., Lurchak L.D. (2007). Antimicrobial activity of *Calendula*. *Plants Mikrobiol Z.* 9:21-5.
- Rangel-Vargas E., Gomez-Aldapa C.A., Torres-Vitela Mdel R., Villarruel-Lopez A., Gordillo-Martinez A.J., Castro-Rosas J. (2015). Presence and correlation of some enteric indicator bacteria, diarrheogenic *Escherichia coli* pathotypes, and *Salmonella* serotypes in alfalfa sprouts from local retail markets in Pachuca, Mexico. *J Food Prot* 78(3).

- Rasgado-Bonilla, F.A., Soto-Hernández, R.M., Conde-Martínez, V., Vibrans, H., y Cibrián-Tovar, D. (2016). Variación Estacional en la Composición Química de Resinas y Aceites Esenciales de *Liquidambar styraciflua* de Hidalgo, México. *Botanical Sciences*, 94(2), 331-344.
- Re, T.A., Mooney D., Antignac E., Dufour E., Bark I., Srinivasan V., Nohynek G. (2009). Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. *Food and Chemical Toxicology* 47 1246–1254.
- Rehecho, S., Uriarte-Pueyo I., Calvo J, Vivas L.A., Calvo M.I. (2011). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. *J Ethnopharmacol.*133:75–78.
- Rosete, J., J. A. Castillo, M. J. Rosete. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación. *Bio Ciencias*. 119-129.
- Roopashree, T.S., Raman D., Shobha Rani R.H., Narendra C. (2008). Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *IJARNP* 1: 20-28.
- Safdar, W., H. Majeed., I. Naveed., K. W. Kayani., H. Ahmed, S. Hussain, A. K. (2010). Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (family compositae). *International Journal of Cell and Molecular Biology*. 108–116.
- Salomé-Abarca, Luis F. (2015). Chemical composition of scented extracts obtained from *Calendula officinalis* by three extraction methods. *Botanical Sciences*, v. 93, n. 3, p. 633-638.
- Santa-Ana-Tellez Y., Mantel-Teeuwisse A.K., Leufkens H.G., Wirtz V.J. (2015). Seasonal variation in penicillin use in Mexico and Brazil: analysis of the impact of over-the-counter restrictions. *Antimicrob Agents Chemother* 59:105–110.
- Šarac, Z., Matejić J.S., Stojanović-Radić Z.Z., Veselinović J.B., Džamić A.M., Bojović S. y Marin P.D. (2014). Biological activity of *Pinus nigra* terpenes-evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Comput. Biol. Med.* 54: 72–78.
- Sarrel, E., Cohen H.A., Kahan E. (2003). Naturopathic treatment for ear pain in children. *Pediatrics*, 111: 574-579.

- Schmidgall, J., Schnetz E., Hensel A. (2000). Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs *in* and *ex vivo* bioadhesion assay on buccal membranes. *Planta Med.* 66:48–53.
- Sell, C. (2010). Chemistry of Essential Oils. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. US: CRC Press, 121-150.
- Setzer, W.N. (2008). Germacrene D Cyclization: An Ab Initio Investigation. *Int J Mol Sci* 9: 89-97.
- Sharifi-Rad J., Hoseini-Alfatemi, Sharifi-Rad y William N. S. (2014). Chemical composition, anti-fungal and antibacterial activities of essential oil from *Lallemantia royleana* (Benth. In Wall.) *Journal of Food Safety*.
- Souza, T.B., Morais M.B., Tahan S., Melli L.C.F.L., Rodrigues M.S.C., Scaletsky I.C.A. (2009). High prevalence of antimicrobial drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in asymptomatic children living in an urban slum. *J Infect* 59:247–251.
- SS-SINAVE. (2016). Secretaría de Salud - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad Estados Unidos Mexicanos. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/211946/PAE_20132018.pdf
- Steffen, R., Hill D.R., DuPont H.L. (2015). Traveler's diarrhea: a clinical review. *JAMA* 313:71–80.
- Takeyama, N., Kiyono H., Yuki Y. (2015). Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Ther Adv Vaccine* 3:139–54.
- Tanideh, N., Tavakoli P., Saghiri M.A., Garcia-Godoy F., Amanat D., Tadbir A.A., Samani S.M., Tamadon A. (2013). Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 115:332–338.
- Tiwari, S. (2008). Plants: A rich source of herbal medicine. *J Nat Prod.*; 1:27–33.
- Ukiya, M., Akihisa T., Yasukawa K., Tokuda H., Suzuki T., Kimura Y. (2006). Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J Nat Prod.* 69:1692–1696.
- Universidad Nacional de Colombia. 2007. El Cultivo de la Caléndula, *Calendula officinalis* L. ISBN 978-958-8095-40-0.

- U.S. Department of Health and Human Services. 2011. National statistics on intestinal infections. <http://hcupnet.ahrq.gov/HCUPnet.jsp> . Ingresado 12 noviembre 2018.
- Victoria, J.T., C. C. Bonilla, O. M. Sanchez. (2007). Morfo-anatomía y efecto del secado en la germinación de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica*. 56:61-68.
- Wagner, H. y Blatt S. (2001). Drugs Containing Essential Oils (Aetherolea), Balsams and Oleo-Gum-Resins. En: Wagner H. y Blatt S. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Waksman, S.A., Flynn J.E. (1973). History of the word 'antibiotic'. *J Hist Med Allied Sci* 28:284–286.
- Wilén, R. W., B. Barl, E. A. Slinkard. (2004). Feasibility of cultivation calendula as a dual purpose industrial oilseed and medicinal crop. *Acta Horticulture*. 199-206.
- Wong, R.K., Bensadoun R.J., Boers-Doets C.B., Bryce J., Chan A., Epstein J.B., Eaby-Sandy B., Lacouture M.E. (2013). Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of acute and late radiation reactions from the MASCC Skin Toxicity Study Group. *Support. Care Cancer*. 21:2933–2948.
- World Health Organization. 2017. Diarrhoeal disease. Fact sheet no 330. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> ingresado el 12 noviembre 2018.
- Yoshikawa, M., Murakami T., Kishi A., Kageura T., Matsuda H. (2001). Medicinal flowers. Marigold: Hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull*. 49:863–870.
- Zellner, B., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2010). Analysis of Essential Oils. K. Can HB, Buchbauer G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*. US: CRC Press, 151-177.