

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



**“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE TIPO INSECTICIDA, ANTIFUNGICA Y ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL
DE LAS FLORES DE *Chrysanthemum coronarium*”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

JESSICA VENTURA MARTINEZ

Tijuana, B.C.

Marzo, 2017

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

"2017 Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma de Baja California"

FOLIO No. 009

Tijuana, B. C., a 22 de febrero de 2017.

C. Jessica Ventura Martinez
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

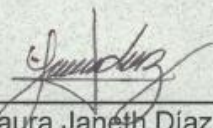
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Iván Córdova Guerrero y la M.C. Laura Janeth Díaz Rubio, quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema "CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TIPO ACARICIDA, ANTIFUNGICA Y ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS FLORES DE *Chrysanthemum coronarium*" el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

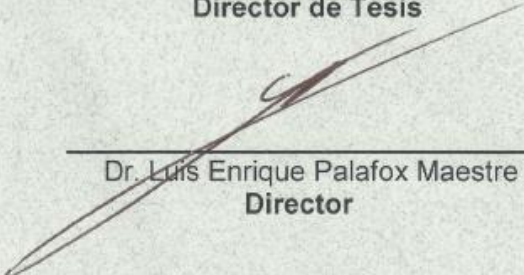
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- OBJETIVOS
- III.- GENERALIDADES
- IV.- METODOLOGÍA
- V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS
- VI.- CONCLUSIONES



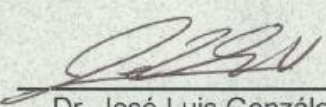
Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis



M.C. Laura Janeth Díaz Rubio
Co-Directora de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

“Algún día encontraremos lo que estamos buscando,
o quizás no,
quizá encontremos algo mucho mejor”

Julio Cortázar

Parte esencial de este trabajo es la aportación de múltiples personas que en todo momento estuvieron a mi lado apoyándome y compartiendo sus conocimientos e ideas para la culminación exitosa del presente proyecto.

A mi alma máter, la **Universidad Autónoma de Baja California**, principalmente a la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería**, institución que me abrió sus puertas y brindó un espacio para yo poder iniciar mi carrera profesional, Gracias.

Un gran y sincero agradecimiento a colaboradores esenciales en el presente proyecto, muchas gracias por su apoyo constante, disponibilidad, entusiasmo y el compartir sus conocimientos conmigo, Dra. Rufina Hernández Martínez, Ing. Eduardo Vargas, Dr. Daniel Chávez, Dr. Raúl Díaz Molina.

Dr. Iván Córdova Guerrero

“Algunos hombres observan el mundo y se preguntan: ¿Por qué? Otros hombres observan el mundo y se preguntan: ¿Por qué no?”

George Bernard Shaw

Infinitas gracias por poner en mis manos este proyecto. Por alentarme a seguir creciendo como profesionista y persona, y alimentar ese deseo por continuar preparándome y entrar en el maravilloso mundo de la investigación. Por ser para mí un ejemplo a seguir de solidaridad, esfuerzo, compromiso, lealtad, entusiasmo y pasión a todo lo que hace, por enseñarme que nunca hay que conformarse, que siempre hay que seguir adelante por más dura que parezca la batalla, que vale la pena insistir y luchar por todo aquello que se quiere. Agradezco su incondicional apoyo como profesor, investigador y amigo, le agradezco por toda la confianza que me ha brindado, por abrirme las puertas de su laboratorio, y principalmente, por creer en mí, Gracias.

M.C. Laura Díaz Rubio

“Nada es más digno de admiración en un hombre noble que el saber aceptar e imitar las virtudes de los demás”

Confucio. Excelente persona, maestra, amiga y compañera. Por todo su apoyo en lo profesional y personal, por su entera disponibilidad y compromiso, sin duda alguna para mí un ejemplo a seguir. Agradezco el tiempo brindado y el compartir sus conocimientos para apoyarme en la realización de este proyecto, por sus consejos e ideas. Cada día es menos común encontrarse con personas como usted de las cuales es muy sencillo sentir un gran aprecio, admiración y respeto, es usted de esas personas que inspiran a ser, a crecer a soñar. Por ello y mucho más me siento muy orgullosa y agradecida de tenerla a mi lado, de contar con su amistad y su compañía.

M.C. Eduardo Noriega Iribe

“La amistad es un alma que habita en dos cuerpos; un corazón que habita en dos almas” Aristóteles. Palabras faltarían para describir mi sentir, no me resta más que decir Gracias, por tu amistad y cariño, por tu apoyo y consejos, por siempre a tu manera crearme una sonrisa aun cuando el cansancio no lo permita. Por compartir tus conocimientos conmigo, y estar ahí con esas palabras y abrazo de aliento cuando lo necesito. Sin duda alguna de las pocas personas que se han ganado mi respeto y admiración por el esfuerzo, la dedicación y el amor con que hacen lo que les gusta.

Ing. Isabel Edurne Cruz Gasca FRASE- AUTOR

Siempre es un honor toparse en la vida con personas como tú, tan alegres, amables y con un amor incansable por su trabajo; con ese ánimo y ganas constantes por aprender y seguir creciendo. Agradezco todo tu apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, todos tus buenos consejos y sobre todo tu amistad.

Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales.

“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

Considerado desde hace un tiempo mi segundo hogar, la cuna que incubaba un sinfín de conocimientos dispuestos a nacer. Considerado para mí el sustento de este proyecto, la base, el lugar que da pie a nuevas ideas y pensamientos, mi centro de inspiración, mi lugar favorito.

Además de ser el sitio en donde conocí a personas maravillosas, excelentes compañeros y amigos, Jesús, Damián, Adrián, Noé, Elizabeth, Isabel, Diego, Michel, Alejandra, Arturo, gracias chicos por todo su apoyo y mantener siempre el buen ánimo y ambiente en nuestro laboratorio, y sobre todo el compañerismo, respeto y lealtad por todo lo que hacemos.

A mi familia

“Tener un lugar para ir –es un hogar-. Tener alguien a quien amar –es una familia-. Tener ambas –es una bendición-”

Donna Hedges

Mi motor, mi fuerza, mi aliento cuando el aire afuera parece acabar, esa es mi familia. No existen palabras para agradecerles papás, Ángeles y Ramón por todo lo que han hecho por mí, su esfuerzo continuo por darme siempre lo mejor, por hacer de mí una mejor persona cada día. Gracias por sus consejos, sus regaños, por sus palabras que aunque la mayoría de las veces pareciera no escuchar, créanme, tengo todo ello muy presente. Gracias por siempre apoyarme en todo lo que quiero hacer, por aguantarme en mis ratos de estrés y mal genio, por entender mis continuas llegadas tarde y mi ausencia en casa.

Gracias por ser lo que son, por educarme como lo han hecho y estar siempre, incondicionalmente, cuando lo he necesitado.

Agustín, hermano gracias por cuidarme y apoyarme, siempre a tu manera sé que estás pendiente de mí. Eres ejemplo claro de que cuando se quiere algo se puede lograr, admiro

tu esfuerzo y compromiso que le pones a todo lo que quieres, el valor que tienes para levantarte de las caídas y tu lucha constante por querer ser siempre mejor.

Familia, Gracias, son ustedes mi mejor y mayor ejemplo a seguir, de amor, humildad, unión y apoyo, de coraje para salir adelante y luchar contra todo problema que se nos presente.

A mis amigos

“La amistad es un acuerdo perfecto de los sentimientos de cosas humanas y divinas,
unidas a la bondad y a una mutua ternura”

Cicerón

Mis amigos, seres extraños que la vida puso en mi camino, tan raros como yo, tan únicos y diferentes uno del otro. De excelentes ideas, mentes brillantes y un gran corazón. No tengo más que decirles Gracias, por su amistad, por desear siempre lo mejor para mí, por su apoyo constante, por hacerme ver cuando algo no estoy haciendo bien, por alentarme a mejorar; Anahí, Yera, Karlita, Miguel, los quiero mucho chicos, gracias por absolutamente todo.



RESÚMEN

En la presente investigación se aborda el trabajo realizado sobre la caracterización química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium*.

En la introducción se trata un poco el tema de la problemática que presenta actualmente la industria agrícola, tratándose de los tipos de plagas que los afectan y de qué modo es que lo hacen. Se hace referencia al uso que se le da a los plaguicidas comercialmente utilizados de los cuales se tiene bien sabido su origen, siendo éste sintético, así como las múltiples desventajas que su uso ocasiona.

En el apartado de generalidades se hace mención en primer instancia a las características de la especie estudiada, *C. coronarium*, su descripción botánica y clasificación taxonómica, así como su origen y distribución; además se muestran algunos de los estudios que ya se han realizado al aceite esencial de esta especie, tanto de caracterización química, como del análisis de su actividad biológica frente a diferentes modelos biológicos, principalmente aquellos que ocasionan daños severos en cultivos agrícolas y almacenes.

La parte metodológica de este proyecto consta principalmente de cómo es que se realizaron cada una de las pruebas, tales como la acaricida, antifúngica, antioxidante, así como la caracterización química del aceite esencial, desde su extracción hasta su análisis.

Enseguida de cada metodología se encuentran los resultados obtenidos en cada uno de ellos, siendo estos la caracterización química del aceite esencial de *C. coronarium* de origen mexicano, así como la determinación de su perfil como acaricida y antifúngico ante organismos fitopatógenos, además de su evaluación como antioxidante.

Finalmente se encuentran las conclusiones que se obtuvieron a partir de todo el procedimiento realizado y, principalmente, en base a los resultados obtenidos.

ÍNDICE

Índice de Figuras	i
Índice de Tablas.....	iv
Índice de gráficas.....	vi
Abreviaturas y Acrónimos	vii
 INTRODUCCIÓN	 1
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	15
 CAPÍTULO I. <i>Chrysanthemum coronarium</i> : Evaluación química del aceite esencial	
 1.1 GENERALIDADES	
1.1.1 <i>Chrysanthemum</i> sp.....	16
1.1.2 <i>Chrysanthemum coronarium</i>	19
1.1.3 Origen y distribución de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	20
1.1.4 Descripción botánica de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	21
1.1.5 Clasificación taxonómica de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	23
1.1.6 Estudios previos sobre la composición química del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	25
 1.2 METODOLOGÍA	
1.2.1 Recolección del material vegetal	36
1.2.2 Tratamiento del material vegetal	37
1.2.3 Extracción del aceite esencial	38

1.2.4	Caracterización del aceite esencial	40
-------	---	----

1.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.3.1	Caracterización del aceite esencial	42
1.3.2	Composición química	43

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TIPO ACARICIDA, ANTIFÚNGICA Y ANTIOXIDANTE

2.1 GENERALIDADES

2.1.1	Estudios previos sobre la actividad biológica del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	49
2.1.2	Estudios previos sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	57

2.2 METODOLOGÍA: ACTIVIDAD ACARICIDA

2.2.2	Biología y ciclo de vida de <i>Tetranychus urticae</i>	59
2.2.3	Daños ocasionados por <i>Tetranychus urticae</i>	60
2.2.4	Desarrollo experimental	61

2.3 METODOLOGÍA: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

2.3.1	Análisis de la actividad antifúngica. Introducción	63
2.3.2.	Procedimiento.....	63

2.4 METODOLOGÍA: ATIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.4.1 Introducción.....	65
2.4.2 Reducción del radical libre DPPH: Procedimiento.....	65
2.4.3 Reducción del radical libre ABTS: Procedimiento.....	67
2.4.4 Decoloración oxidativa de β -Caroteno: Procedimiento.....	69
2.5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
2.5.1 Resultados y discusión del análisis de la actividad acaricida	71
2.5.2 Resultados y discusión del análisis de la actividad antifúngica	74
2.5.3 Resultados y discusión del análisis de la actividad antioxidante	
2.5.3.1 Reducción del radical libre DPPH	78
2.5.3.2 Reducción del radical libre ABTS.....	80
2.5.3.3 Decoloración oxidativa de β -Caroteno.....	82
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA.....	85
APÉNDICE	91



ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de Diazinón	7
Figura 2 Estructura química de Lannate	7
Figura 3. Estructura química de Paraquat.....	7
Figura 4 Daños por plagas en cultivos agrícolas	8
Figura 5. Principales plagas de cultivos agrícolas en B .C. (<i>T. urticae</i> , <i>B. tabaci</i> y <i>Áfido</i>)	10
Figura 6. Ácido crisantémico y ácido piretroico	12
Figura 7. Cinerolona, Piretrolona y Jasmolona.....	12
Figura 8. Inflorescencias de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	15
Figura 9. Diferentes tipos de flores de <i>C. coronarium</i>	17
Figura 10. <i>Chrysanthemum indicum</i> , <i>Chrysanthemum morifolium</i> y <i>Chrysanthemum</i> <i>xhortorum</i>	18
Figura 11. <i>Chrysanthemum coronarium</i>	19
Figura 12. Distribución geográfica en México de <i>C. coronarium</i>	20
Figura 13. <i>C. coronarium</i> en orilla de camino	20
Figura 14. Morfología de <i>C. coronarium</i>	21
Figura 15. Fruto de <i>C. coronarium</i>	22
Figura 15. Flor de <i>C. coronarium</i>	23
Figura 16. Inflorescencias de <i>C. coronarium</i>	24
Figura 17. Ácido quínico	25
Figura 18. Alcanfor	26

Figura 19. Trans-tonghaosu.....	27
Figura 20. Acetato de bornilo	28
Figura 21. Acetato de trans-crisantenilo.....	28
Figura 22. (E)- β -farneseno.....	29
Figura 23. Acetato de crisantenilo	29
Figura 24. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>C. coronarium</i> originario de Italia	33
Figura 25. Localización de cerro "El vigía" en Zona playitas, Ensenada B.C.....	36
Figura 26. Flores de <i>Chrysanthemum coronarium</i> secándose	37
Figura 27. Sistema Clevenger modificado.....	38
Figura 28. Aceite esencial de <i>C. coronarium</i> en embudo de separación y en tubo Eppendorf	39
Figura 29. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.....	41
Figura 30. Cromatograma de gases de la composición química del aceite esencial de las flores de <i>C. coronarium</i>	45
Figura 31. Espectro de masas y estructura química de santolina trieno, identificado en el aceite esencial de <i>C. coronarium</i>	47
Figura 32. Espectro de masas y estructura química de trans-tonghaosu, identificado en el aceite esencial de <i>C. coronarium</i>	47
Figura 33. Espectro de masas y estructura química (Z)- β -farneseno, identificado en el aceite esencial de <i>C. coronarium</i>	48
Figura 34. Espectro de masas y estructura química de acetato de trans-crisantenilo, identificado en el aceite esencial de <i>C. coronarium</i>	48

Figura 35. <i>Bemisia tabaci</i> "Mosca blanca"	53
Figura 36. <i>Acanthoscelides obtectus</i> , <i>Ephesia kuehniella</i> , <i>Tribolium castaneum</i>	53
Figura 37. Ciclo de vida de <i>Tetranychus urticae</i>	59
Figura 38. Estabilización del radical DPPH	65
Figura 39. Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).....	67
Figura 40. <i>Tetranychus urticae</i> vista en estereoscopio	73
Figura 41. Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>Macrophomina phaseolina</i> en medio PDA con aceite esencial de <i>C. coronarium</i> y Benomilo®	76
Figura 42. Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>Phomopsis viticola</i> en medio PDA con aceite esencial de <i>C. coronarium</i> y Benomilo®	76
Figura 43. Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>Collectrotrichum spp.</i> , en medio PDA con aceite esencial de <i>C. coronarium</i> y Benomilo®	77
Figura 44. Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> , en medio PDA con aceite esencial de <i>C. coronarium</i> y Benomilo®	77
Figura 45. Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en medio PDA con aceite esencial de <i>C. coronarium</i> y Benomilo®	77



ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Lista de productos aplicados para el control de plagas y enfermedades en orden de frecuencia de aplicación.....	7
Tabla II.	Reportes en México de <i>L. theobromae</i> afectando distintos cultivos frutícolas y maderables	9
Tabla III.	Composición química del aceite esencial de las flores de <i>Chrysanthemum coronarium</i> de origen español.....	27
Tabla IV.	Composición química del aceite esencial de las flores de <i>Chrysanthemum coronarium</i> originario de Mograne Zaghouan, Túnez	30
Tabla V.	Origen, parte de la planta y los componentes principales (%), de los aceites esenciales de diferentes especies de <i>Chrysanthemum sp.</i> , estudiadas anteriormente.	32
Tabla VI.	Composición del aceite esencial de hoja y flor de <i>Chrysanthemum coronarium</i> originario de Italia.	34
Tabla VII.	Cantidad (g y rendimiento (%)) del aceite esencial de <i>C. coronarium</i>	42
Tabla VIII.	Composición química del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i> de Ensenada, B.C, México.	44
Tabla IX.	La inhibición del crecimiento de las especies de hongos con aceite volátil (10 µl / placa de Petri) de <i>Chrysanthemum coronarium</i> originario de España.....	51
Tabla X.	Inhibición del crecimiento de las especies fúngicas en ensayo de placa de agar por el aceite (20 µl / placa de Petri) de <i>Chrysanthemum coronarium</i> originario de España	52
Tabla XI.	Dosis letales en larvas de <i>Tribolium castaneum</i> por aplicación tópica de aceite esencial de flores de <i>C. coronarium</i> originario de España.....	54
Tabla XII.	Repelencia y mortalidad (valores medios) en adultos de <i>T. castaneum</i> por actividad volátil del aceite esencial de <i>C. coronarium</i> originario de España	55
Tabla XIII.	Mortalidad y repelencia (valores medios) de <i>A. obtecus</i> por actividad volátil de aceite esencial de flores de <i>C. coronarium</i> originario de España.....	55

Tabla XIV.	Mortalidad y repelencia (valores medios) en adultos de mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>) causadas por el aceite esencial de flores de <i>C. coronarium</i> originario de España56
Tabla XV.	Esquema de concentraciones utilizadas para bioensayo de acaricida61
Tabla XVI.	Resultados del porcentaje de mortalidad en <i>Tetranychus urticae</i> del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i> de Ensenada, B.C., México.....72
Tabla XVII.	Crecimiento de cepas de hongos fitopatógenos expuestas a aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i> de Ensenada, B.C., México75
Tabla XVIII.	Resultados de actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i> sobre el radical DPPH ⁺78
Tabla XIX.	Resultados de actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i> sobre el radical ABTS.....80



ÍNDICE DE GRÁFICAS

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Clasificación química de metabolitos identificados en el aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i>46
Gráfica 2	Comparación de actividad antiradicalaria entre el aceite esencial de <i>C. coronarium</i> originario de Túnez y el control BHT58
Gráfica 3	Comparación del % de mortalidad del aceite esencial de <i>Chrysanthemum coronarium</i> de Ensenada, B.C., México y Pyganic 5%®72
Gráfica 4	Perfil de actividad antioxidante del aceite esencial de <i>C. coronarium</i> sobre el radical DPPH ⁺79
Gráfica 5	Perfil de actividad antioxidante del aceite esencial de <i>C. coronarium</i> sobre el radical ABTS.....81
Gráfica 6	Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>C. coronarium</i> y α .tocoferol.....82



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviatura	Descripción
a.C	antes de Cristo
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NR	No reportado
<i>C. coronarium</i>	<i>Chrysanthemum coronarium</i>
GC/MS	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
DPPH	Difenil Picril Hidrazilo
ABTS	2-2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
mm	Milímetros
IR	Índice de retención
MS	Coincidente espectros de masas
°C	Grados centígrados
m	Metros
µm	Micras
µL	Microlitros
min	Minutos
g	Gramos
mg	Miligramos
g/mL	Gramos por mililitro
µg/mL	Microgramos por mililitro
µM	Micromolar
TR	Tiempo de retención
MH	Monoterpeno hidrocarbonado
MO	Monoterpeno oxigenado
SH	Sesquiterpeno hidrocarbonado
SO	Sesquiterpeno oxigenado
As	<i>Alternaria sp.</i>
Ab	<i>Alternaria brassicola</i>
Af	<i>Aspergillus flavus</i>
Bc	<i>Botrytis cinérea</i>

Fm	<i>Fusarium moniliforme</i>
Fs	<i>Fusarium solani</i>
Ma	<i>Mycocentrospora acerina</i>
Pd	<i>Penicillium digitatum</i>
Pu	<i>Pythium ultimum</i>
Rs	<i>Rhizoctonia solani</i>
Ss	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Sl	<i>Lacrymans sérpula</i>
<i>T. urticae</i>	<i>Tetranychus urticae</i>
DL ₅₀	Dosis letal media
CE ₅₀	Concentración efectiva media
mg/ml	Miligramos por mililitro
BHT	Butilhidroxianisol
PDA	Agar papa dextrosa
MC	Mortalidad corregida
%AA	Porcentaje de actividad antioxidante
NIST	National Institute of Standards and Technology



INTRODUCCIÓN

El hombre y el uso de las plantas

El hombre una vez **sedentarizado**, delimitó su entorno, fijó espacios y marcó perímetros que **establecieron fronteras entre lo más próximo, como suyo, y lo no cuidado como ajeno**. En ese nuevo espacio pudieron cultivarse plantas especialmente útiles para la alimentación o para usos específicos por sus propiedades curativas, mágicas o venenosas. (Segura, 2009).

