

**Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de *Tagetes erecta* L.
(*Asteraceae*)**

Phytochemical and antibacterial properties of extracts of *Tagetes erecta* L.
(*Asteraceae*)

M. Sc. Conrado Camacho-Campos^{1*}

M. Sc. Yunel Pérez-Hernández¹

Dr. C. Aymara Valdivia-Ávila¹

Dr. C. Héctor L. Ramírez-Pérez¹

Dr. C. Leissy Gómez-Brisuela¹

¹Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

*Autor para la correspondencia. correo electrónico: conrado.camacho@umcc.cu

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de hojas y flores de *Tagetes erecta* L. (flor de muerto). Se colectan plantas presentes en el campus de la Universidad de Matanzas y las muestras se lavan, secan y trituran. Se realizan extractos acuosos y etanólicos y se determina las cantidades relativas de varios metabolitos secundarios. Se cuantifica el contenido de azúcares reductores, carbohidratos y proteínas solubles totales. Se evalúa la actividad antibacteriana contra cepas de referencia y salvajes. Se observó la presencia notable de flavonoides, terpenos, taninos, cumarinas y glucósidos cardiotónicos. Los extractos etanólicos de hojas y flores mostraron propiedades antibacterianas frente a *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus epidermidis*, con valores inhibitorios superiores en las flores. Los resultados obtenidos justifican el uso folclórico de esta especie y las potencialidades para el control de enfermedades bacterianas.

Palabras clave: *Tagetes*; fitoquímica; actividad antibacteriana; metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the phytochemical and antibacterial properties of extracts of leaves and flower of *Tagetes erecta* L. Plants from the University of Matanzas area were collected. The samples were washed, dried and powdered. Aqueous and ethanolic extracts were prepared and the qualitative amounts of various secondary metabolites assayed. Reduced sugar and total soluble carbohydrates and proteins were also determined. The antibacterial activity against referenced and wild strains was evaluated. Abundance presence of flavonoids, terpenoids, tannins, coumarins and cardiac glycosides was observed. The ethanolic extractos of leaves and flower showed antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus epidermidis*, with higher inhibitory values for the flowers. The obtained results support the folkloric use of this specie and its potentialities for the control of bacterial diseases.

Keywords: *Tagetes*; phytochemical; antibacterial activity; secondary metabolites.

Recibido: 19 /10/2017

Aprobado: 29 /10/2018

Introducción

La búsqueda de nuevas plantas con valores medicinales permite incrementar el conocimiento sobre las propiedades invaluable de muchas especies vegetales y su uso para el tratamiento de numerosas patologías.⁽¹⁾ Estas propiedades están relacionadas con la

presencia de compuestos fitoquímicos los cuales son generalmente seguros para el consumo y más accesibles.^(2,3)

La resistencia a antibióticos comerciales constituye uno de los problemas más serios y generalizados en el mundo, tanto en hospitales como en comunidades y provoca una mortalidad elevada cada año.⁽⁴⁾ El uso inapropiado de estos fármacos es el factor que más influye en la resistencia a antibióticos, lo que hace ineficaces y costosos los tratamientos médicos y pueden conllevar a la muerte del paciente.⁽⁵⁾ En muchos animales afectivos o de interés zootécnico, el problema de la resistencia a antibióticos también es una situación a resolver; lo cual provoca pérdidas económicas cuantiosas, debido a la incidencia elevada de enfermedades con bases infecciosas como la mastitis, que disminuye la calidad y el precio de la leche. Por estas razones, se buscan constantemente nuevas clases de antibióticos de origen vegetal para reducir el fenómeno de la resistencia bacteriana a estas sustancias.⁽⁶⁾

Tagetes erecta L. (flor de muerto) es una planta utilizada desde la antigüedad con diferentes propósitos en la medicina y la agricultura. Las hojas son utilizadas como agente antiséptico, para los trastornos de los riñones y los dolores musculares. Las flores en procesos febriles, problemas epilépticos, estomacales, trastornos en el hígado, para eliminar la sarna y también en tratamiento de enfermedades oculares. Otros autores han referido el uso del jugo de las flores como remedio para los resfriados, el reumatismo, la bronquitis y el lavado de la piel.^(7,8)

Varias investigaciones reflejan diversas actividades biológicas de extractos de *Tagetes erecta* L. para el control de enfermedades bacteriana, fungosas y como pesticida.^(9,10,11) Sin embargo, el perfil fitoquímico de las plantas varía debido a numerosos factores ambientales así como el genotipo. Por estas razones, es necesario realizar estudios fitoquímicos y biológicos de esta especie en las localidades, que permitan justificar los usos etnobotánicos que tiene *T. erecta*. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de hoja y flor de *Tagetes erecta* L. de plantas presentes en la flora matancera.

Materiales y métodos

Material vegetal y preparación de los extractos

Se colectaron hojas y flores de *Tagetes erecta* L. presentes en el campus de la Universidad de Matanzas, Cuba. La identificación de la especie se realizó por especialistas del Jardín Botánico de Matanzas, a partir del análisis de los caracteres morfológicos *in situ* y de la comparación con muestras presentes en el herbario de esta institución. Las muestras fueron colectadas en octubre de 2016 y las mismas no presentaban síntomas de enfermedades o ataque de plagas. Las hojas y las flores fueron lavadas con agua corriente y destilada para eliminar el polvo. Posteriormente se procede al secado en una estufa (Boxun) a 45 °C durante 72 h y finalmente fueron trituradas en un mortero hasta pulverizar.⁽¹²⁾

Tamizaje fitoquímico

Para la caracterización fitoquímica se preparan extractos etanólicos (90 %) y acuosos de ambos órganos. Para ello se mezclaron 5 g de polvo de las hojas y flores secas de *Tagetes erecta* L. en 50 mL de ambos solventes, en erlenmeyers de 250 mL con tapones de algodón, y se agitaron sobre una zaranda orbital (HDL® APPARATTUS) a 160 rpm por 24 h. Transcurrido este tiempo las muestras fueron filtradas a través de tres capas de papel de filtro. El filtrado se colectó y evaporó a 40 °C hasta obtener un volumen final de un cuarto del inicial.⁽¹³⁾ Los extractos fueron conservados a 4 °C para los ensayos fitoquímicos.

La determinación de los tipos de metabolitos secundarios se realizó según la metodología descrita por Chigodi *et al.*⁽¹⁴⁾ Se evaluó la presencia de flavonoides, terpenoides, antocianinas, taninos, antraquinonas, glucósidos cardiotónicos, antocianinas, flobataninos, esteroides, cumarinas y emodinas. El contenido de los tipos de metabolitos se determinó de manera cualitativa a través del sistema no paramétrico de cruces.⁽¹⁵⁾

Cuantificación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del ácido dinitrosalisílico y se empleó la D-glucosa (Sigma) como azúcar patrón (0,1- 1,0 mg.mL⁻¹).⁽¹⁶⁾ La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro Ultrospect 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia) a una longitud de onda de 456 nm.

Cuantificación de carbohidratos solubles totales

El contenido de carbohidratos en las muestras se determinó colorimétricamente mediante el método del fenol-sulfúrico ⁽¹⁷⁾, empleando D-glucosa (0,01-0,08 mg.mL⁻¹) como azúcar patrón. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 490 nm, con el uso de un espectrofotómetro Ultrospect 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia).

Contenido de proteínas solubles totales

El contenido proteico se determinó colorimétricamente mediante el método descrito por Lowry utilizando como sustancia patrón albúmina de suero bovino (0,1-0,7 mg.mL⁻¹). Los valores de absorbancia se obtuvieron en un espectrofotómetro Ultrospect 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia) a una longitud de onda de 750 nm y las concentraciones (mg/mL) se determinaron mediante la curva patrón.⁽¹⁸⁾

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos se evaluó frente a bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (salvaje), *Staphylococcus epidermidis* (salvaje) y Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* (salvaje) y *Klebsiella* (salvaje). Las cepas salvajes fueron aisladas e identificadas en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Matanzas. Las mismas procedían de muestras de fluido de la ubre de una vaca afectada por mastitis. El ensayo se realizó mediante el método de difusión en pocillos.⁽¹⁹⁾

Las cepas bacterianas fueron rejuvenecidas previamente sobre medio Agar Cerebro de Corazón a 37 °C. Se inoculó el medio Agar Mueller-Hinton con células de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Macfarlán con el uso de un hisopo estéril. Los pocillos se realizaron con la ayuda de un horador estéril de 8 mm de diámetro y se les adicionaron 100 µL (200 mg.mL⁻¹) de cada extracto. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37 °C.