Una de las principales aplicaciones que el hombre ha dado a las plantas, además de su uso como fuente de alimentación, es utilizarlas como remedios de curación. Este uso se remonta al principio de la historia de la humanidad, por medio de aciertos y errores el humano aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia. Cabe mencionar que sin los recursos que le ofreció la naturaleza, el hombre no hubiera sobrevivido.

El hombre al ir adquiriendo estos conocimientos comenzó a realizar recopilaciones escritas sobre el uso de las plantas, se sabe que cerca de 3000 años a.C se escribió el libro más antiguo de plantas medicinales en China; los sumerios, 2500 años a.C usaban las plantas con fines curativos; los asirios conocían más de 250 hierbas medicinales; en la Grecia antigua usaban, entre otras, la canela, el ruibarbo, la genciana y la mostaza.

Gradualmente el hombre al dominar a la naturaleza, ha roto muchos de los lazos que lo unen a ella. Hoy la medicina se vale de fármacos sintéticos para aliviar todas las enfermedades. Muchas de estas drogas son benéficas, pero también muchas, por mal uso o abuso, han perdido su eficacia y en incontables casos han provocado efectos secundarios nocivos.

Por fortuna, en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza, y por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar diversas afecciones. (Hernández, *et al.*, 1981)

Históricamente los productos de origen vegetal han pasado de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico occidental a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las últimas décadas, una presencia cada vez mayor.

Los productos naturales

El término **producto natural** se utiliza para designar a los **compuestos de origen natural** en un único organismo o en un número reducido de organismos muy relacionados entre sí. **En la mayoría de los casos no son esenciales para la planta**, insecto o microorganismo que los producen, a diferencia de lo que ocurre con otros compuestos orgánicos existentes en la naturaleza como azúcares, aminoácidos, nucleótidos y los polímeros derivados de ellos que son a la vez esenciales y omnipresentes.

Dos ejemplos de productos naturales ayudarían a entender mejor este concepto, como es el caso de la morfina, la cual sólo existe en tres especies de amapola, *Papaver somniferum*, *Papaver setigerum* y *Papaver rhoeas*, así como las penicilinas, son únicamente producidas por unas pocas especies de hongos.

El interés actual hacia los productos naturales se orienta a aspectos como quimiotaxonomía, estudios enzimáticos y ecología química.

Otro de los campos de investigación en productos naturales, se refiere a la función que desempeñan algunos de ellos en los organismos en los cuales se originan, su papel como mediadores de las interacciones ecológicas, asegurando la supervivencia de determinados organismos en un entorno hostil.

Dentro de la amplia gama de productos naturales de interés biológico, los aceites esenciales se han convertido en un excelente blanco de estudios, ya que investigaciones científicas avalan el uso de estos aceites como potenciales plaguicidas, convirtiéndose esto en una nueva forma de tratar diversas plagas agrícolas y disminuir el uso de sustancias químicas sintéticas, las cuales por el uso continuo e indiscriminado no sólo han causado enfermedades (**Waterhouse, 1996**) y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo, si no también han afectado al medio ambiente, acumulándose por bioconcentración en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y el agua. Se tiene el conocimiento de que muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas de gran importancia contra plagas de insectos (**Pantoja, 2010**), esto

tiene una gran ventaja para las industrias agrícolas ya que se controlan las plagas y se disminuye el daño en los cultivos, además de una importante disminución en los costos que estos problemas generan.

A partir de la necesidad por encontrar una nueva alternativa natural para el control de plagas y reemplazar así los pesticidas sintéticos, aparecen los insecticidas naturales, los cuales ofrecen seguridad para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica. **(Borembaum, 1989)**

Para la selección de plantas que contengan metabolitos secundarios susceptibles de ser utilizados como insecticidas naturales, es recomendable que estas sean de fácil cultivo y óptima producción, así como con principios activos potentes y de alta estabilidad química. **(Curtis *et al.*, 2003)**

La búsqueda de métodos para la protección natural de cultivos sigue vigente, aun tomando en cuenta que el mercado ofrece una amplia variedad de productos. La naturaleza nos proporciona medios para el cuidado de cultivos que merecen nuestra atención. Estos se originan en la riqueza intrínseca de las especies y que surgen de su lucha por la supervivencia. La protección natural de cultivos reduce el riesgo de la resistencia de los insectos, tiene menos consecuencias letales para los enemigos naturales, reduce la aparición de plagas secundarias, es menos nocivo para el hombre y no ocasiona daños en el medio ambiente. **(Stoll, 1989)**

Como alternativa, los productos naturales provenientes de una gran variedad de plantas, actúan inhibiendo, repeliendo, disuadiendo o eliminando plagas de insectos de distinto tipo (rastreros, voladores, chupadores, defoliadores, etc.) así como estimulando procesos vitales en los cultivos para su protección de los ataques de las distintas plagas. Algunas de estas plantas han sido estudiadas y otras siguen vigentes por leyenda popular. **(Sánchez, 2002; Stoll, 1989)**

Uso de plaguicidas

Los **plaguicidas**, también conocidos como **pesticidas**, son cualquier sustancia, natural o sintética, elaborada para controlar, matar, repeler o mitigar cualquier **plaga**. Dicha plaga puede ser cualquier organismo vivo que cause daños a cultivos, seres humanos u otros animales, provocando pérdidas económicas y/o la transmisión de enfermedades. Las plagas pueden ser de insectos, ratones y otros animales, plantas no deseadas (malas hierbas), hongos, microorganismos (bacterias, virus).

Desde los inicios de la agricultura, los seres humanos han utilizado sustancias químicas para el control de plagas. Inicialmente se utilizaban compuestos inorgánicos como azufre, arsénico, mercurio o plomo; pero el descubrimiento por parte de Paul Müller, en 1939, del insecticida **DDT** (Diclorodifeniltricloroetano) causó un gran impacto en el control de plagas y pronto se extendió su uso por todo el mundo.

En aquel entonces los pesticidas gozaban de una buena reputación, principalmente debido al control que ejercían sobre enfermedades como la malaria, transmitida por *Anopheles sp.* y la peste bubónica, transmitida por *Yersinia pestis*, ambas responsables de la muerte de millones de personas. Sin embargo, esta opinión cambió radicalmente después de que se conocieran los efectos tóxicos del DDT en pájaros, particularmente tras la publicación del libro ***Silent spring*** (Primavera silenciosa) por Rachel Carson en 1962.

En todo el mundo, año con año, los cultivos destinados a satisfacer las necesidades básicas de la humanidad se ven mermados en su producción debido a la gran incidencia de plagas y el daño que éstas producen repercutiendo en la disminución de la calidad y rendimiento de las cosechas. (Hernández, 2000).

El uso de plaguicidas de síntesis química ha traído como consecuencia grandes inconvenientes como: la resistencia en plagas, la alteración del equilibrio dinámico de los ecosistemas; acumulación de residuos tóxicos a lo largo de las cadenas tróficas; eliminación de enemigos naturales; efectos letales en humanos y animales domésticos por intoxicación

directa; el surgimiento de nuevas plagas y el incremento en los costos de producción. (**Soto et al. 2000**)

En México, los efectos adversos de los plaguicidas sobre las personas expuestas a ellos se han tratado de soslayar por el sencillo método de enfatizar los miles de pesos que se ahorran con su uso. En gran medida, la insistente y ruidosa propaganda sobre los efectos positivos de estas sustancias ha oscurecido el hecho, innegable, de que también tienen efectos indeseables, y se puede decir que ha servido para justificar el desinterés oficial sobre ellos, la falta de estudios para documentar dichos efectos, la escasez de fondos para realizar los estudios mínimos necesarios y, en síntesis se puede decir que en gran medida ha logrado adormecer a la sociedad y a las autoridades sobre los múltiples problemas asociados con el uso de estas sustancias y sus repercusiones indeseables sobre el futuro del país.

El estado de Baja California constituye un foco de atracción para la población del resto del país, en parte por su dinámica económica y por su ubicación geográfica cercana al mercado estadounidense. Una de las actividades económicas primarias más importantes del estado es la agricultura, siendo ésta y la pecuaria las actividades más intensas, sobresaliendo la producción de trigo, algodón y alfalfa por la superficie sembrada, así como el tomate, la fresa y el cebollín por su alto valor de comercialización. Otros cultivos como la vid, frambuesa y olivo, son también de alta demanda en la región.

Baja California se encuentra entre los trece estados de México con mayor uso de plaguicida, siendo los cuatro principales Morelos, Sonora, Sinaloa y por supuesto Baja California.

Se calcula que en estos estados se aplica el 80% del total de plaguicidas usados a nivel nacional. **Bojórquez, 1994**, menciona que el uso de agroquímicos en Baja California se realiza de forma indiscriminada en términos de número de aplicaciones, cosechas y tiempos de reingreso. En el **Plan Estatal de Desarrollo 2008-2013** se menciona que "La actividad

agrícola en los valles de Mexicali, Guadalupe, Maneadero y San Quintín ha traído consecuencias negativas a la salud pública por la dispersión de partículas al aplicar de forma aérea y local compuestos agroquímicos en los cultivos, sin existir reglamentación alguna para su aplicación”. Dentro de los pesticidas, fungicidas y herbicidas de mayor uso en la región, según el **INIFAP (2007)**, se encuentran Diazinón, Lannate y Paraquat.

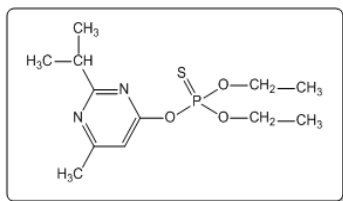


Fig. 1 Diazinón

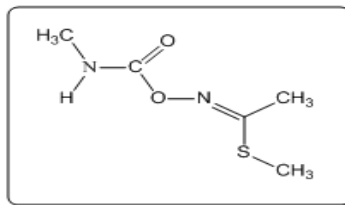


Fig. 2 Lannate

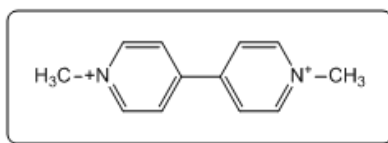


Fig. 3 Paraquat

Tabla I. Lista de productos aplicados para el control de plagas y enfermedades en orden de frecuencia de aplicación.

1. Diazinón	12. Ambush	23. Diazinón 25
2. Lannate	13. Bravo 720	24. Goal
3. Azúfre	14. Dimetoato	25. Goal 2-Ec
4. Fli	15. Lannate 90	26. Maneb
5. Manzate	16. Malatión 1000 E	27. Metomil
6. Cupravit	17. Maneb 80	28. Sevin 80
7. Lannate 90	18. Robrán	29. Azinfos metílico
8. Paraquat	19. Talstar	30. Dacthal
9. Promilo	20. Tamarón	31. Gramoxone
10. Thiodan	21. Bensulide	32. Prefar
11. Vydate	22. Cabrio	

Elaborado con datos reportados por el INIFAP (2007) para la zona agrícola de Baja California.

Problemas fitosanitarios en cultivos agrícolas

Actualmente en Baja California, existen diversas plagas que están creando graves problemas en los cultivos, principalmente en *la vid*, fresa, frambuesa y olivo.



Fig. 4 Daños por plagas en cultivos frutícolas

Los causantes de estos daños son hongos e insectos que en la actualidad han adquirido un poder de resistencia ante muchos de los plaguicidas comercialmente usados, siendo esto uno de los mayores problemas generados, ya que el producto químico utilizado deja de ser útil para atacar la plaga, y sumado a esto, día con día ingresan al mercado nuevos plaguicidas más potentes e inespecíficos, que cumplen con el objetivo de erradicar las plagas o disminuirlas, pero también crean un mayor daño a los suelos y seres vivos importantes para el medio.

Referente a las cepas de hongos existentes con un alto grado de patogenicidad, y que son de los principales causantes de daños agrícolas en la región y parte del resto del país se encuentran *Lasiodiplodia theobromae*, *Macrophomina phaseolina*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*; en cuanto a *L. theobromae* se tiene reporte de que en México ha sido el causante de distintas enfermedades en varios cultivos principalmente frutícolas (**Tabla II**).

Tabla II. Reportes en México de *L. theobromae* afectando distintos cultivos frutícolas y maderables

Hospedero	Enfermedad	Núm. Acceso NCBI	Referencia
<i>Anacardium occidentale</i> (Nuez de la India)	Necrosis de frutos	NR	Canales., 2007
<i>Anona spp.</i> (Guanábana)	Muerte descendente de ramas	NR	Hernández <i>et al.</i> , 2013
<i>Carya illinoensis</i> (Nuez pacana)	Pudrición del fruto	NR	Alvidrez-Villareal <i>et al.</i> 2012
<i>Citrus aurantium</i> L. (Naranja amargo)	Muerte de plantas	NR	Varela <i>et al.</i> , 2013
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Jamaica)	Manchado de cáliz	NR	Martínez., 2010
<i>Mangifera indica</i> (Mango)	Cáncer de troncos y ramas	NR	Canales., 1998
	Muerte descendente	NR	Becerra, 1995
		NR	Mosqueda <i>et al.</i> , 1996
	Pudrición del pedúnculo	JQ619648	Tucuch <i>et al.</i> , 2005
		JC619649	Sandoval-Sánchez <i>et al.</i> , 2013
		JC619650	
		JC619651	
<i>Nephelium lappaceum</i> L. (Rambután)	Pudrición de frutos	FJ478102.1	Hernández., 2010
<i>Persea americana</i> (Aguacate)	Pudrición del pedúnculo	NR	Ochoa-Ascencio <i>et al.</i> , 2007
<i>Pinus sp.</i> (Pino)	Cáncer de tallo	AY236952	Slipper <i>et al.</i> , 2004
<i>Theobroma cacao</i> (Cacao)	Pudrición de la mazorca	NR	Álvarez., 1976
<i>Vitis vinifera</i> (Uva)	Muerte descendente	EU012363	Úrbez-Torres <i>et al.</i> , 2008

NR= No Reportado

NCBI: National Center for Biotechnology Information

Se sabe que en la región de Baja California este tipo de hongos actualmente están generando grandes problemas para las industrias agrícolas, provocando importantes derrames económicos por el uso de plaguicidas cada vez más costosos y sobre todo por las pérdidas de los productos cultivados.

No sólo los hongos son responsables de los problemas agrícolas actuales, comparten esta responsabilidad con diferentes especies de insectos, que al igual que estos organismos han creado una resistencia ante muchos de los plaguicidas ya existentes; ejemplos de ello son *Bemisia tabaci* (mosca blanca), los áfidos o pulgones y *Tetranychus urticae*, un ácaro altamente fitopatógeno mejor conocido como "Araña roja". Este insecto es caracterizado como polífago, ya que es capaz de invadir y afectar diversas especies de plantas que si no se tratan a tiempo es capaz de llevar el tejido vegetal a la muerte.



Fig. 5 Principales plagas de cultivos agrícolas en B.C (*T. urticae*, *B. tabaci* y Áfido)

El uso intensivo e indiscriminado de agroquímicos ha provocado daños considerables al medio ambiente y fundamentalmente a los organismos que habitan los suelos,

disminuyendo en forma considerable su fertilidad. Existen diversos efectos negativos que genera el uso de estas sustancias, pero dentro de los principales se encuentran:

- ❖ Residuos contaminantes en el medio ambiente
- ❖ Residuos sobre productos de consumo doméstico, con efecto sobre las generaciones futuras.
- ❖ Resistencia de las plagas y patógenos, manifestándose en la ineffectividad de los productos químicos.
- ❖ Eliminación de los enemigos naturales (biorreguladores) de las plagas de insectos y ácaros.
- ❖ Surgimiento de plagas nuevas
- ❖ Eliminación de prácticas usadas tradicionalmente y dependencia a los químicos.
- ❖ Contaminación de ríos y aguas subterráneas y sus consecuencias negativas en la fauna piscícola, avícola y en la salud humana.
- ❖ Erosión de suelos que tiende a la desertificación.

Una de las alternativas que se sugieren y se encuentran en estudio es el uso de aceites esenciales como plaguicidas naturales,, que de acuerdo a la literatura se sabe que estos cuentan con compuestos capaces de inhibir el desarrollo y/o reproducción de insectos, así como el retardar el crecimiento de hongos, modificando su metabolismo y por ende su reproducción.

Existen estudios reportados que donde atribuyen este tipo de actividad biológica específicamente a moléculas en cuya estructura química se encuentran ésteres de dos ácidos carboxílicos, ácido crisantémico y ácido piretroico, y alguna de tres ciclopentenolonas específicas (piretrolona, jasmolona y cinerolona), estas moléculas se identificaron como **Piretrinas**.