Para cada cepa bacteriana se emplearon como controles negativos los solventes utilizados para realizar los extractos y como control positivo el antibiótico tetraciclina ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La actividad antibacteriana se obtuvo a partir del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Se realizaron tres réplicas por cada extracto evaluado.⁽⁷⁾

Diseño experimental y análisis estadístico

Los ensayos de actividades antibacteriana se realizaron mediante un diseño completamente aleatorizado. La determinación cualitativa de los tipos de metabolitos secundarios y las lecturas de absorbancia para las cuantificaciones bioquímicas se realizaron por triplicado.

Los datos correspondientes a los análisis bioquímicos cuantitativos y a la actividad antibacteriana fueron procesados con el paquete SPSS versión 15.0 para Windows. Se determinó el ajuste de los datos a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett.⁽²⁰⁾ Los datos fueron procesados mediante ANOVA de clasificación simple y se realizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD para la comparación entre las medias.

Resultados y discusión

El contenido cualitativo de metabolitos secundarios en extractos acuosos y etanólicos de hojas y flores de *Tagetes erecta* L. se muestra en la tabla 1. Se observó la presencia de flavonoides, terpenoides, taninos, saponinas y glucósido cardiotónicos en ambos órganos, mientras que se detectaron cumarinas en las hojas y contenidos bajos de esteroides en las flores. De manera general el etanol resultó ser un mejor solvente a excepción de las saponinas, que solo fueron detectadas en bajas cantidades en los extractos acuosos de hojas y flores.

Tabla 1 - Contenidos relativos de metabolitos secundarios en extractos acuosos y etanólicos de hojas y flores de *Tagetes erecta* L. E. Ac: extracto acuoso, E. Et: extracto etanólico

Tipo de metabolito secundario	Hoja		Flor	
	E. Ac	E. Et	E. Ac	E. Et
Flavonoides	+	++	-	+
Terpenoides	++	+++	++	++
Antocianinas	-	-	-	-
Esteroides	-	-	-	+
Saponinas	+	-	+	-
Taninos	+	+++	+	+++
Cumarinas	+	++	-	-
Glucósidos cardiotónicos	-	+	-	+
Antraquinonas	-	-	-	-
Flobataninos	-	-	-	-
Emodinas	-	-	-	-

Contenido: +++ = abundante, ++ = moderado, + = bajo, - = ausencia

Diferentes autores refirieron la presencia de flavonoides, terpenoides, taninos y saponinas⁽⁷⁾, glucósidos cardiotónicos y cumarinas⁽²¹⁾, en extractos de *Tagetes erecta* L. Las diferencias con relación a las proporciones encontradas de estos metabolitos en el presente trabajo y las observadas por otros investigadores, pueden estar relacionadas con diversos factores como la época del año en que tomaron las muestras, el secado y la variedad o genotipo.⁽²²⁾

Los compuestos de naturaleza flavonoide y terpenoide son considerados agentes antioxidantes, lo que sugiere un uso potencial de estos extractos para el tratamiento de diferentes patologías como arterosclerosis, procesos antiinflamatorios, anticancerígenos y para reducir los niveles de colesterol.⁽²³⁾

Los terpenoides también están asociados con las propiedades antifúngicas de extractos acuosos de *H. patens* Jacq.⁽²⁴⁾ Estos autores observaron un efecto inhibitorio de los extractos contra diferentes especies de hongos como *Aspergillus fumigatus* NCBT 112, *Candida albicans* NCBT 140, *Fusarium oxysporum* NCBT 156 y *Rhizoctonia solani* NCBT 194.

Las cumarinas y sus derivados bioactivos son compuestos que presentan diversas propiedades farmacológicas. Estos metabolitos poseen actividad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana y anticoagulante.⁽²⁵⁾

La tabla 2 muestra los contenidos de carbohidratos solubles totales (CST), azúcares reductores (AR) y proteínas solubles totales (PST) en extractos acuosos y etanólicos de hoja y flor de *Tagetes erecta* L.

Tabla 2 - Metabolitos primarios en extractos acuosos y etanólicos de hoja y flor de *Tagetes erecta* L.

Los valores representan las medias de tres repeticiones y la desviación típica.