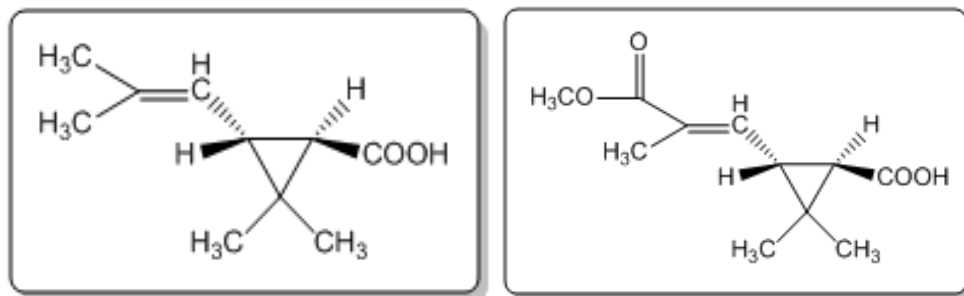


Fig. 6 Ácido crisantémico y piretroico

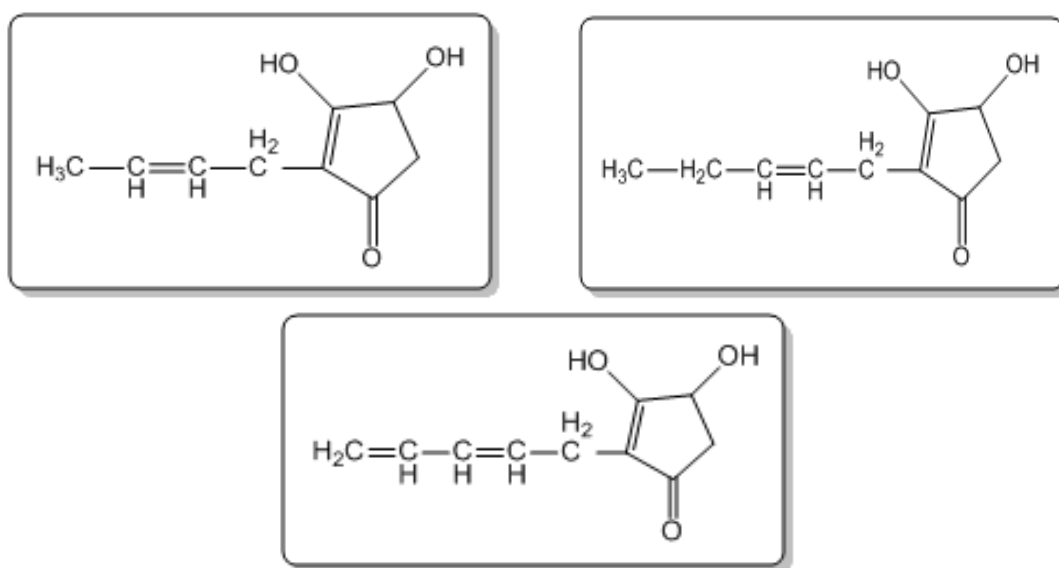


Fig. 7 Cinerolona, Piretrolona y Jasmolona

Este tipo de moléculas forman parte de la composición química de especies del género *Chrysanthemum sp.*, ya que han sido aisladas e identificadas en ellos.

Se sabe, por referencia, que el aceite esencial de *Chrysanthemum Coronarium* exhibe una actividad tóxica volátil y que además logra inhibir la reproducción de los insectos. (Álvarez-Castellanos., 2001) Actualmente hay reportados diversos estudios en donde se ha evaluado su actividad biológica como insecticida, larvicida, contra nematodos y hongos fitopatógenos, obteniendo resultados favorables que lo postulan como una opción para ser utilizado como plaguicida. Se sabe también que la composición química del aceite esencial

varía según la ubicación de la planta, la temperatura, y el ambiente en general en el que se encuentre, haciendo variar su genotipo y fenotipo. (**Tada, *et al.*, 1984. Basta, *et al.*, 2007**)



HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El aceite esencial de la planta *Chrysanthemum coronarium*., contiene compuestos capaces de generar efectos tóxicos frente a agentes patógenos y plagas que afectan significativamente cultivos agrícolas de Baja California.

Se plantea que el aceite esencial de las flores de *Chrysanthemum coronarium* tiene propiedades biológicas de tipo acaricida y antifúngica.



Fig. 8 Inflorescencias de *Chrysanthemum coronarium*



OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES

Objetivo general

Caracterizar la composición química del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* y evaluar su perfil biológico de tipo acaricida, antifúngico y antioxidante.

Objetivos particulares

- ❖ Realizar la autenticación de la especie *Chrysanthemum coronarium* bajo el respaldo de un taxónomo.
- ❖ Llevar a cabo la extracción del aceite esencial de las flores de *C. coronarium* utilizando el método de destilación por arrastre de vapor.
- ❖ Determinar la composición química del aceite esencial utilizando la técnica instrumental de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).
- ❖ Evaluar la capacidad acaricida del aceite esencial frente a la especie *Tetranychus urticae*, plaga que afecta cultivos agrícolas de la región de Baja California, mediante la técnica "Inmersión de círculos de hoja"; con algunas modificaciones (Cahill, 1996)
- ❖ Evaluar el potencial antifúngico del aceite esencial, frente a cepas de hongos fitopatógenos aislados de cultivos agrícolas de *Vitis vinífera* (uva), *Fragaria vesca* (fresa), *Rubus idaeus* (frambuesa) y *Olea europea* (olivo).
- ❖ Determinar la actividad antioxidante del aceite esencial obtenido de las flores de *Chrysanthemum coronarium*, mediante los métodos:
 - ❖ Decoloración oxidativa de β -Caroteno
 - ❖ Reducción del radical libre DPPH (Difenil Picril Hidrazilo)
 - ❖ Reducción del catión-radical ABTS (2-2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))



CAPÍTULO I

Chrysanthemum coronarium:
Evaluación química del aceite esencial



1.1 GENERALIDADES

1.1.1 *Chrysanthemum sp*

El género ***Chrysanthemum sp.***, pertenece a la familia Asteraceae y engloba flores cultivadas desde la antigüedad. Las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de color variable entre el verde claro y oscuro, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas. Lo que se conoce como flor es realmente una inflorescencia en capítulo. Existen diversos tipos de capítulo cultivados comercialmente, aunque, en general, esta inflorescencia está formada por dos tipos de flores: femeninas (radiales; se corresponden con la hilera exterior en las margaritas) y hermafroditas (concéntricas; se corresponden con las centrales).

El receptáculo es plano o convexo y está rodeado de una envoltura de brácteas.

Según su forma las inflorescencias se pueden clasificar en:

- ❖ Sencillas: tipo margarita. Compuestas de una o dos hileras de flores radiales y con flores hermafroditas centrales.
- ❖ Anémonas: similares a las sencillas, pero con flores concéntricas tubulares y

alargadas. El color de las flores radiales y concéntricas puede ser el mismo o no.

- ❖ Recurvadas: en forma globular, con las flores radiales recurvadas hacia dentro.
- ❖ Reflejas: en forma redondeada con las flores radiales doblándose hacia afuera y hacia abajo.
- ❖ Pompones: en forma globular, constituidos por flores radiales cortas y uniformes. No presenta flores concéntricas.
- ❖ Decorativas: similares a los pompones, ya que se componen principalmente de flores radiales, aunque las hileras exteriores son más largas que las centrales, dándole a la inflorescencia una forma plana e irregular.



Fig. 9 Diferentes tipos de flores de *Chrysanthemum* spp.

En China el Crisantemo es empleado como ornamental desde hace más de 2000 mil años; su cultivo se trasladó a Japón donde se convirtió en una flor santa que recibía una veneración divina. Todavía es utilizado en ceremonias y la flor es el símbolo de una vida larga. Contrariamente a lo que piensa mucha gente, la esfera en la bandera japonesa no representa el sol naciente sino el corazón de un crisantemo despojado de sus pétalos.

Esta especie fue introducida en Europa a través de Francia en el último tercio del siglo XVIII. Los primeros cultivos en España coinciden con el inicio en el siglo XIX.

El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo y la mayoría de las especies de donde se han generado los cultivos actuales son originarias de China: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium* y *Chrysanthemum xhortorum*.



Fig. 10 *Chrysanthemum indicum*; *C. morifolium*; *C. xhortorum*

1.1.2 *Chrysanthemum coronarium*

C. coronarium es una especie también conocida como *Glebionis coronaria*, *Matricaria coronaria* y *Pyrethrum breviradiatum*, en español es también llamada flor de oro y filipéndula. En inglés se le nombra *Garland chrysanthemum*. Ésta especie representa un ejemplo muy interesante de una planta de usos múltiples, que se cultiva ampliamente como un vegetal en China y Japón (Follett, 1990).

La especie de *Chrysanthemum coronarium* L. es una maleza común en los cereales de invierno y en las zonas no cultivadas a lo largo de toda la cuenca mediterránea. Por lo general, se pasta por los animales (D'Urso et al., 1993) y puede ser cultivado, en combinación con cultivos forrajeros tradicionales, para producir altas cantidades de materia seca para la alimentación de animales de granja (Sulas y Caredda, 1997).



Fig. 11 *Chrysanthemum coronarium*

1.1.3 Origen y distribución de *Chrysanthemum coronarium*

C. coronarium es una planta nativa de la región Mediterránea y el oeste de Asia, que se encuentra ampliamente naturalizada en otras regiones como son Estados Unidos y Perú. Su distribución en México está registrada en Baja California norte, Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Tabasco y Veracruz (Villaseñor y Espinoza, 1998), en nuestro país es utilizada principalmente como ornamental.



Fig. 12 Distribución geográfica en México de *C. coronarium*



Fig. 13 *C. coronarium* en orilla de caminos

Ésta es una especie que crece en campos cultivados y abandonados a orilla de caminos y canales, territorios que también son conocidos como "zonas de disturbio", siendo ésta el área definida alrededor de una casa, una carretera o urbanización en la cual el valor del hábitat para plantas y vida silvestre es reducido significativamente por la actividad humana y las estructuras, sin embargo, *C. coronarium* posee alguna propiedad que le permite crecer y desarrollarse principalmente en este tipo de zonas.

1.1.4 Descripción botánica de *Chrysanthemum coronarium*

Se trata de una hierba anual, que florece sólo en el periodo de mayo a julio. Es una planta robusta, que puede llegar hasta los 80 cm de alto, el tallo es ramificado, estriado, glabro o algo pubescente. Posee hojas alternas, de 3 a 6 cm de largo, con un contorno general oblongo a obovado, sésiles y ligeramente abrazando al tallo, sus laminas más o menos profundamente dos veces dividida (bipinnatisectas) resultando segmentos agudos de 1 a 2 mm de ancho. Tiene una inflorescencia compuesta de cabezuelas solitarias en el extremo de las ramas, sobre pedúnculos hasta de 18 cm de largo. La cabezuela está compuesta de treinta brácteas dispuestas en tres series, las más largas de 8 a 10 mm de longitud, firmes en el centro y con los márgenes secos, traslúcidos y más anchos hacia el ápice. Se presentan flores de dos tipos: 10 a 20 (o más en algunas flores cultivadas). Flores liguladas femeninas, ubicadas en la periferia de la cabezuela, corola de color amarillo, a veces blancas en el ápice y de hasta 15 mm de largo; 100 a 300 flores del disco, hermafroditas (con ambos sexos) ubicadas en la parte central; corola dividida en cinco lóbulos agudos de color amarillo y aproximadamente 5 mm de largo.



Fig. 14. Morfología de *C. coronarium*

En cuanto al fruto éste es seco y no se abre (indehiscente), contiene una sola semilla a la que se le conoce como aquenio, el de las flores liguladas es en forma de pirámide pero invertida (obpiramidal), truncado en al ápice y atenuado en la base, de aproximadamente 3 mm de largo, con tres lados como alas anchas, mientras que el de las flores del disco es lateralmente comprimido, de aproximadamente 2.5 mm de largo, con varias costillas y un ala angosta, todos los aquenios están cubiertos de glándulas sésiles, a veces en el ápice del fruto se presenta una estructura coroniforme llamada vilano. La raíz de esta especie es fibrosa.



Fig. 15 Fruto de *C. coronarium*

1.1.5 Clasificación taxonómica de *Chrysanthemum coronarium*

La clasificación taxonómica de esta especie se describe de la siguiente forma: *C. coronarium* pertenece al reino Plantae; Subreino: Tracheobionta, el cual engloba a un grupo de plantas que poseen raíz, tallo y hojas, las cuales presentan un sistema vascular para la distribución del agua y los nutrientes formado por el xilema, el cual se encarga de transportar H₂O y minerales de las raíces hacia los tallos y hojas, y el floema que lleva productos de la fotosíntesis desde donde se producen hasta el punto en donde sean requeridos para su uso o almacenamiento. *C. coronarium* es parte de la superdivisión Spermatophyta (plantas con semillas); División: Magnoliophyta (plantas con flores); Clase: Magnolipsida, esta clase incluye a todas las plantas con flores, son plantas vasculares generalmente con raíz, tallo y hojas, el cilindro central del tallo con haces vasculares dispersos (atactosela) con traza foliar (eustela), el xilema formado por vasos al menos en raíces, floema con tubos cribosos y células acompañantes. Presentan estructuras sexuales agregadas y asociadas con hojas especializadas para formar flores.



Fig. 16 Flor de *C. coronarium*

En la forma más típica, la flor consta de un verticilo externo de miembros del perianto, los sépalos (cuyo conjunto forma el cáliz) y el verticilo interno, los pétalos (conformando la corona), *C. coronarium* se encuentra en este grupo clasificándose como dicotiledónea, es decir, que posee dos cotiledones tratándose éstos de las primeras hojas que se desarrollan en las plantas. Los cotiledones se encuentran esbozados en los embriones localizados en la semilla que dará lugar a la planta.; Subclase: asteridae, esta es

numéricamente la segunda subclase de las dicotiledóneas, las flores son gamopétalas y raramente apétalas o polipétalas. Los estambres son pocos y alternos con los pétalos. Generalmente tienen dos carpelos con óvulos unitegumentados y endosperma tenuinucelado.; Orden: asterales, en orden engloba especies que tiene porte de hierbas, árboles, arbustos, trepadoras, ocasionalmente acuáticas o epífitas, pueden presentar compuestos secundarios tales como látex y terpenoides. Las flores generalmente son perfectas, solitarias o en inflorescencias cimosas, a veces en forma de racimos o espigas.



Fig. 16 Inflorescencias de *C. coronarium*

1.1.6 Estudios previos sobre la composición química del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium*

De esta especie se han aislado compuestos naturales con actividad insecticida, tales como un poliacetileno con actividad como antihormona juvenil (**Bowers et al, 1987**) y otras sustancias inhibidoras de la alimentación de insectos. Además, esta especie es olorosa y como es propio de la familia de las compuestas, debe ser capaz de sintetizar aceites esenciales, tanto en las flores como en las hojas. Los aceites esenciales están constituidos en gran parte por monoterpenos, los cuales se ha reportado que presentan actividad tóxica volátil e inhibición de la reproducción de insectos.

En países como Italia, España, Chile, Grecia y Corea del Sur se han realizado diversas investigaciones acerca de este aceite esencial, llevando a cabo principalmente la determinación de su composición química, y relación con diversas actividades biológicas tales como: insecticida, larvicida, contra nemátodos y hongos fitopatógenos (**Álvarez-Castellanos et al., 2001**).

El aceite esencial de esta especie de planta presenta olor muy fuerte y desagradable, además de que una de sus características principales es su color, azul oscuro; de acuerdo a la literatura ha llegado a obtenerse en muy bajos rendimientos, los cuales oscilan entre 0.1 a 0.16 %.

Ciertos estudios fitoquímicos sobre algunos miembros del género *Chrysanthemum sp.*, han revelado la presencia de varios principios odoríferos (acetato de cis-crisantenilo, acetato de trans-crisantenilo, α -pineno, etc.) y componentes fenólicos derivados principalmente de ácido quínico (**Chuda et al., 1996**).

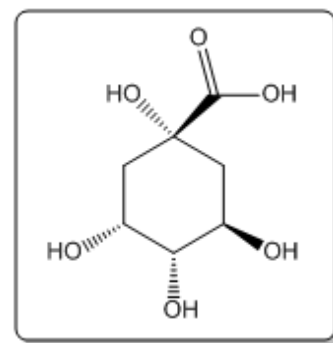


Fig. 17 Ácido quínico

Análisis previos del aceite esencial de *C. coronarium* han indicado diferentes patrones de composición, atribuyéndole esto al origen y el genotipo, tal como se puede apreciar en diferentes estudios reportados.

Por mencionar algunos ejemplos, **Álvarez-Castellanos, et al.**, en el año **2001** reportó 15 compuestos identificados en el aceite esencial de *C. coronarium* originario de España. De estos 15 componente, resaltaron como mayoritarios, alcanfor (29.2%), α y β -pineno (14.8 y 9.5% respectivamente), acetato de liralilo (9-8%); así como cantidades significativas de canfeno (5.2%), 2, 7, 7-trimetilbiciclo- [3.1.1] hept-2-en-6-ol de etilo (3.8%), p-mentatrieno (3.4%), D-germacreno (2.7%) y α -felandreno (2.6%). Camazuleno, que es la molécula a la que se confiere el color azul característico del aceite, estaba presente en un 0.5%. (**Álvarez-Castellanos, et al., 2001**).

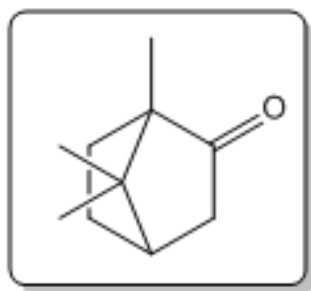


Fig. 18 Alcanfor

Tabla III. Composición química del aceite esencial de las flores de *Chrysanthemum coronarium* de origen español

Componente	Porcentaje (%)
α -Pineno	14.8
Canfeno	5.2
α -Felandreno	2.6
β -Pineno	9.5
4-Metilenciclohexeno	Trazas
Limoneno	0.7
β -Ocimeno	0.3
Alcanfor	29.2
Acetato del 2,7,7-Trimetilbiciclo- [3.1.1]	3.8
hept-2-en-6-ol	0.9
Acetato de bornilo	9.8
Acetato de liratilo	1.1
β -Cariofileno	2.7
Germacreno D	3.4
p -Menta-1,3,8-trieno	0.5
Camazuleno	84.5
Total	

Álvarez-Castellanos, et al., (2001) mencionaron que esta era la primera caracterización que se hacía sobre el aceite esencial de las flores de *C. coronarium*. Sin embargo, alguno de los compuestos se había identificado previamente a partir de la esencia de las hojas de *C. coronarium* L. var. *spatiosum*, aunque solo α - y β -pineno y canfeno se encontraron en ambos casos. (Kameoka et al., 1975)

En Lascari y Palinuro, Italia, también estudiaron el aceite esencial de las flores de *C. coronarium*, encontrando la presencia de (2E)-2-hexa-2,4-diniliden-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-eno (trans-tonghaosu) (12.4 a 17.8%), acetato de cis-crisantenilo (5.4 a 14.5%), acetato de trans-crisantenilo (5.5 a 6.7%) y alcanfor (5.8 a 7.5%) como los componentes principales (Senatore et al., 2004).

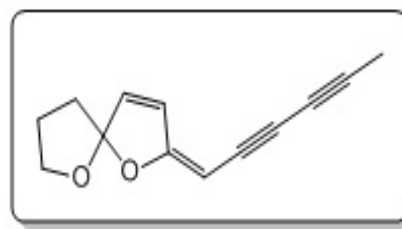


Fig. 19 Trans-Tonghaosu

Dos años más tarde, **Sebastián et al. (2006)** informaron que el alcanfor (38.5%), acetato de cis-crisantenilo (12.5%), acetato de bornilo (10.7%) y p-menta-8-en-2-ol-etilo (9.5%) fueron los principales constituyentes del aceite esencial de *C. coronarium* de origen chileno.

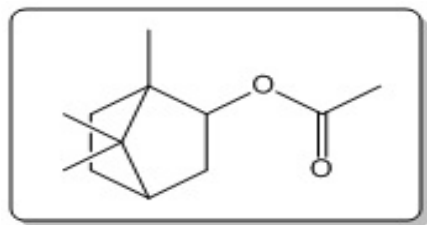


Fig. 20 Acetato de Bornilo

En el caso del aceite volátil de *C. coronarium* de origen griego se encontró que este se encontraba dominado por acetato de trans-crisantenilo (7.8 a 13.2%), acetato de cis-crisantenilo (9.1 a 9.9%), alcanfor (9.1 a 15.7%), óxido de β -pineno (7.07 a 8.08%), isovalerato de trans-crisantenilo (5.8 a 10.2%) y mirceno (6.2-7%) (**Basta et al., 2007**)

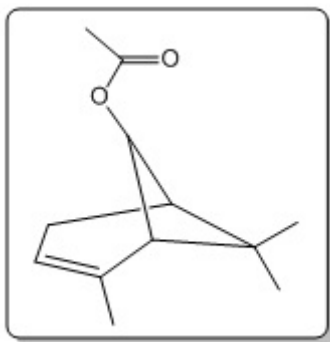


Fig. 21 Acetato de Trans-Crisantenilo

A partir de las flores de *C. coronarium* recolectadas en Mograne Zaghouan, Túnez, se extrajo un aceite esencial con un rendimiento de 0.31% (en peso seco) color azul oscuro debido a la presencia de la molécula ya conocida como camazuleno, el cual se puede obtener durante la destilación por arrastre de vapor. Otros miembros de la familia Asteraceae, tales como *Chamomilla* sp., *Stevia*, *Artemisia* sp., y *Achillea* sp., también

generan compuestos con esta característica (Kaneko, *et al.*, 1971, Sacco *et al.*, 1983, Acosta *et al.*, 1989, Romanos *et al.*, 1990 y Abad *et al.*, 1995).

El análisis cualitativo y cuantitativo del aceite esencial de la región de Túnez, por GC y GC-MS permitió la identificación de cuarenta componentes, lo que representa 96,58% de la composición química total. Tal como se anota en la **Tabla IV**, los componentes más abundantes son acetato de cis-crisantenilo (21,82%), acetato de trans-crisantenilo (12,78%), (E) - β -farneseno (8,97%), D-germacreno (8,92%) y alcanfor (6,03%). Este patrón de composición es bastante inusual entre los aceites esenciales de las flores de *Chrysanthemum* sp., como se informa en la **Tabla V**.

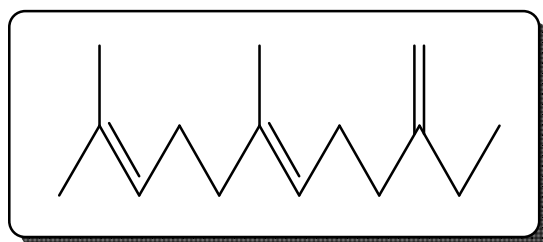


Fig. 22 (E) β -Farneseno

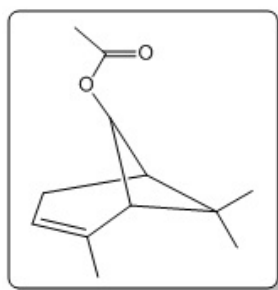


Fig. 23 Acetato de Crisantenilo

En este punto, puede presumirse que la calidad y composición química del aceite esencial de *Chrysanthemum* sp., dependerá sustancialmente de la especie, parte de la planta de donde se obtenga el aceite, origen geográfico, el medio ambiente, extracción y procedimientos analíticos.

Tabla IV. Composición química del aceite esencial de las flores de *C. coronarium* originario de Túnez. (Tomado de: **Hosni, et al., 2012**)

Compuestos	IR ^a	IR ^b	%	Identificación
Santolina trieno	908		2.73	RI. SRA
α -Pino	939	1032	0.35	RI. SRA. Co-GC
Canfeno	953	1076	1.09	RI. SRA
O -Cimeno	976		0.58	RI. SRA
β -Pino	978	1118	0.72	RI. SRA. Co-GC
Mirceno	992	1174	1.77	RI. SRA. Co-GC
(3E)-2,5,5-trimetilhepta-3,6-dien-2-ol (Alcohol Yomogi)	996		0.19	RI. SRA
Octanal	1002	1296	0.3	RI. SRA. Co-GC
p -Cimeno	1026	1280	3.53	RI. SRA
Limoneno	1031	1203	0.28	RI. SRA. Co-GC
γ -Terpineno	1059	1255	0.16	RI. SRA. Co-GC
Linalol	1101	1553	0.25	RI. SRA. Co-GC
trans -Verbenol	1140	1683	1.58	RI. SRA
cis -Verbenol	1142		0.19	RI. SRA
Alcanfor	1145	1532	6.03	RI. SRA. Co-GC
Cis-crisantenol	1161		0.25	RI. SRA
Lavandulol	1169		0.29	RI. SRA
Acetato de trans crisantenil	1236		12.78	RI. SRA
Acetato de cis-crisantenil	1263		21.82	RI. SRA
Acetato de isobornilo	1304	1584	2.76	RI. SRA
Hexanoato de hexilo	1379		0.45	RI. SRA
α -Cedreno	1409		4.07	RI. SRA
β -Cariofileno	1420	1612	0.2	RI. SRA. Co-GC
Isovalerato de crisantenil	1452		0.15	RI. SRA
(E) - β -Farneseno	1453	1695	8.97	RI. SRA
Allo-Aromadendreno	1458	1661	0.86	RI. SRA
Germacreno-D	1480	1726	8.92	RI. SRA. Co-GC
α -Farneseno	1486	1758	1.68	RI. SRA
3,5,5,9-tetrametil-1,2,4a,6,7,8-hexahidrobenc[7]anuleno (β -Himachaleno)	1495	1740	0.87	RI. SRA
Biciclogermacreno	1495	1755	0.6	RI. SRA
β -Bisaboleno	1499	1718	0.24	RI. SRA
β -Sesquifelandreno	1523	1783	2.41	RI. SRA

δ -Cadineno	1525	1773	1.51	RI. SRA
α -Calacoreno	1534	1941	2.48	RI. SRA
Espatulenol	1576	2153	0.48	RI. SRA. Co-GC
Cadaleno	1678	2256	0.35	RI. SRA
α -Bisabolol	1686	2232	0.39	RI. SRA
Camazuleno	1733		2.84	RI. SRA
Heneicosano	2100	2100	0.86	RI. SRA. Co-GC
Docosano	2200	2200	0.6	RI. SRA. Co-GC
Monoterpenos hidrocarbonados			13.97	
Monoterpenos oxigenados			43.38	
Sesquiterpenos hidrocarbonados			36.0	
Sesquiterpenos oxigenados			0.87	
Otros			2.36	
Total			96.58	

^a IR: índices de retención en la columna apolar (HP-5MS).

^b IRE: índices de retención en la columna polar (HP INNOWax); MS: coincidente espectros de masas; Co-GC: Co-inyección con compuestos de referencia puros.

Tabla V. Origen, parte de la planta y los componentes principales (%), de los aceites esenciales de diferentes especies de *Chrysanthemum* sp., estudiadas anteriormente.

Especies	País	Órgano	Componentes principales (%)	Referencia
<i>C. coronarium</i>	España	Flores	Alcanfor (29.2), α -pineno (14,8), β -pineno (9,5) y acetato de liralilo (9,8)	Álvarez-Castellanos et al. (2001)
	Chile	Flores	Alcanfor (25,1-38,5), acetato de cis-crisantenilo (12,5-25,9), acetato de bornilo (10,7-13,8) y p-Menta-8-en-2-ol-etilo (07/05 a 09/05).	Sebastián et al. (2006)
	Corea Del Sur	Las hojas y tallos	Mirceno (31,9), α -bisabolol (16.5), (E, E) - α -farneseno (11) y (E) - β -farneseno (8.4).	Zheng et al. (2004)
	Italia	Flores	(2E)-2-hexa-2,4-diniliden-1,6-dioxaspiro [4.4] non-3-eno (12,4-17,8%), acetato de cis-crisantenilo (5,4 a 14,5%), acetato de trans-crisantenilo (5.5 a 6.7%) y alcanfor (5.8 a 7.5%).	Senatore et al. (2004)
	Grecia	Flores	Acetato de trans-crisantenilo (7,8 a 13,2%), acetato de cis-crisantenilo (9.1 a 9.9%), alcanfor (9,1 a 15,7%) e isovalerato de trans-crisantenilo (05.08 a 10.02%).	Basta et al. (2007)
<i>C. fuscatum</i>	Túnez	Hojas y flores	Limoneno (20,6-12,9), mirceno (7.1 a 2.2), β -cariofileno (4.2 a 3.5) y germacreno D (10.04 a 02.09)	Haouas et al. (2012)
<i>C. grandiflorum</i>	Túnez	Hojas y flores	α -Humuleno (18.4-tr), β -cariofileno (17,1 a 1,4), óxido de cariofileno (14,5 a 6,8) y tetracosano (0-7,5)	Haouas et al. (2012)
<i>C. trifurcatum</i>	Túnez	Flores	Limoneno (20,89), γ -terpineno (19,13), 1,8-cineol (10.64) y β -pineno (8,77)	Ben Sassi et al. (2008)

NM: No mencionado; tr: trazas

Además de los estudios mencionados anteriormente, existe el registro de una investigación realizada en Pisa, Italia, en donde se hace una comparación en la caracterización del aceite esencial de las flores y el aceite esencial de las hojas de *Chrysanthemum coronarium* (**Tabla VI**) originaria de este lugar. En dicho estudio se identificaron como metabolitos mayoritarios alcanfor (22.1%), acetato de cis-crisantenilo (19.9%), santolina trieno (9.3%), D-germacreno (8.5%), β -farneseno, mirceno (5.0%) y acetato de trans-crisantenilo en el aceite esencial de la flor; (Z)-ocimeno (45.4%), mirceno (28.2%), (E)-ocimeno (8.9%), limoneno (2.4%) y germacreno (2.1%) como mayoritarios en el aceite esencial de la hoja de *Chrysanthemum coronarium*.

En este estudio se encontraron 34 compuestos en el aceite esencial de la flor y 28 en el aceite esencial de las hojas, mostrando diferencias principalmente cuantitativas entre un aceite y otro. Mencionan algunos compuestos que no habían sido reportados en la literatura anteriormente y ellos los describen como tentativamente identificados, tales como (3E)-2,5,5-trimetilhepta-3,6-dien-2-ol (alcohol Yomogi), artemisia alcohol, biciclogermacreno y β -sesquifelandreno. (Flamini et al. 2003)

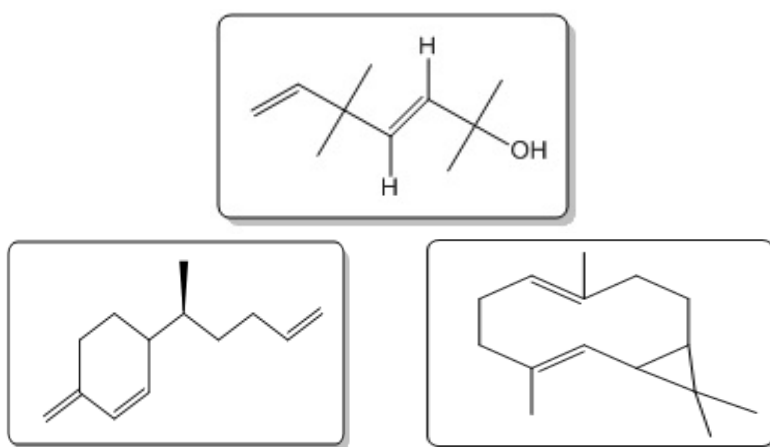


Fig. 24 Compuestos identificados en el aceite esencial de *C. coronarium* originario de Italia

Tabla VI. Composición del aceite esencial de hoja y flor de *C. coronarium* originario de Italia. (Tomado de: **Flamini et al. 2003**)

Constituyente	Flor	Hoja
3-Hexen-1-ol	tr	...
(E)- Hexenal	0.3 (0.04)	tr
Santolina trieno	9.3 (0.23)	0.2 (0.02)
Triciclono	tr	tr
α -Pineno	1.4 (0.35)	1.4 (0.29)
Camfeno	3.4 (0.32)	1.3 (0.23)
Sabineno	tr	0.1 (0.09)
β -Pineno	1.9 (0.25)	0.6 (0.22)
Mirceno	5.0 (0.44)	28.2 (1.58)
Alcohol Yomogi ^e	0.3 (0.13)	...
α -Felandreno	tr	0.4 (0.07)
p-Cimeno	...	tr
Limoneno	0.6 (0.25)	2.4 (0.36)
(Z)-Ocimeno	0.9 (1.62)	45.4 (1.58)
(E)- Ocimeno	0.8 (0.20)	8.9 (0.55)
Alcohol artemisia ^e	tr	...
Terpinoleno	...	0.1 (0.07)
Linalool	tr	tr
Allo-ocimene	...	0.2 (0.11)
Alcanfor	22.1 (1.27)	1.3 (0.26)
Borneol	tr	tr
4-Terpineol	tr	...
Acetato de mirtenilo	0.4 (0.04)	...
Acetato de trans-crisantenilo	4.3 (0.36)	0.3 (0.05)
Isovalerato de cis-3-hexenilo	tr	...
Isovalerato de hexilo	0.3 (0.03)	...
Acetato de cis-crisantenilo	19.9 (1.19)	1.0 (0.26)
Isovalerato de isobornilo	1.3 (0.26)	1.8 (0.24)
α -Copaeno	tr	...
β -Cariofileno	0.8 (0.17)	0.4 (0.17)
(E)- β -Farneseno	6.4 (0.46)	0.6 (0.02)
D-Germacreno	8.5 (0.48)	2.1 (0.41)
(Z,E)- α -Farneseno	2.1 (0.52)	0.1 (0.07)
Biciclogermacreno ^e	1.0 (0.28)	0.3 (0.03)
(E,E)- α -Farneseno	0.6 (0.26)	1.7 (0.24)
β -Sesquifelandreno ^e	1.1 (0.09)	0.8 (0.21)
α -Bisabolol	0.8 (0.14)	...
Total identificado	93.5	99.6

tr < 0.1%. ^e Identificación tentativa

El consenso general surgido a partir de estos datos es que la composición química del aceite esencial y el perfil fenólico de *C. coronarium* son particularmente propensos a los cambios cuantitativos y cualitativos debido al genotipo, origen geográfico y los factores ambientales (**Flamini et al., 2003**).



1.2 METODOLOGÍA

1.2.1 Recolección del Material Vegetal

La parte aérea de *Chrysanthemum coronarium* fue recolectada durante su periodo de floración, el día 12 de Junio de 2015, durante la mañana, en el cerro "El Vigía" Zona Playitas, Ensenada, Baja California., con una temperatura ambiente promedio de 30°C. Para la realización de este proyecto fue recolectada la parte aérea de esta especie, que fue autenticada por el Dr. José Delgadillo Rodríguez.

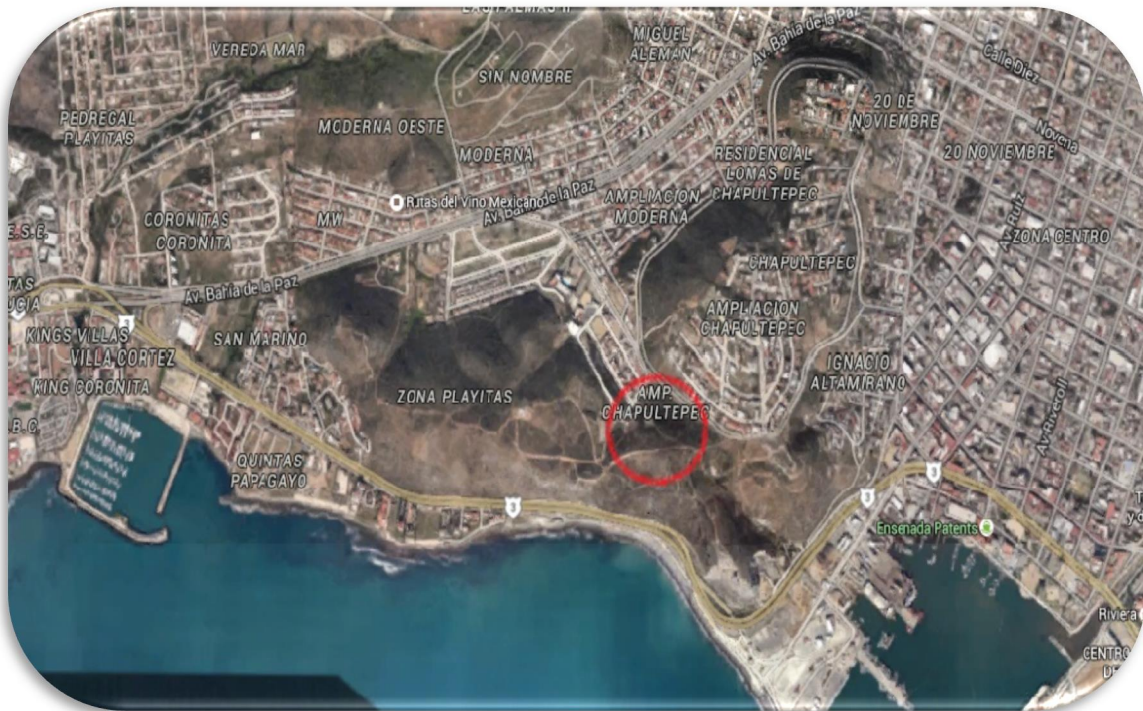


Fig. 25 Localización de cerro "El vigía" en Zona playitas, Ensenada, B.C.

Coord. 31.864319,-116.640320

1.2.2 Tratamiento del Material Vegetal

Una vez que se realizó la recolecta, la planta fue transportada en bolsas de papel para evitar la retención de humedad. Fueron separadas las flores del resto de la parte aérea y puestas sobre papel para su secado, esto se llevó a cabo a temperatura ambiente durante dos a tres días.



Fig. 26 Flores de *Chrysanthemum coronarium* secándose

1.2.3 Extracción del aceite esencial

La obtención del aceite esencial se hizo mediante la técnica de hidrodestilación por arrastre de vapor, para lo cual se adaptó un sistema Clevenger modificado.

El peso total del material vegetal ya seco se dividió para llevar a cabo la extracción del aceite. Para el proceso de hidrodestilación en un matraz bola de 5 litros se colocaron 100g de la flor seca con 2 litros de agua destilada. El matraz fue puesto en baño maría utilizando glicerina como medio de calentamiento y cubriendo con papel aluminio para mantener el calor.