Extracto	CST (mg.mL ⁻¹)	AR (mg.mL ⁻¹)	PST (mg.mL ⁻¹)
Flor (etanólico)	7,32 ^a ± 0,12	0,86 ^b ± 0,03	1,48 ^b ± 0,07
Flor (acuoso)	1,71 ^c ± 0,08	0,094 ^a ± 0,01	0,36 ^c ± 0,03
Hoja (etanólico)	2,50 ^b ± 0,23	2,66 ^a ± 0,027	13,57 ^a ± 0,39
Hoja (acuoso)	0,94 ^c ± 0,11	0,23 ^c ± 0,04	1,60 ^b ± 0,04

Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey (P≤0,05).

Las mayores concentraciones de carbohidratos solubles totales fueron observadas en el extracto etanólico de las flores, seguido del extracto etanólico de hojas. Las cantidades encontradas en los extractos acuosos de ambos órganos fueron similares, lo cual evidencia una mejor extracción de estos compuestos con el solvente etanol. El contenido de proteínas solubles totales mostró los valores más elevados en el extracto etanólico de hojas, los cuales fueron superiores al resto de los extractos.

Los valores de azúcares reductores fueron superiores en los extractos etanólicos de ambos órganos con relación a las variantes acuosas. Las mayores concentraciones fueron obtenidas en hojas (2,66 mg.mL⁻¹). La cuantificación de azúcares reductores en *T. erecta* L., además de contribuir a la caracterización bioquímica de esta especie, tiene una importancia adicional ya que estos azúcares interfieren con la extracción de saponinas, las cuales son de gran interés comercial.⁽²⁶⁾

Los resultados de la actividad antimicrobiana muestran un efecto antibacteriano de los extractos de hojas y flor de *Tagetes erecta* L. frente a las diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas que se enfrentaron (tabla 3). De manera general el órgano que mostró los mejores resultados fue la flor, donde los extractos produjeron halos de inhibición contra algunos patógenos (*S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis*) similares al control positivo.

Al comparar la inhibición del crecimiento de los cepas Gram + y Gram – frente a los extractos utilizados, se pudo observar una mayor actividad antibacteriana frente a las Gram positivas. Este resultado puede estar relacionado con la complejidad de las paredes celulares de ambos grupos bacterianos. Las bacterias Gram negativas presentan una mayor complejidad

que las Gram positivas, ya que las primeras poseen además de la capa de peptidoglicano, una capa de lipopolisacáridos que puede constituir un obstáculo para la entrada de metabolitos secundarios hidrosolubles hacia el interior de la célula, los cuales son responsables de la acción antibacteriana.⁽²⁷⁾

Tabla 3 - Actividad antibacteriana de extractos etanólicos (200 mg.mL⁻¹) de hojas y flores de *T. erecta* L. frente bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas. EE: error estándar.

Extractos / Controles	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> (salvaje)	
	DZI (mm)	± EE	DZI (mm)	± EE
Hoja	12,3 ^b	0,04	21,3 ^b	0,13
Flor	19,5 ^a	0,14	24,0 ^a	0,12
Tetraciclina (control +)	18,0 ^a	0,10	21,2 ^b	0,10
Solución hidroalcohólica (control -)	0,0 ^c	0,00	0,0 ^c	0,00
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i>	
Hoja	12,3 ^c	0,62	13,0 ^c	0,15
Flor	15,8 ^b	0,49	15,6 ^b	0,11
Tetraciclina (control +)	18,6 ^a	0,33	21,0 ^a	0,20
Solución hidroalcohólica (control -)	0,0 ^d	0,00	0,0 ^d	0,00
	<i>S. epidermidis</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
Hoja	18,0 ^b	0,10	11,6 ^c	0,10
Flor	24,5 ^a	0,16	16,4 ^b	0,09
Tetraciclina (control +)	23,5 ^{ab}	0,28	19,5 ^a	0,05
Solución hidroalcohólica (control -)	0,0 ^c	0,00	0,0 ^d	0,00

DZI: diámetro de la zona de inhibición. Los datos representan medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencia significativa según prueba de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con la actividad antibacteriana observada por otros autores contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*^(28,29), *Staphylococcus epidermidis*⁽²⁹⁾, así como otras especies diferentes a las evaluadas como *Bacillus subtilis* y *Bacillus circulence*.⁽²⁸⁾