Fig. 27 Sistema Clevenger modificado., extracción de aceite esencial de *C. coronarium*

La hidrodestilación se llevó a cabo durante 5 horas continuas, tiempo durante el cual se colectó en un embudo de separación el agua aromática que se obtuvo del proceso. Por otro lado el aceite que por densidad se mantenía en la fase superior se dejó acumulando ahí mismo en el embudo hasta finalizar las 5 horas establecidas. Luego de este tiempo se

extrajo el aceite del embudo utilizando una pipeta Pasteur y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 MI previamente pesado, se indujo un ambiente inerte con gas nitrógeno y se guardó en refrigeración a una temperatura no mayor a 6°C.

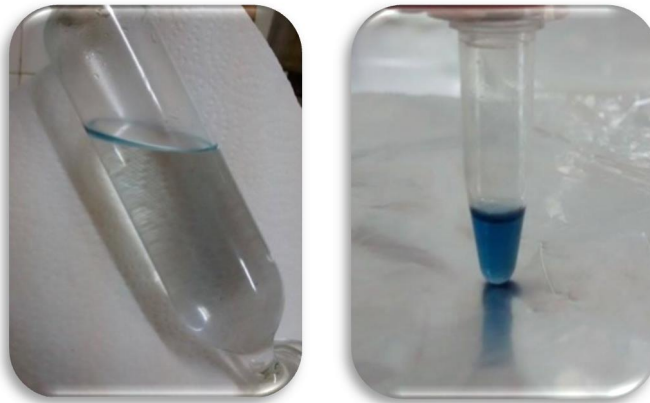


Fig. 28 Aceite esencial de *C. coronarium* en embudo de separación (Izquierda) y tubo Eppendorf (Derecha)

1.2.4 Caracterización del aceite esencial

Los aceites esenciales son obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (**Burt, 2007**). Químicamente están formados por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos), sustancias azufradas y nitrogenadas (**Acevedo et al., 2007**). Se consideran producto del metabolismo secundario de las plantas al igual que algunos alcaloides, flavonoides, taninos, y saponinas (**Bandoni et al., 2009; Madsen et al., 1995**). La composición química de los AE puede verse afectada por el medio ambiente, la procedencia de la planta y el método de extracción (**Combariza et al., 2005**). El contenido total en aceites esenciales de una planta es por lo general bajo (<2%) pero mediante técnicas de extracción se logra obtener en cantidades muy concentradas que suelen utilizarse en múltiples procesos industriales.

Puede utilizarse el término quimiotipo a la variación en la composición del aceite esencial, incluso dentro de la misma especie. Un **quimiotipo** es una entidad químicamente distinta, que se diferencia en los metabolitos secundarios. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, etc.) que producen poco o ningún cambio a nivel morfológico que sin embargo son capaces de producir grandes cambios a nivel del fenotipo químico.

Para llevar a cabo la caracterización química del aceite de *Chrysanthemum coronarium* se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a masas Agilent Technologies 7890A / 5975C, con una columna capilar de 30m × 0.25 mm × 0.25 μm utilizando un volumen de inyección 0.5 μL. Se realizó una dilución con gas de 1:2000. La temperatura de columna inició con 70°C marcando una rampa de temperatura de 2°C/min hasta llegar a 100°C., continuando con una rampa de 10°C/min hasta llegar a 250°C. En cuanto al inyector la temperatura de éste fue de 250°C.



Fig. 29 Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas



1.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.3.1 Caracterización del aceite esencial

De la recolección llevada a cabo, se obtuvieron un total de 472.5 g de flores, de los cuales fueron utilizados 400 gramos para el proceso de hidrodestilación. Se realizaron cuatro extracciones utilizando para cada una 100 gramos de material vegetal en 2 L de agua destilada.

Como producto de este proceso se obtuvo un aceite esencial de tono azul intenso y de aroma fuerte y desagradable. La densidad relativa del aceite se obtuvo como valor $\rho=0.775$ g/ml. Los porcentajes de rendimientos pueden observarse en la **Tabla VII**.

Tabla VII. Cantidad (g y rendimiento (%)) del aceite esencial de *C. coronarium*

Fecha	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
02/07/15	0.1369	0.1369
03/07/15	0.1473	0.1473
07/07/15	0.1567	0.1567
03/11/15	0.0952	0.0952

El porcentaje de rendimiento promedio fue de 0.134%, un porcentaje aceptable para el género *Chrysanthemum* sp, ya que se tienen reportados rendimientos de hasta 0.31% en estudios previos. (Hosni, et al., 2012)

1.3.2 Composición química

Para la caracterización química del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) y los resultados son expresados en porcentaje de abundancia. Se lograron identificar doce metabolitos secundarios, de los cuales destacan 2 como mayoritarios con un 23.4% el 2, 6, 6-trimetil-2-Cyclohexeno-1-metanol (α -ciclogeraniol) y con un 14.5% el compuesto identificado como santolina trieno, seguido de cuatro metabolitos, acetato de 2,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-2-en-4-ol (Acetato de verbenol) (10.013%), (Z)- β -farneseno (9.676), 2-(2,4-hexadinitilideno)-1,6-dioxaspiro [4.4] non-3-eno (Trans-Tonghaosu) (8.705%) y β -mirceno (6.461%). El resto de los componentes identificados se pueden observar en la **Tabla VIII**.

Tabla VIII. Composición química del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* de Ensenada, B.C

Identificación	TR	% del total	IR	Tipo de compuesto
Santolina trieno	3.722	14.495	906.8	MH
β -Mirceno	5.468	6.461	990.3	MH
Acetato de 2,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-2-en-4-ol (Acetato de verbenol)	16.416	10.013	1269.4	Otros
Acetato de trans-crisantenilo	16.946	4.077	1282.3	Otros
2,6,6-Trimetil-2-ciclohexeno-1-metanol	17.263	23.392	1290.0	MO
(Z)- β -Farneseno	20.995	9.676	1460.3	SH
B-Cubebeno	21.448	4.060	1487.0	SH
Epóxido farneseno	21.542	5.053	1492.5	SO
Éster de ácido acetoacético-3(10)-caren-4-ol	21.619	4.140	1497.1	Otros
α -Bisabolol	24.213	3.972	1691.7	SO
2-(2,4-hexadinitilideno)-1,6-dioxaspiro[4.4] non-3-eno (Trans-Tonghaosu)	26.455	8.705	1895.6	Otros
Otros	23.074	5.956	1599.9	Otros
Monoterpenos hidrocarbonados		20.956		
Monoterpenos oxigenados		23.392		
Sesquiterpenos hidrocarbonados		13.736		
Sesquiterpenos oxigenados		9.025		
Otros		32.891		
Total identificado		100		

TR: Tiempo de retención

IR: Índice de retención

MH: Monoterpeno hidrocarbonado

MO: Monoterpeno oxigenado

SH: Sesquiterpeno hidrocarbonado

SO: Sesquiterpeno oxigenado

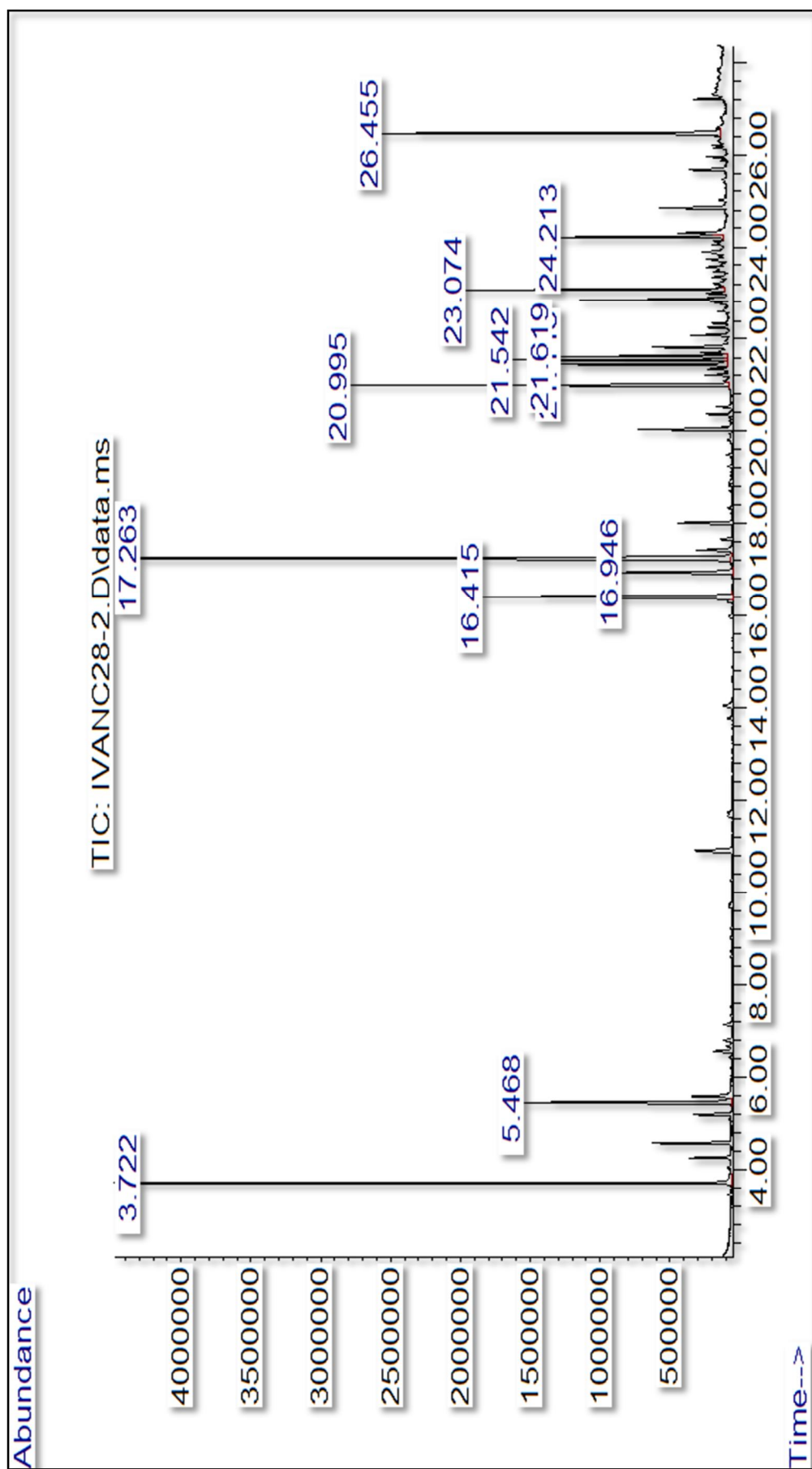
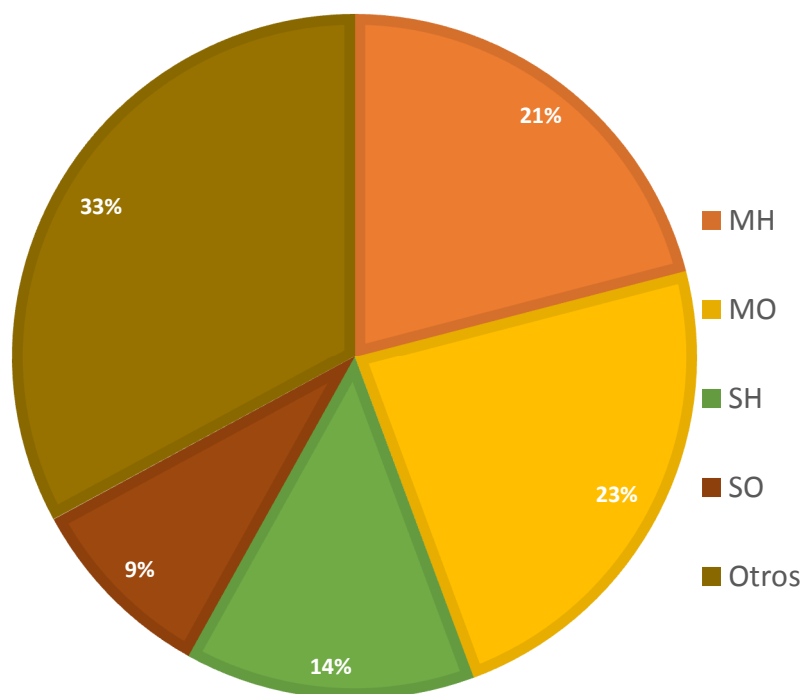


Fig. 30 Cromatograma de gases de la composición química del aceite esencial de las flores de *Chrysanthemum coronarium*

Se realizó una clasificación de los compuestos identificados en base a su estructura química: Monoterpenos hidrocarbonados, Monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados y sesquiterpenos oxigenados y otros. Cabe mencionar que la existencia de las piretrinas, moléculas identificadas en plantas del genero *Chrysanthemum* sp, son conocidas por su potente acción plaguicida, además de que son utilizadas actualmente como base para la síntesis de moléculas sintéticas con actividad insecticida, los piretroides.

La segunda clasificación más abundante en el aceite, los monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados con 23.4 y 21% respectivamente, y por último los sesquiterpenos hidrocarbonados (13.6%) y oxigenados (9%). Dentro de los monoterpenos podemos encontrar a metabolitos secundarios como mirceno y cubebeno, que se han identificado en plantas de otros géneros y especies.



Gráfica 1. Clasificación química de metabolitos identificados en el aceite esencial de *C. coronarium* de Ensenada, B.C, México.

A continuación se muestran los espectros de masas, así como la estructura de algunos de los componentes identificados en el aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium*.

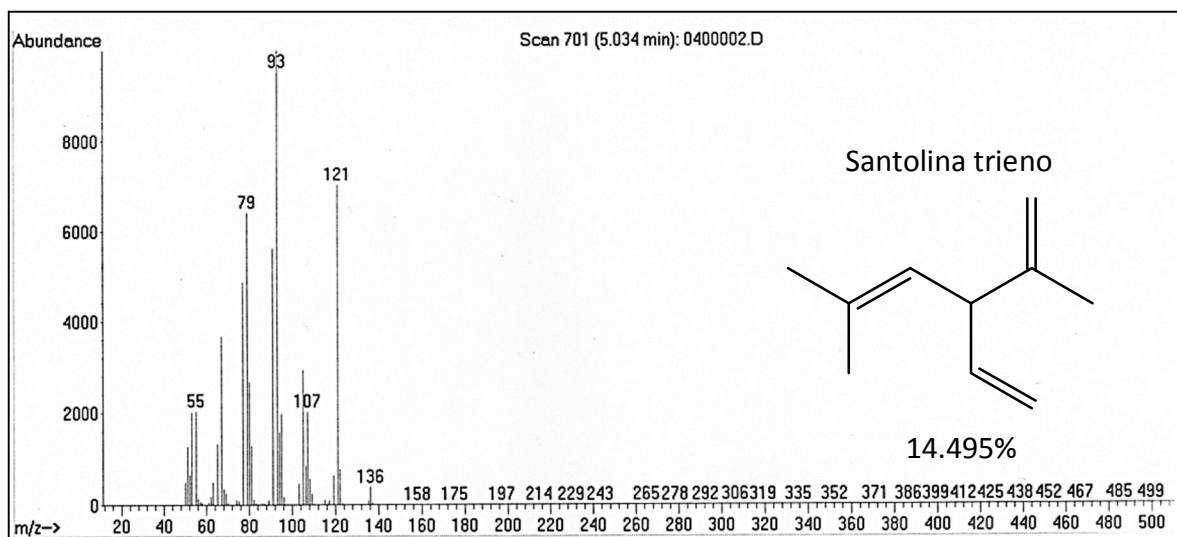


Fig. 31 Espectro de masas y estructura química de Santolina trieno, identificado en el aceite esencial de *C. coronarium*

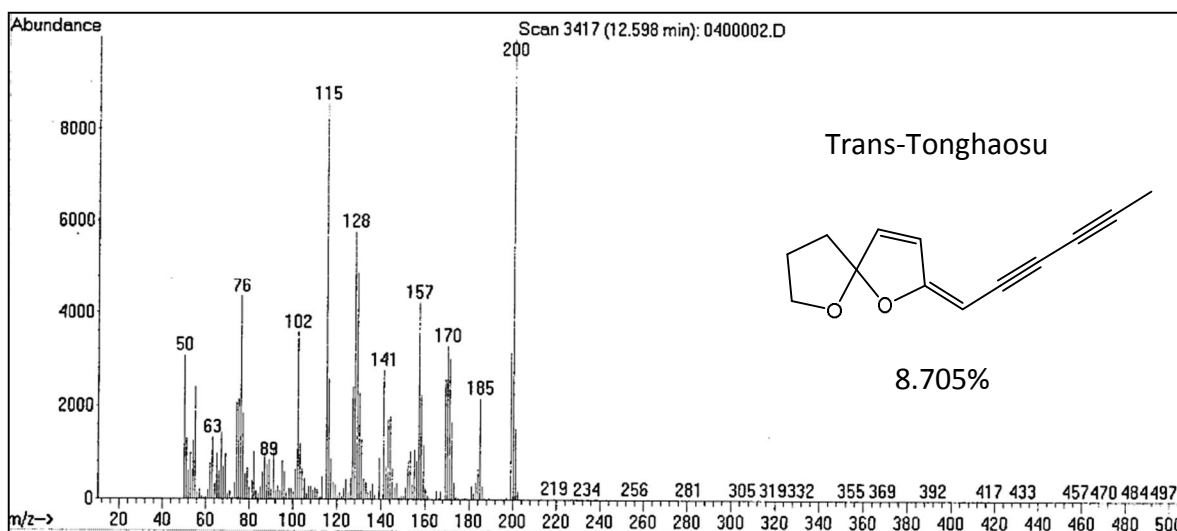


Fig. 46 Espectro de masas y estructura química de Trans-Tonghaosu, identificado en el aceite esencial de *C. coronarium*

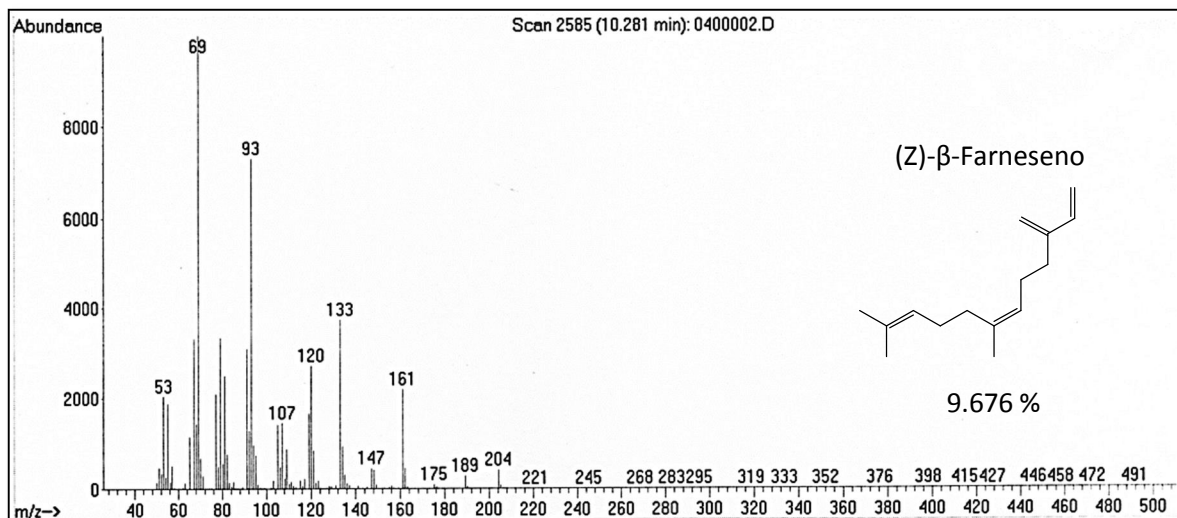


Fig. 33 Espectro de masas y estructura química de (Z)-β-Farneseno, identificado en el aceite esencial de *C. coronarium*

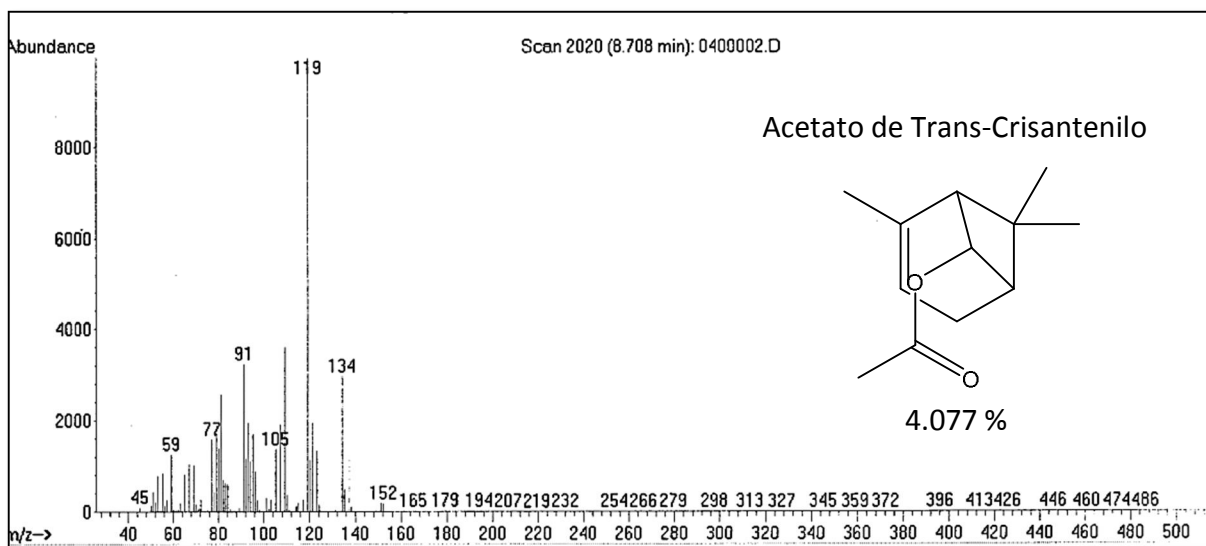


Fig. 34 Espectro de masas y estructura química de Acetato de tans-Crisantenilo, identificado en el aceite esencial de *C. coronarium*



CAPÍTULO II

Evaluación de la actividad biológica de
tipo acaricida, antifúngica y
antioxidante



2.1 GENERALIDADES

2.1.1 Estudios previos sobre la actividad biológica del aceite esencial de *C. coronarium*

En los últimos años, ha habido una clara tendencia hacia la utilización de métodos alternativos para el control de plagas en la agricultura, que son menos perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. La investigación sobre productos naturales, incluyendo extractos de plantas que pueden sustituir a los productos agroquímicos o contribuir al desarrollo de nuevos agentes (**Addor, 1995**) para el control de plagas es extremadamente importante. Los aceites esenciales por sus características físicas y químicas tienen propiedades como agentes fungicidas (**Knobloch, et al., 1987; Bishop, et al., 1996**), así como insecticidas también.

La tribu Anthemidae de la familia Asteraceae incluye especies medicinales de los géneros *Artemisia*, *Achillea*, *Chamaemelum*, *Chamomilla* y *Tanacetum*. Los componentes volátiles de los aceites esenciales presentan olores fuertes y muchos de ellos han sido utilizados como aromatizantes. Además, se reportan especies de *Tanacetum* donde sus aceites poseen actividad antibacteriana. Una de las características de los aceites esenciales es que contienen monoterpenos, sesquiterpenos y otros compuestos no terpenoides. Además de que algunos de ellos se han relacionado con una amplia gama de actividades biológicas (**Picman, 1986**).

En el caso de las especies de *Chrysanthemum* sp., las actividades biológicas que se le atribuyen, principalmente la de insecticida se cree que debido a un tipo de moléculas que son características de estas especies, las cuales son conocidas como **piretrinas**.

Las piretrinas son metabolitos con actividad insecticida aislados de las flores de *Tanacetum cinerariaefolium* también llamada *Piretro cinerariaefolium*, es conocido que estos metabolitos son característicos del género *Chrysanthemum* sp.

Existen seis compuestos que conforman a la familia de las piretrinas naturales; piretrina I y II, jasmolina I y II y cinerina I y II.

En Murcia, España, **Álvarez-Castellanos, et al**, en **2001** en colaboración con la Escuela de Ciencias Biológicas y de la Tierra en el Reino Unido, llevó a cabo varios ensayos

biológicos en donde evaluaron la actividad del aceite esencial de las flores de *C. coronarium* por contacto y por los vapores contra un panel de hongos fitopatógenos, *Alternaria sp.* (As), *Alternaria brassicola* (Ab), *Aspergillus flavus* (Af), *Botrytis cinérea* (Bc), *Fusarium moniliforme* (Fm), *Fusarium solani* (Fs), *Mycocentrospora acerina* (Ma), *Penicillium digitatum* (Pd), *Pythium ultimum* (Pu), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) y *Lacrymans sérpula* (Sl).

El bioensayo se llevó a cabo de dos maneras, una utilizando el aceite por contacto y la segunda por volatilización. Una vez que se hizo la inoculación de los cultivos con cada una de las cepas, se observaron resultados 3 y 6 días después.

El aceite de las flores de *C. coronarium* presentó actividad por contacto y por volatilización, ya que ambos reducen significativamente el crecimiento de hongos en comparación con el control (aunque algunas excepciones se muestran en la **Tabla IX**). Cabe mencionar, sin embargo, que los resultados del ensayo de placa de difusión de agar también pueden incluir algunos efectos de los vapores del aceite, además de la acción de contacto.

Tabla IX. La inhibición del crecimiento de las especies de hongos con aceite volátil (10 μ l / placa de Petri) de *C. coronarium* originario de España. (Tomado de: **Álvarez-Castellanos, 2001**)

Especie fúngica	Día 3			Día 6		
	Tratada (mm)	Control (mm)	Inhibición ^b (%)	Tratada (mm)	Control (mm)	Inhibición ^b (%)
As	1	4	84.2 ***	6	24	76.5 ***
Ab	2	10	82.4 **	6	40	85.5 ***
Af	4	9	57.4 **	13	34	62.2 ***
Bc	12	40	69.8 ***	77	77	0.0
Fm	6	9	36.4 ***	27	34	21.2 ***
Fs	6	6	-3.2ns	24	34	30.8 ***
Ma	7	9	22.2ns	35	34	-1.2ns
Pd	5	15	69.3 ***	29	43	32.4 ***
Pu	1	9	88.4 ***	5	38	87.8 ***
Rs	12	36	66.7 ***	54	68	20.5ns
Ss	3	52	93.5 ***	77	77	0.0
Sl	0	12	98.4 ***	28	70	60.5 ***

^b t –Test para la comparación entre el tratamiento y el control (ns = no significativo, * P <0,05, ** P<0,01, *** P <0.001).

mm: milímetros

En la Tabla X se puede observar que el crecimiento de *Alternaria sp.*, *Aspergillus flavus* y *Pythium ultimum* fue muy reducido (> 80%) cuando se mide al tercer día. Aunque no hay claras diferencias en la actividad antifúngica observada para el resto de los hongos, las especies más resistentes fueron *Mycocentrospora acerina* y *Penicillium digitatum*.

Tabla X. Inhibición del crecimiento de las especies fúngicas en ensayo de placa de agar por el aceite (20 μ l / placa de Petri) de *C. coronarium* originario de España. (Tomado de: **Álvarez-Castellanos, 2001**)

Especie fúngica	Día 3			Día 6		
	Tratada (mm)	Control (mm)	Inhibición (%) ^b	Tratada (mm)	Control (mm)	Inhibición (%) ^b
As	1	7	79.4 ***	2	16	84.0 ***
Ab	5	10	53.8 ***	7	17	57.3 ***
Af	2	11	82.6 ***	3	12	74.4 ***
Bc	13	32	60.1 ***	24	40	40.8 ***
Fm	6	12	51.2 ***	10	23	54.8 ***
Fs	6	8	25.9 **	9	14	36.4 ***
Ma	8	8	4.7ns	13	16	20.0 ***
Pd	10	13	21.4 *	17	20	13.0ns
Pu	0	11	95.5 ***	4	25	83.9 ***
Rs	8	13	38.1 ***	14	37	62.9 ***
Ss	27	36	24.2 ***	37	40	8.0 *
Sl	5	19	74.6 ***	22	40	45.1 ***

^b t –Test para la comparación entre el tratamiento y el control (ns = no significativo, * P <0,05, ** P<0,01, *** P <0.001).

mm: milímetros

En el ensayo donde se evaluó el aceite por volatilización (**Tabla IX**), se obtuvieron diferencias dependiendo de la especie, por ejemplo, *Fusarium moniliforme* (Fm) fue menos afectado que *P. ultimum* (Pu). La actividad del aceite esencial de *C. coronarium* es claro, **Bishop, et al (1996)** reportaron resultados similares para *Monarda citriodora* L., cuando se usa una dosis diez veces mayor (100 μ l) de su aceite esencial.

Otra de las actividades que se le atribuyen al aceite esencial de *C. coronarium*, es la de insecticida y larvicida, por lo que **Pérez, et al (1999)**, estudiaron los posibles efectos del

aceite esencial obtenido de las flores de esta especie en una serie de experimentos de laboratorio utilizando a *Bemisia tabaci*, conocida comúnmente como mosca blanca del tabaco, que afectan principalmente cultivos de patata, tomate, melón, algodón, y plantas ornamentales como *Pinsettias* y *Bougainvillea spectabilis*; También se evaluó esta actividad con algunas plagas de almacén (*Tribolium castaneum*, *Acanthoscelides obtectus* y *Ephestia kuehniella*). En este estudio los investigadores utilizaron larvas y moscas adultas.



Fig. 35 *Bemisia tabaci* "Mosca blanca"



Fig. 36 *Acanthoscelides obtectus*, *Ephestia kuehniella*, *Tribolium castaneum*

En los ensayos con *Tribolium castaneum*, se pudo observar que la aplicación tópica del aceite esencial tiene un efecto de choque inmediato, que conlleva a una parálisis de las larvas en un primer momento ($DC_{50} = 0.029 \mu\text{L/larva}$). Posteriormente, algunos insectos se recuperaron, por lo que la mortalidad de las larvas no se cuantificó hasta 24 h desde la aplicación del producto. La DL_{50} a las 24 h fue de $0.045 \mu\text{L/larva}$ (**Tabla XI**) y se mantuvo más o menos constante hasta los siete días.

Tabla XI. Dosis letales en larvas de *Tribolium castaneum* por aplicación tópica de aceite esencial de flores de *C. coronarium* originario de España. (Tomado de: **Álvarez-Castellanos, 2001**)

Tiempo desde aplicación	Dosis letal ($\mu\text{L/larvas}$)			
	DL 25	DL50	DL75	DL90
24 Hrs	0.025	0.045	0.066	0.085
48 Hrs	0.026	0.042	0.059	0.073
5 Días	0.015	0.034	0.054	0.071
6 Días	0.015	0.034	0.054	0.071
7 Días	0.035	0.045	0.055	0.065

En la **Tabla XII**, se observa que el aceite tiene un efecto repelente en adultos de *T. castaneum* muy significativo para todos los tratamientos, apreciándose un aumento de la repelencia con la dosis hasta llegar a $15 \mu\text{L}$, a partir del cual los porcentajes de repelencia se mantienen superiores al 90 %. La mortalidad fue superior en los tratamientos que en el control, si bien los valores no fueron muy altos el primer y el tercer día desde la aplicación, se alcanzó el 60 % de repelencia con la dosis más alta a partir del día 6.

Tabla XII. Repelencia y mortalidad (valores medios) en adultos de *T. castaneum* por actividad volátil del aceite esencial de *C. coronarium* originario de España. (Tomado de: **Álvarez-Castellanos, 2001**)

Dosis (μL)	% de Mortalidad ¹		% de Repelencia ¹	
	Día 1 ²	Día 3	Día 6	Día 1
0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	6.7 $\pm$ 2.7	0.0 $\pm$ 0.0
5	6.7 $\pm$ 2.7	10.0 $\pm$ 4.7	30.0 $\pm$ 4.7	74.8 *** $\pm$ 13.3
10	10.0 $\pm$ 8.1	13.3 $\pm$ 7.2	33.3 $\pm$ 2.7	57.6 *** $\pm$ 5.0
15	6.7 $\pm$ 2.7	6.7 $\pm$ 3.3	33.3 $\pm$ 9.8	92.6 *** $\pm$ 5.0
20	3.3 $\pm$ 3.3	10.0 $\pm$ 8.1	40.0 * $\pm$ 8.1	90.0 *** $\pm$ 2.7
25	13.3 $\pm$ 10.3	16.6 * $\pm$ 9.8	60.0 ** $\pm$ 4.7	100.0 $\pm$ 0.0 ***

¹ Media $\pm$ error estándar de la media. Comparación de los tratamientos con el control (diferencia significativa: * 0.01 < p $\leq$ 0.05; ** 0.001 < p $\leq$ 0.01; *** p $\leq$ 0.001)

² Días desde la aplicación

En el ensayo con *Acanthoscelides* (**Tabla XIII**), se observó una mortalidad del 40-50 % a una dosis de 1 μL de producto por placa, resultando más susceptibles que los adultos de *T. castaneum*. Los efectos repelentes fueron también puestos de manifiesto en rangos de dosis de 0.25-1 μL /placa. Se observaron diferencias en la toxicidad del aceite entre ambos sexos del insecto, siendo la longevidad de las hembras superior a la de los machos, pero esta diferencia fue sólo significativa para la dosis de 0.75 μL (13 y 7 días respectivamente)

Tabla XIII. Mortalidad y repelencia (valores medios) de *A. obtecus* por actividad volátil de aceite esencial de flores de *C. coronarium* originario de España. (Tomado de: **Álvarez-Castellanos, 2001**)

Dosis μL /placa	% de Mortalidad ¹		% de Repelencia ¹
	4 días ²	8 días	1 día
Control	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
0.25	0 $\pm$ 0.0	10 *** $\pm$ 1.4	30 *** $\pm$ 2.1
0.50	0 $\pm$ 0.0	10 *** $\pm$ 1.4	50 *** $\pm$ 2.8
0.75	20 *** $\pm$ 2.2	40 *** $\pm$ 1.7	50 *** $\pm$ 2.8
1.0	40 *** $\pm$ 2.2	50 *** $\pm$ 2.8	50 *** $\pm$ 0.0

¹ Media $\pm$ error estándar de la media. Comparación de los tratamientos con el control (diferencia significativa: *** p $\leq$ 0.001)

² Días desde la aplicación

En *E. kuehniella* el número de huevos y la eclosión de los mismos, fue significativamente mayor ($p < 0.01$) para el control que en los tratamientos.

En el caso de la mosca blanca, los resultados obtenidos (**Tabla XIV**) no fueron muy claros. Por ejemplo, en el Ensayo nº 1, la mortalidad a las 24 h fue mayor para los tratamientos (45-70 %) que para el control (25.8 %) lo cual no se observa en el ensayo 2. En cuanto a la posición de las moscas, se observó un menor número de individuos sobre la hoja tratada en el Ensayo 2, pero esto no ocurrió en el Ensayo 1 debido al bajo porcentaje de individuos sobre la hoja control. El acondicionamiento previo de hojas de pimiento con el aceite esencial da lugar a una repelencia en mosca blanca a corto plazo.

Tabla XIV. Mortalidad y repelencia (valores medios) en adultos de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) causadas por el aceite esencial de flores de *C. coronarium* originario de España. (Tomado de: **Álvarez-Castellanos, 2001**)

Tratamiento	Ensayo 1 ¹		Ensayo 2 ¹	
	Mortalidad	% sobre hoja ²	Mortalidad	% sobre hoja ²
	24H ² (%)	(1h)	24H ² (%)	(1h)
% Control a: hoja pimiento	25.80±0.30	5.56 ± 0.91	35.80 ± 1.40	42.70 ± 0.40
Control b: 10 ml de acetona a la hoja	18.70 ± 0.12	15.07 ± 1.12	—	—
Aplicación directa 0,05 µl/hoja	70.00 ** ± 0.34	13.04 ± 1.64	53.40 * ± 0.82	11.00 *** ± 0.96
Aplicación vapores 0,05 µl/hoja	46.00 ± 0.27	16.10 ± 0.98	58.20 * ± 1.15	36.40 ± 1.42
Acondicionamiento vapores 0,05 µl/hoja	45.90 ± 0.53	9.53 ± 0.75	42.10 ± 0.56	12.00 *** ± 0.79

¹ 5 repeticiones / tratamiento y poblaciones de 50 moscas.

² Media ± error estándar de la media. Comparación de los tratamientos con el control (diferencia con una reducción significativa: * 0.01 < p ≤ 0.05; ** 0.001 < p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001).

Los resultados de este estudio muestran que los vapores del aceite esencial de *C. coronarium* son tóxicos y disminuyen la fecundidad en plagas de almacén con resultados variables según los experimentos descritos.

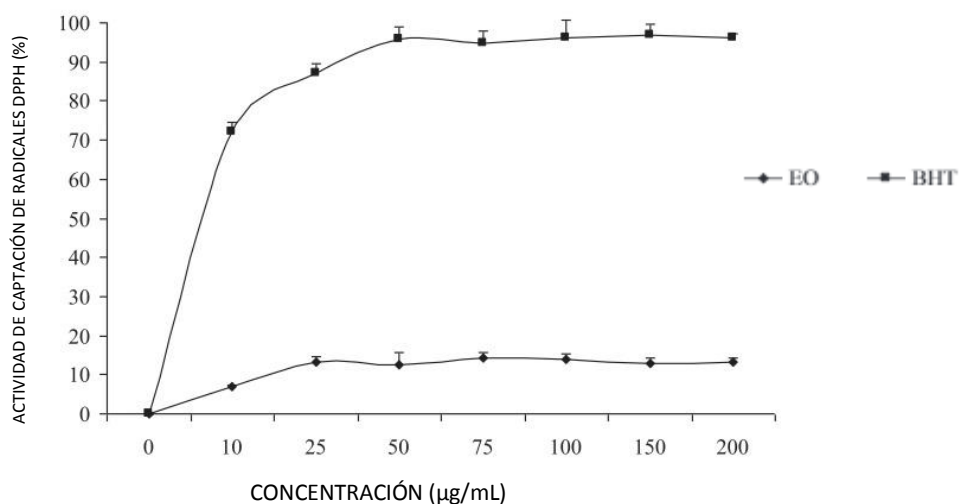
2.1.2 Estudios previos sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de *C. coronarium*

La actividad antioxidante está determinada por compuestos que son capaces de inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas deteniendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los antioxidantes pueden ser clasificados en dos grupos: sintéticos y naturales. En general, los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides. Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno) han sido utilizados desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y su uso ha sido restringido debido a su carcinogenicidad.