La actividad antibacteriana encontrada en los extractos de hojas y flores de *Tagetes erecta* L. pueden estar relacionada con la presencia de determinados tipos de metabolitos secundarios como los flavonoides y terpenoides, los cuales evidenciaron diferentes actividades farmacológicas y antibacteriana.⁽³⁰⁾ Los taninos encontrados en cantidades abundantes en los extractos analizados, por ejemplo, pueden reaccionar con proteínas ricas

en prolina para formar complejos irreversibles que provocan la inhibición de la síntesis de proteínas.⁽³¹⁾

Conclusiones

Los tipos de metabolitos secundarios encontrados en extractos de hojas y flores de *Tagetes erecta* L. muestran las potencialidades de esta planta en la medicina humana y animal, debido a la presencia en general de flavonoides, terpenoides y taninos que han sido referidos como agentes terapéuticos con diversas propiedades biológicas. Así mismo, la actividad antibacteriana observada sugiere el uso de esta especie para combatir enfermedades en animales y humanos provocadas por bacterias patógenas y justifica el empleo etnobotánico de esta especie en diversas patologías.

Referencias bibliográficas

1. EKALUO, U. B.; IKPEME, E. V.; EKERETTE, E. E.; CHUKWU, C. I. "In vitro antioxidant and free radical activity of some Nigerian medicinal plants: bitter leaf (*Vernonia amygdalina* L.) and guava (*Psidium guajava* Del.)". *Research Journal of Medicinal Plant*. 2015, **9** (5), 215-226. ISSN 1819-3455.
2. MASOKO, P. "Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial properties of *Spilanthes mauritiana* used traditionally in Limpopo Province, South Africa". *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017, **22** (4), 936-943. DOI: 11.1177/2515690x17746774.
3. EKALUO, U. B.; IKPEME, E. V.; UDENSI, O. U.; EKERETTE, E. E. *et al.* "Comparative in vitro assessment of drumstick (*Moringa oleifera*) and neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts for antioxidant and free radical scavenging activities". *Res. J. Med. Plant*. 2015, **9** (1), 24-33. ISSN 1819-3455.

4. MUNITA, J.M. AND ARIAS, C.A. "Mechanisms of Antibiotic Resistance". *Microbiol Spectr.* 2016, **4** (2), 1-37. DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
5. DJEUSSI, D. E.; NOUMEDEM, J. A.; SEUKEP, J. A.; FANKAM, A. G. "Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria". *BMC, Complement Altern Med.* 2013, **13** (1), 1-9. DOI: 10.1186/1472-6882-13-164.
6. WIKANINGTYAS, P.; SUKANDAR, E. Y. "The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2016, **6** (1), 16–19. ISSN 2221-1691.
7. KADAM, P. V.; BHINGARE, C. L.; SUMBE, R. B.; NIKAM, R. Y.; PATIL, M. J. "Pharmacognostic, physicochemical and phytochemical investigation of *Tagetes erecta* Linn flowers (Asteraceae)". *Journal of Biological and Scientific Opinion.* 2013, **1** (3), 21- 24. DOI: 10.7897/2321-6328.01124.
8. SHETTY, L. J.; SAKR, F. M.; AL OBAIDY, K.; PATEL, M. J.; SHAREEF, H. "A brief review on medicinal plant *Tagetes erecta* Linn". *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2015, **5** (3), 091-095. ISSN 2231-3354.
9. KWAMBOKA, N. J.; NGWELA, W. J.; MORWANI, G. R. "*In vitro* antibacterial activity of *Tagetes minuta* and *Capsicum frutescens* extracts against *Pectobacterium carotovorum*". *International Journal of Agricultural Sciences.* 2016, **6** (8), 1119-1127. ISSN: 2167-0447.
10. RHAMA, S.; MADHAVAN, S. "Antibacterial Activity of the Flavonoid-patulitrin isolated from the flowers of *Tagetes erecta* L.". *International Journal of Pharm. Tech Research.* 2011, **3** (3), 1407-1409. ISSN 0974-4304.
11. SARIN, R. "Insecticidal activity of callus culture of *Tagetes erecta*". *Fitoterapia.* 2004, **75** (1), 62-64. DOI: 10.1016/j.fitote.2003.07.011.
12. NIRANJAN, K.; SATHIYASEELAN, V.; JEYASEELAN, E. C. "Screening for antimicrobial and phytochemical properties of different solvents extracts of leaves of *Pongamia pinnata*". *International Journal of Scientific and Research Publications.* 2013, **3** (1), 1-3. ISSN 2250-3153.