Se consideran radicales libres a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo lo cual los hace altamente inestables (Rodríguez, 2001).

En el estudio realizado en Túnez, mencionado anteriormente, además de llevar a cabo la caracterización química del aceite esencial de *C. coronarium*, se evaluó su capacidad secuestradora de radicales libres mediante la técnica del radical libre DPPH, sin arrojar resultados importante. En contraste de cuando se utilizó el BHT como antioxidante comercial, se necesitaba una concentración de 50 mg/ml o superior, para lograr la inhibición de los radicales DPPH en un 95%. Estos investigadores justifican que la débil actividad captadora de DPPH del aceite puede ser atribuible a la ausencia de algunos componentes que tienen una alta actividad de la donación de hidrógeno. Además, mencionan que el efecto más bien bajo del aceite esencial podría explicarse en parte por su pobre solubilidad en un medio polar, y que en tal caso la actividad antioxidante se debe a la fracción de aceite que se introduce en solución. Como apoyo a este supuesto Moller et al. (1999) informaron

que los componentes oxigenados de aceite de orégano muestran solubilidad parcial en el sistema polar, lo que puede explicar la disminución de la actividad antioxidante del aceite.



Gráfica 2. Comparación de actividad antiradicalaria entre el aceite esencial de *C. coronarium* originario de Túnez y el control BHT. (Hosni, et al., 2012)



2.2 METODOLOGÍA

ACTIVIDAD ACARICIDA

2.2.2 Biología y ciclo de vida de *Tetranychus urticae*

T. urticae es un ácaro fitófago con alto potencial reproductivo, ciclo de vida corto, tasa de desarrollo rápido y capacidad para dispersarse rápidamente. Su tamaño oscila entre 0.4 y 0.6 mm, en el caso de la hembra adulta, que tiene un aspecto globoso. El macho es más pequeño y aperado. Este ácaro puede presentar diferentes características morfológicas, sobre todo su color puede variar en respuesta a su régimen alimenticio, factores ambientales, planta huésped y estado de desarrollo (Sá, 2012). *T. urticae* se reproduce mediante partenogénesis de tipo arrenotoca en la que los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados (haploides), mientras que las hembras se desarrollan a partir de huevos fecundados (diploides). Esta especie presenta una proporción de sexos entre 2:1 y 9:1 a favor de las hembras, respectivamente (Macke et al. 2011). Cada hembra adulta puede ovopositar entre 100-120 huevos, con una tasa de 3-5 huevos por día. Sin embargo, estas cifras pueden variar según la cantidad y la calidad del alimento, o las condiciones ambientales (Zhang, 2003).

Tiene un ciclo de vida corto que consta de cinco fases de desarrollo: Huevo (0.5-3 días), larva (3-5 días), protoninfa (3-5 días), deutoninfa (2-3 días) y adulto (Fig. 51). Entre cada fase hay un período inactivo o quiescente, en la que adoptan una posición característica, recibiendo el nombre de crisalis (protocrisalis, deutocrisalis y deutocrisalis). La quiescencia está delimitada por el desprendimiento de las exuvias (Moraes et al, 2008; Badii et al. 2011). *T. urticae* en condiciones óptimas (~ 30°C) completa su ciclo en 9 días (Herbert, 1981; Carey et al, 1982). Si las condiciones ambientales y de alimento son favorables, una generación puede ser completada en una semana (Godfrey, 2011).

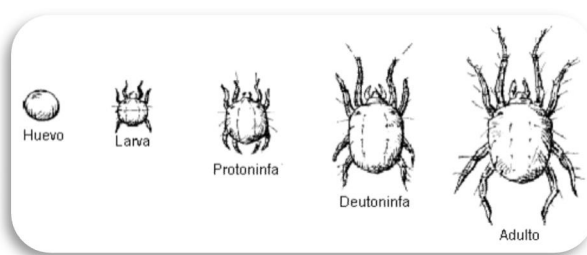


Fig. 37 Ciclo de vida de *Tetranychus urticae* (Godfrey., 2011)

2.2.3 Daños ocasionados por *Tetranychus urticae*

El daño causado por este fitófago se debe a su actividad alimenticia. Para alimentarse el ácaro inserta sus estiletes en el tejido de la hoja, succionando el contenido de las células epidérmicas y parenquimatosas. El vaciado causa el colapso y muerte de las células que originan manchas cloróticas en las hojas, disminuyendo la tasa de transpiración y la actividad fotosintética de la planta (**Park et al, 2002; Martínez-Ferrer et al. 2006**). Las larvas, ninfas y adultos de *T. Urticae* (araña roja), se alimentan en el envés de las hojas originando manchas de color amarillo incluso toda la hoja se puede tornar amarilla, esto se traduce en un descenso del crecimiento de la planta y de la producción para posteriormente finalizar con la muerte a causa de la alta infestación por el ácaro. Tanto adultos y ninfas producen telas que pueden dañar el aspecto del cultivo, si la densidad poblacional de la plaga es alta las plantas pueden ser cubiertas con telas completamente (**Koppert, 2013**). Estudiando los efectos de estos ácaros sobre diversos cultivos, como el maíz, se conoce que los daños son más severos cuando los ácaros atacan las hojas o arriba del nivel de la mazorca. Las infestaciones severas se parecen al estrés por sequía ya que el daño progresa de la base de la planta hacia arriba (**CESAVEG, 2008**). En cultivo como calabaza, melones y sandías la pérdida de las hojas debido a esta plaga puede tener un impacto significativo en la producción así como producir quemaduras de las mismas por el sol. En cultivos tales como el frijol donde las vainas son atacadas, los ácaros pueden causar daño directo. En plantas ornamentales, los ácaros no son sólo una preocupación estética, sino que puede matar las plantas si las poblaciones son muy altas. Los ácaros son plagas también importantes de las rosas cultivadas en el campo (**Godfrey, 2011**).

2.2.4 Desarrollo experimental

El ensayo fue realizado en el laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC. El modelo utilizado *Tetranychus urticae*, fue tomado del insectario perteneciente al mismo laboratorio, donde se mantienen en plantas de frijol peruano (*Phaseolus vulgaris*). La prueba se llevó a cabo mediante la técnica de "Inmersión de círculos de hoja" reportada por **Cahill (1996)** con algunas modificaciones, para esto fueron utilizados 30 especímenes por concentración y todo fue realizado por triplicado.

Procedimiento:

1. Se realizaron diluciones del aceite esencial de *C. coronarium* utilizando surfactante (Kolliphor 10%) como medio de disolución.

Tabla XV. Esquema de concentraciones utilizadas para bioensayo de acaricida

Concentración (mg/mL)	N° de especímenes x3
10	90
5	90
2.5	90
1.25	90
0.625	90
0.312	90

2. Se utilizó el insecticida comercial *Pyganic 5%* como control positivo.
3. Los discos de hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris*) previamente cortados (30mm) se sumergieron en cada una de las diluciones realizadas para asegurar la impregnación total. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

4. Se utilizaron cajas Petri de 35mm donde fueron colocados los discos de hoja, estas cajas fueron previamente impregnadas con las concentraciones correspondientes a los discos y secadas a temperatura ambiente durante 20 minutos.
5. Se hicieron también por triplicado dos muestras blanco, Kolliphor 10% y agua destilada, que corresponden a los solventes que se utilizaron tanto para el aceite esencial como para *Pyganic*, correspondientemente.
6. Colocados los discos de hoja en la caja correspondiente, se colocaron en cada una 30 hembras adultas, lo cual se fue verificando utilizando un estereoscopio. Los ácaros fueron introducidos apoyándonos con un pincel para evitar dañarlos físicamente.
7. Las cajas de Petri ya con los ácaros dentro, se sellaron con papel Parafilm para evitar que los ácaros se salieran.
8. Se evaluó la mortalidad a las 24 Horas realizando un conteo de los ácaros muertos, observando en el estereoscopio. Se consideraron muertos todos aquellos ácaros que no mostraron ningún tipo de movimiento al tacto.
9. Los resultados de mortalidad obtenidos se corrigen utilizando la fórmula de **Abbot, (1925)**.

$$\text{Mortalidad corregida (MC)} = (M_{\text{tratada}} - M_{\text{testigo}} / 100 - M_{\text{testigo}}) \times 100$$

M_{tratada} : Muestra tratada

M_{testigo} : Muestra blanco

10. La validación de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa estadístico *Statistica 10.0*
11. Se determinó la dosis letal media (DL_{50}) a partir de los resultados obtenidos en el bioensayo.



2.3 METODOLOGÍA

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Análisis de la antifúngica del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium*

2.3.1 INTRODUCCIÓN

Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos se realizan en aquellos hongos causantes de enfermedad, especialmente si pertenecen a especies que presentan resistencia a los agentes antifúngicos más comúnmente usados. Estas pruebas son también importantes en la vigilancia de la resistencia, en estudios epidemiológicos y para comparar la actividad *in vitro* de nuevos agentes antifúngicos con los ya existentes.

Un antifúngico es una sustancia de origen biológico, semisintético o sintético que inhibe el crecimiento de un hongo o es letal para él.

2.3.2 PROCEDIMIENTO

La prueba para evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada (CISESE).

Para desarrollar ésta técnica fueron utilizadas las siguientes cepas:

Cepas aisladas de madera de la vid

- *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma
- *Phomopsis viticola* MXS0915

Cepas aisladas de plantas de fresa

- *Colletotrichum* sp MX1015
- *Macrophomina phaseolina*
- *Fusarium* sp. MXSQ01

Todos los aislados se mantuvieron en agar papa dextrosa (PDA) (Difco) y forman parte de la colección del laboratorio de fitopatología del CICESE.

Procedimiento:

1. Se preparó una solución madre de 1,000 μg / mL disolviendo en acetona el aceite esencial de *C. coronarium*.
2. El medio de PDA se complementó con la cantidad apropiada de la solución madre para obtener una concentración de 100 μg / mL.
3. Como control positivo fue utilizado el fungicida Benomilo® y el solvente acetona como control negativo.
4. Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando placas de Petri de 3.5 cm de diámetro. Las placas se inocularon en el centro con un disco de micelio de 0.5mm de los hongos correspondientes y se incubaron a 28 ° C.
5. El crecimiento radial se midió en milímetros (mm), se tomó como referencia el momento en que el hongo en el control negativo (Medio PDA con acetona) llenó la caja.



2.4 METODOLOGÍA

ACTIVIDAD

ANTIOXIDANTE

2.4.1 INTRODUCCION

Las plantas se encuentran expuestas a una gran cantidad de radicales libres formados tanto endógenos como exógenos, es por ello que estas necesitan una elevada concentración de antioxidantes para protegerse a sí mismas del daño celular, dicha protección proviene de diferentes compuestos, tales como los fenólicos, flavonoides y carotenoides.

Actualmente existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres. Entre ellos se pueden mencionar el uso del 2,2-difenil- 1-picril Hidrazilo (DPPH), ácido 2,2', azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico (ABTS), la reacción con el óxido nitroso (test NO), diclorhidrato de N, N-Dimetil-p-fenilendiamina (DMPD), generación de radicales peroxilo, superóxido e hidroxilo, y otros.

2.4.2 Reducción del radical libre DPPH

El fundamento de este método desarrollado por **Brand-Williams et al., (1995)** consiste en que el radical DPPH tiene un electrón desapareado presentando una coloración azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción ante una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. En esta técnica los compuestos activos reducen el radical DPPH a un compuesto incoloro (Dipicril Fenil Hidrazina).

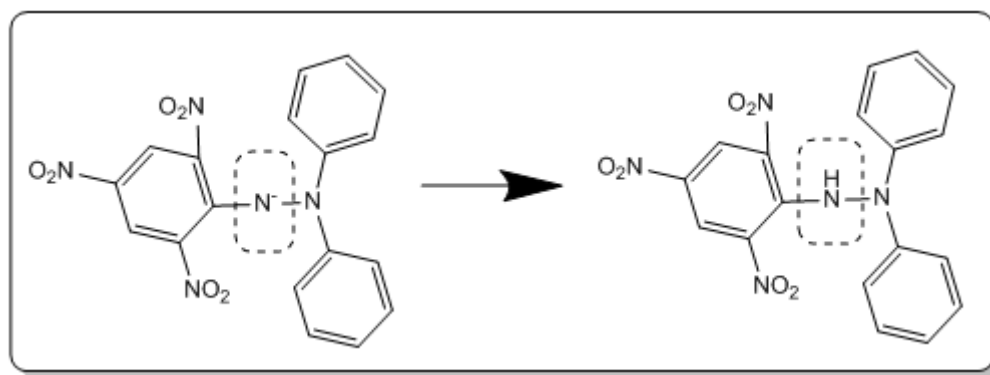


Fig. 38 Estabilización del radical DPPH

Procedimiento.

1. Se preparó una disolución del radical DPPH 125 μ M en metanol (7.5mg/250ml), lo suficiente para todas las concentraciones a evaluar.
2. Se realizó una disolución patrón del aceite esencial de *C. coronarium* en metanol, a una concentración de 1mg/ml.
3. A partir de la disolución patrón, se hicieron diluciones seriadas, por triplicado, obteniendo las siguientes concentraciones del aceite esencial: 1.0, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007, 0.004, 0.002 mg/ml
4. Una vez realizadas las diluciones se agregaron 500 μ l de la solución DPPH 125 μ M a todos los tubos intentando hacerlo rápidamente. Una vez hecho esto se cubrieron los tubos de la luz y se dejaron reposar por un periodo de 30 minutos.
5. Pasado este tiempo se realizaron las lecturas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm, calibrando previamente el equipo con metanol.
6. Antes de hacer las lecturas del aceite esencial, se hizo la lectura de la solución de DPPH 125 μ M, ya que es un dato necesario para los cálculos posteriores.
7. Se calculó el % de actividad antioxidante mediante la fórmula que se presenta a continuación, para ello se trabajó con los promedios de las muestras realizadas por triplicado.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = [1 - (A_m/A_c)] \times 100$$

Donde:

A_m: absorbancia promedio de la muestra

A_c: absorbancia de la muestra control (Solución de DPPH)

8. Con los porcentajes de actividad antioxidante obtenidos y las concentraciones ya conocidas, se realizó una gráfica para el cálculo de la CE₅₀.

2.4.5 Reducción del radical libre ABTS⁺

El método del ABTS (Ácido 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) es un ensayo que permite determinar la capacidad antioxidante de ciertos fluidos biológicos, células o tejidos, también, se utiliza para evaluar esta misma actividad antioxidante de extractos de productos naturales o compuestos puros que tengan el potencial de emplearse como suplementos dietéticos o terapéuticos (**Kambayashi, 2009**).

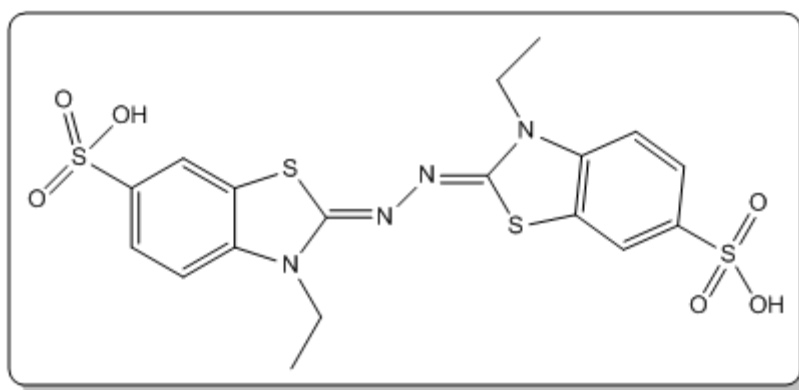


Fig. 39 Ácido 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Procedimiento:

1. Se pesó en la balanza analítica 0.0033g de persulfato de potasio y 0.0194g del reactivo ABTS se disolvieron en 5ml de agua destilada.
2. Para generar el radical, fue necesario dejar reposar la solución preparada, durante 18 horas, cubierto de la luz.
3. Una vez pasadas las 18 horas, se tomaron 150 μ L de la solución patrón de ABTS (preparada anteriormente) y se diluyeron con 15mL de metanol. La solución preparada se protegió de la luz directa.
4. Se hizo una solución patrón del aceite esencial, a una concentración de 1mg/ml en metanol.

5. Se realizaron diluciones seriadas por triplicado, a partir de la solución patrón que se preparó con el aceite esencial, donde se obtuvieron las siguientes concentraciones: 1.0, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007, 0.004, 0.002 mg/ml.
6. Una vez listas las diluciones seriadas, en otra gradilla se puso la misma cantidad de tubos de ensaye (30) y se tomaron 20 µL de cada concentración y se colocaron en los nuevos tubos.
7. Ya realizado el punto anterior, se adicionaron 980 µL de la solución de ABTS⁺ (ya diluida) a cada tubo, se dejaron reposar durante siete minutos protegidos de la luz.
8. Transcurridos los 7 minutos se hizo la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 734 nm, tanto de las diluciones como de la solución de ABTS⁺.
9. Ya con los resultados de las absorbancias, se promediaron los triplicados de cada concentración y se calculó el % de reducción del radical ABTS⁺ (Actividad antioxidante) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = [(Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}) / (Abs_{\text{inicial}})] \times 100$$

Donde:

Abs_{inicial}: absorbancia promedio de la solución de ABTS⁺

Abs_{final}: absorbancia promedio de cada concentración

10. Una vez obtenidos los porcentajes de actividad antioxidante se calculó la CE₅₀.

2.4.4 Decoloración oxidativa del β -Caroteno

Esta es una técnica colorimétrica, ya que la oxidación sucesiva del β -Caroteno debido al medio oxidativo que se genera, conlleva a la pérdida de coloración. Cuando la muestra a evaluar presenta actividad antioxidante es porque esta se encuentra protegiendo a la molécula de β -Caroteno frente a la oxidación y por lo tanto la decoloración de la solución será mucho más lenta o nula.

Procedimiento:

1. El primer paso a realizar fue la preparación de la emulsión de β -Caroteno, para ello se utilizaron los siguientes reactivos
 - a. 0.2mg de β -caroteno
 - b. 20 μ L de ácido linoleico
 - c. 200 μ L de Tween 20
 - d. 1mL de cloroformo
- La preparación de este reactivo se llevó a cabo protegiéndolo de la luz
- El vial donde se preparó el reactivo se dejó destapado con el fin de que el cloroformo presente se evaporara.
2. Se puso a burbujear agua destilada, por lo menos una hora.
3. Una vez evaporado el cloroformo:
 - a. Se adicionaron 50 mL del agua destilada que previamente se mantuvo en burbujeo.
 - b. Se mezcló por al menos 2 minutos, para asegurarse que se formó una mezcla homogénea.
 - c. Ya preparada la emulsión se tapó y protegió de la luz
4. Se preparó una solución patrón del aceite esencial a una concentración de 1mg/mL en metanol.
5. El análisis con esta técnica solo se realizó con una concentración, 1mg/mL por triplicado.