13. PAREKH, J.; CHANDA, S. "Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants". *African Journal of Biomedical Research*. 2006, **10**, 175- 181. ISSN 1119-5096.
14. CHIGODI, M. O.; SAMOEI, D. K.; MUTHANGYA, M. "Phytochemical screening of *Agave sisalana perrine* leaves (waste)". *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2013, **4** (4), 200-204. ISSN 0976-4550.
15. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA (MINSAP). *Guía metodológica para la investigación en plantas medicinales*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1997.
16. MILLER, G. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.* 1959, **31** (3), 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
17. DUBOIS, M. K.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. "Colorimetric method for determination of sugars and related substance". *Anal. Chem*, 1956, **28** (3), 350-356. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/4c90/084da99ed7c2099fba34a2becc4b41d70ce1.pdf>. Consulta: 7 de noviembre, 2018.
18. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. "Protein measurement the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 1951, **193** (1), 265-275. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Protein-Measurement-with-the-Folin-Lowry-ROSEBROUGH/0dea7761d3db2a1b723f94dfb03735848ace4799>. Consulta: 7 de noviembre de 2018.
19. PEREZ, C.; PAUL, M.; BAZERQUE, P. "An antibiotic assay by the agar well diffusion method". *Acta Bio. Med. Exp.* 1990, **15**, 113- 115.
20. SIGARROA, A. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1985.
21. DEVIKA, R.; KOILPILLAI, J. "Phytochemical screening studies of bioactive compounds of *Tagetes erecta*". *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2012, **3** (4), 596-602. ISSN 0975-6299.
22. LIU, W.; LIU, J.; YIN, D.; ZHAO, X. Influence of Ecological Factors on the Production of Active Substances in the Anti-Cancer Plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. *PLoS One*. 2015, **10** (4), 1-22. DOI:10.1371/journal.pone.0122981.

23. REDDY, G. K.; LAKSHMI, S. M.; KUMAR, C. K. A.; KUMAR, D. S.; SRINIVAS, T.L. "Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activity of methanolic extract of *Agave cantala* Roxb". *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*. 2013, **4** (4), 1300-1309. ISSN 2230-7346.
24. ABUBACKER, M. N.; SATHYA, C.; PRABAKARAN, R. "In vitro antifungal potentials of *Hamelia patens* Jacq. (Rubiaceae) aqueous extracts of leaves, flowers and fruits". *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2013, **10** (2), 699-704.
25. AL MAJEDY, Y. K.; AL AMIERY, A.; KADHUM, A. A.; BAKARMOHAMAD, A. "Antioxidant activity of coumarins". *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2017, **8** (1), 24-30. DOI: 10.5530/srp.2017.1.6.
26. GUERRA, L. J. O.; NOGUEIRAS, C.; DELGADO, R.; HERNÁNDEZ, O. "Determinación cuantitativa de saponinas y azúcares reductores de *Agave briottoniana* T". *Revista Cubana de Química*. 2001, **13** (3), 37-42.
27. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, B.; STAHL, D. A. *Brock Biology of Microorganism*. 14^{ta} edición. New York: McGraw Hill Medical. 2015. ISBN: 9780321897398.
28. VERMA, P. AND VERMA, A. "Evaluation of antibacterial activity of different parts of *Tagetes erecta*". *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*. 2012, **3** (6), 1766-1768. ISSN: 0976-7126.
29. RAMYA, R.; MAHNA, S.; BHANUMATHI, S. P.; BHAT, S. K. "Analysis of phytochemical composition and bacteriostatic activity of *Tagetes* spp". *Inter. Res. J. Pharm.* 2012, **3** (11), 114-116. ISSN 2230-8407.
30. KHATTAK, K.F. "Antioxidant activities and phytochemicals of *Tagetes erecta* flowers as affected by drying methods". *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 2014, **4** (9), 253-262. ISSN 2090-4274.
31. JIMÉNEZ SUÁREZ, V.; REYES MUNGUÍA, A.; PÉREZ BERÚMEN, C.; ALVARADO SÁNCHEZ, B. "Separación cromatográfica del extracto de *Hamelia patens*". *Revista Académica de Investigación*. 2012, **11**, 1-10. ISSN: 1989-9300.