6. De la solución del aceite esencial preparada, se adicionaron a cada tubo 350 μL más 2.5mL de la emulsión de β -Caroteno, inmediatamente se hizo la primer lectura (Tiempo cero) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm.
7. Se colocaron los tubos cerrados en baño maría durante 120 minutos a 50°C.
8. Transcurridos los 120 minutos se hizo una segunda lectura, a la misma longitud de onda (470 nm).
9. Las absorbancias obtenidas se promediaron y se sustituyeron en la siguiente fórmula para determinar el % de actividad antioxidante:

$$10. \text{ Actividad antioxidante (\%)} = [1 - (\text{Am}^0 - \text{Am}^{120}) / (\text{Ac}^0 / \text{Ac}^{120})] \times 100$$

11. Donde:

12. Am^0 = Promedio de las absorbancias de la muestra a tiempo cero.

13. Am^{120} = Promedio de las absorbancias de la muestra a tiempo 120 (min)

14. Ac^0 = Promedio de las absorbancias de la emulsión a tiempo cero

15. Ac^{120} = Promedio de las absorbancias de la emulsión a tiempo 120 (min)



2.5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS



2.5.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ACARICIDA

2.5.1 Actividad acaricida

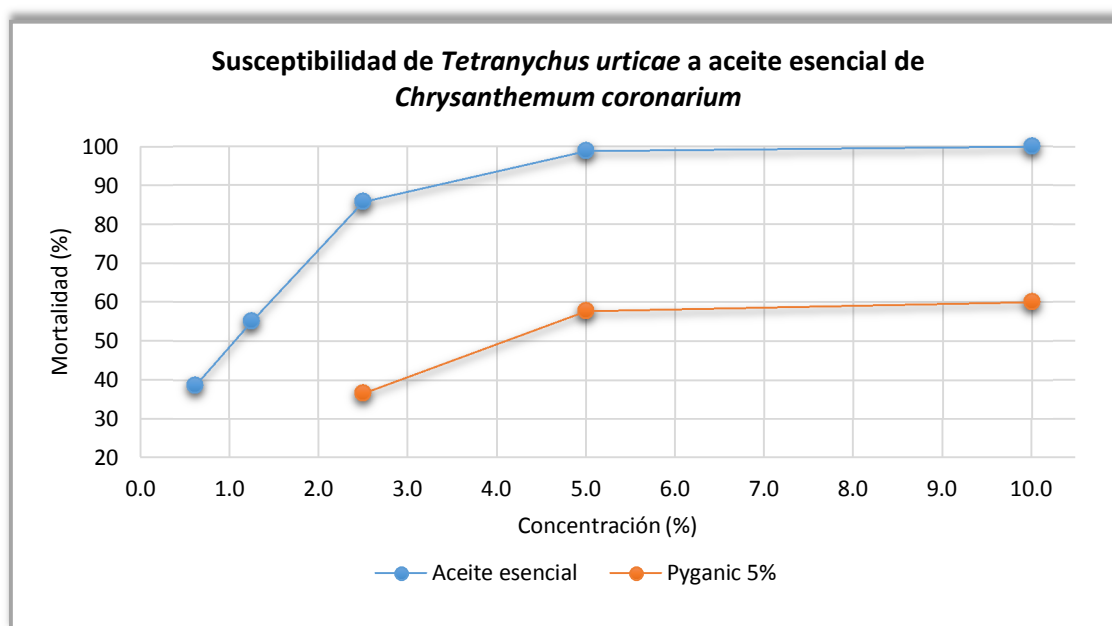
Como ya se mencionó anteriormente, en la actualidad uno de los problemas que más afectan la producción agrícola son las plagas y sumado a esto el uso de plaguicidas sintéticos que por su alto grado de toxicidad y capacidad de bioacumulación se ha generado un nuevo interés por productos menos dañinos, productos de origen natural, por su fácil eliminación del medio y niveles bajos de toxicidad tanto para la planta como para el personal que aplica estos productos.

A causa de la problemática que se observa, se sugirió el análisis del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* que por el tipo de metabolitos que lo conforman puede generar mortalidad en ciertas plagas agrícolas.

Los resultados obtenidos del ensayo sugieren que el aceite de *Chrysanthemum coronarium* efectivamente posee un buen perfil como acaricida, ya que presentó una mortalidad del (100%) a la concentración más alta evaluada del 10%, en donde los 90 individuos expuestos murieron, superando por mucho al control positivo utilizado, Pyganic 5%, el cual, a la misma concentración del aceite, 10% , presento una mortalidad de 67%; sin embargo, un resultado sorprendente es el observado a la concentración de 5%, en donde el aceite esencial mantuvo la misma mortalidad (99%) a pesar de haber sido reducido a la mitad (5%), superando de nuevo al control positivo, un comportamiento similar se puede apreciar cuando el aceite se evaluó a la concentración de 2.5%, mostrando una alta mortalidad de 87%, esto nos permite inferir que el aceite de C. coronarium puede ejercer el mismo efecto que Pyganic® utilizando tres o cuatro veces menos producto, lo que lo hace 3 veces más potente.

Tabla XVI. Resultados del porcentaje de mortalidad en *Tetranychus urticae* del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium*

n	[%]	Resultados				Mortalidad (%)	MC (%)
		x1	x2	x3	Total		
90	10.00	30	30	30	90	100	100
90	5.00	29	30	30	89	99	99
90	2.50	23	29	26	78	87	86
90	1.25	11	16	25	52	58	55
90	0.62	14	9	15	38	42	39



Gráfica 3. Comparación del % de mortalidad del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* y Pyganic 5%.

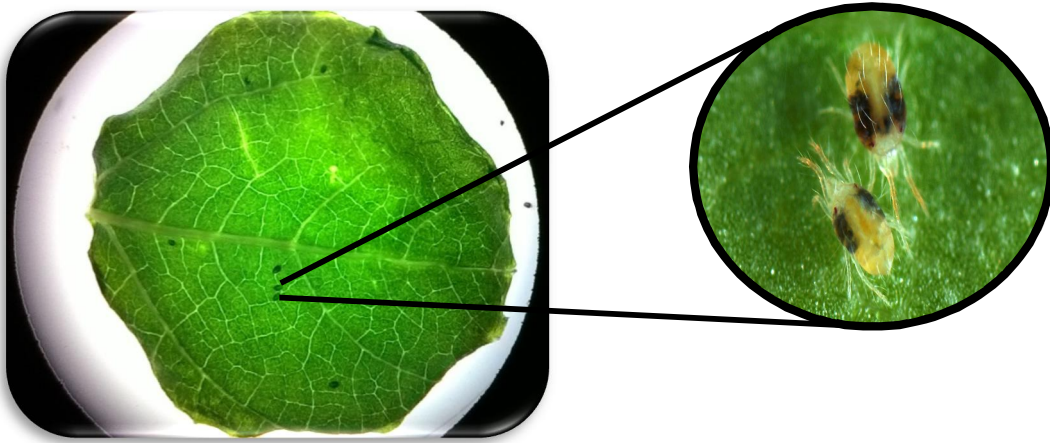


Fig. 40 *Tetranychus urticae* vista en estereoscopio



2.5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

2.5.2 Actividad antifúngica

Para el ensayo se utilizaron como modelos biológicos cinco cepas de hongos fitopatógenos diferentes, los cuales se caracterizan por causar daños en cultivos de la región, como son los de fresa y vid, es aquí donde radica la importancia de la búsqueda de productos capaces de inhibir su crecimiento. Se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de *C. coronarium* a una concentración de 100 µg/mL y los resultados se pueden observar en la **Tabla XVII**.

Como se aprecia, el crecimiento del hongo en el aceite esencial comparado con el control negativo es muy similar, lo que nos indica que el aceite no presentó actividad significativa contra estos hongos, ya que este creció de manera natural sobre el medio de cultivo a pesar de estar impregnado con el aceite, caso contrario al control positivo, el cual logró una inhibición total de los hongos.

Existen algunos factores que podrían contribuir a los resultados obtenidos, sabemos que los aceites esenciales son compuestos volátiles, por lo que la temperatura de incubación de los hongos (28 grados) puede contribuir de forma indirecta a la pérdida de aceite, además, este procedimiento se llevó a cabo durante los meses en donde se registraron altas temperaturas en la región, lo que pudo haber derivado en la volatilización de algunos compuestos. Es importante destacar también el tema de la resistencia que estas cepas presentan, al ser aisladas directamente del hospedero, podrían presentar mayor resistencia al producto evaluado, llegando a necesitar de concentraciones muy elevadas para inhibir el crecimiento.

Tabla XVII. Crecimiento de cepas de hongos fitopatógenos expuestas a aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium*

Cepa fitopatógena	Crecimiento (mm)			Inhibición (%)
	Aceite esencial	Acetona (-)	Benomilo (+)	
<i>Macrophomina phaseolina</i>	11	11	1	3.03
	10	11	1	
	11	11	1	
<i>Phomopsis viticola</i>	14	16	0	12.5
	14	16	0	
	14	16	0	
<i>Colletotrichum spp.</i>	11	11	0	0
	11	11	0	
	11	11	0	
<i>Fusarium spp</i>	14	14	0	0
	14	14	0	
	15	15	0	
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	16	15	0	0
	16	15	0	
	16	16	0	

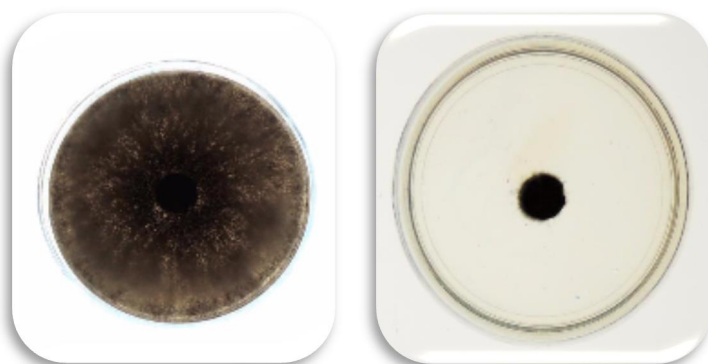


Fig. 41 Ensayo de inhibición de crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en medio PDA con aceite esencial de *C. coronarium* (izquierda) y Benomilo (derecha)

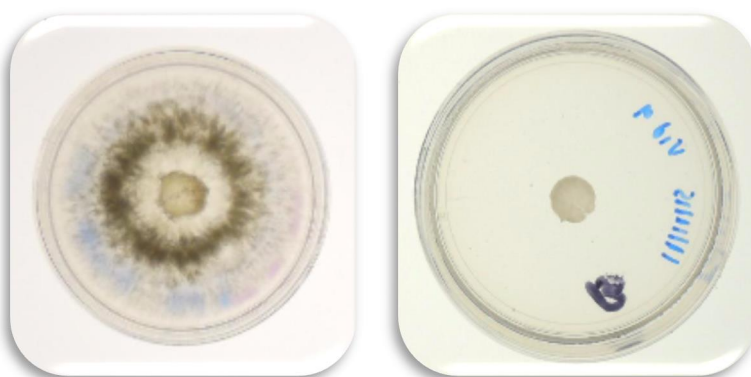


Fig. 42 Ensayo de inhibición de crecimiento de *Phomopsis viticola* en medio PDA con aceite esencial de *C. coronarium* (izquierda) y Benomilo (derecha)

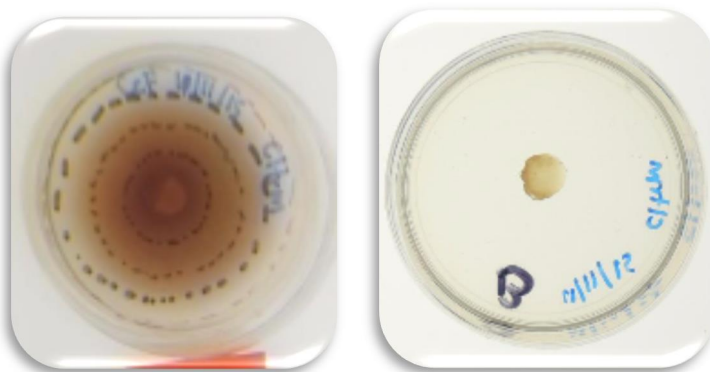


Fig. 43 Ensayo de inhibición de crecimiento de *Collectotrichum spp.*, en medio PDA con aceite esencial de *C. coronarium* (izquierda) y Benomilo (derecha)

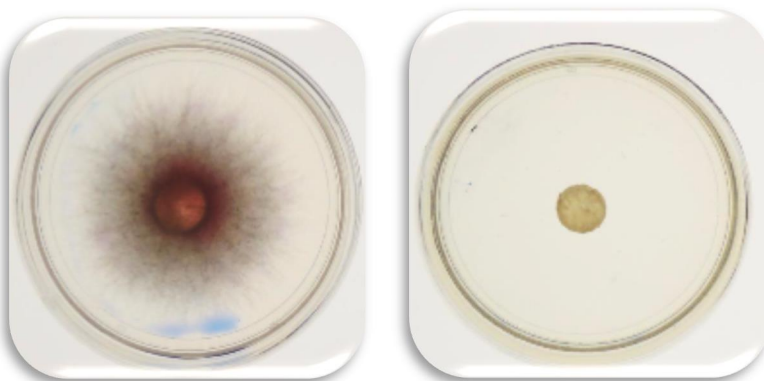


Fig. 44 Ensayo de inhibición de crecimiento de *Fusarium sp.*, en medio PDA con aceite esencial de *C. coronarium* (izquierda) y Benomilo (derecha)

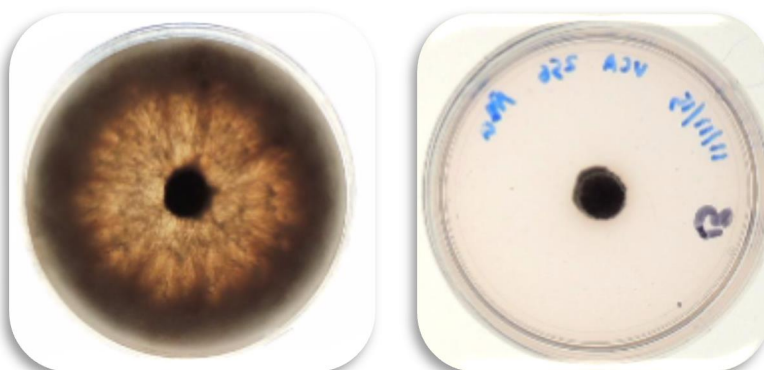


Fig. 45 Inhibición de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae.*, en medio PDA con aceite esencial de *C. coronarium* (izquierda) y Benomilo (derecha)



2.5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.5.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.5.3.1. Reducción del radical libre DPPH⁺

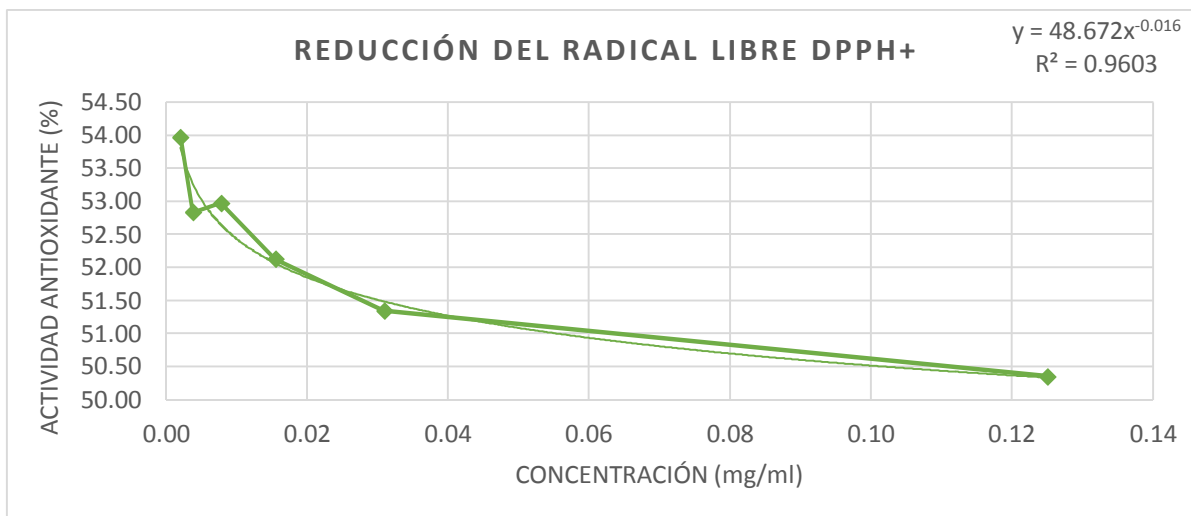
Se determinó la capacidad que tiene el aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* para reducir el radical libre DPPH. Como se puede apreciar en la **Tabla XVIII**, a una concentración de 2 µg/ml presentó un porcentaje de actividad antioxidante (%AA) 54%, lo cual es un resultado muy bueno, conforme disminuye la concentración del aceite, el %AA aumenta.

Con los datos de %AA, fue calculada la CE₅₀, es decir, la concentración del aceite esencial necesaria para reducir al 50% del radical DPPH; esta concentración fue de 0.0155 mg/ml o 15.5 µg/ml, la cual es considerablemente buena, comparada con algunos antioxidantes naturales utilizados como controles positivos: α-tocoferol y quercetina los cuales tienen una CE₅₀ de 76 µg/ml y 3 µg/ml respectivamente.

Haciendo una comparación de los datos obtenidos y los reportados por **Hosni, et al (2012)** en donde se evalúa mediante la misma técnica el aceite de la misma planta, obteniendo un máximo de 20% de actividad antioxidante y una CE₅₀ de 50mg/ml; esto confirma el hecho de que la composición química de una planta está dada por muchos factores y es dependiente la variación del clima y lugar geográfico.

Tabla XVIII. Resultados de actividad antioxidante del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* sobre el radical DPPH⁺

Concentración (mg/ml)	Absorbancia (nm)			Promedio	Actividad Antioxidante (%)
	1x	2x	3x		
0.0020	0.218	0.222	0.209	0.2163	53.9716
0.0038	0.227	0.215	0.223	0.2217	52.8369
0.0078	0.225	0.215	0.223	0.2210	52.9787
0.0155	0.228	0.216	0.231	0.2250	52.1277
0.0310	0.235	0.221	0.230	0.2287	51.3475
0.1250	0.233	0.230	0.237	0.2333	50.3546



Gráfica 4. Perfil de actividad antioxidante del aceite esencial de *C. coronarium* sobre el radical DPPH⁺

En el caso del aceite esencial la CE_{50} calculada fue de 15.5 $\mu\text{g/ml}$, lo cual nos dice que la cantidad que se requiere para reducir al 50% el radical es relativamente poca y se logra un resultado considerablemente bueno, se realizó también una comparación con los antioxidantes ya conocidos α -tocoferol y quercetina los cuales tienen una CE_{50} de 76 $\mu\text{g/ml}$ y 3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

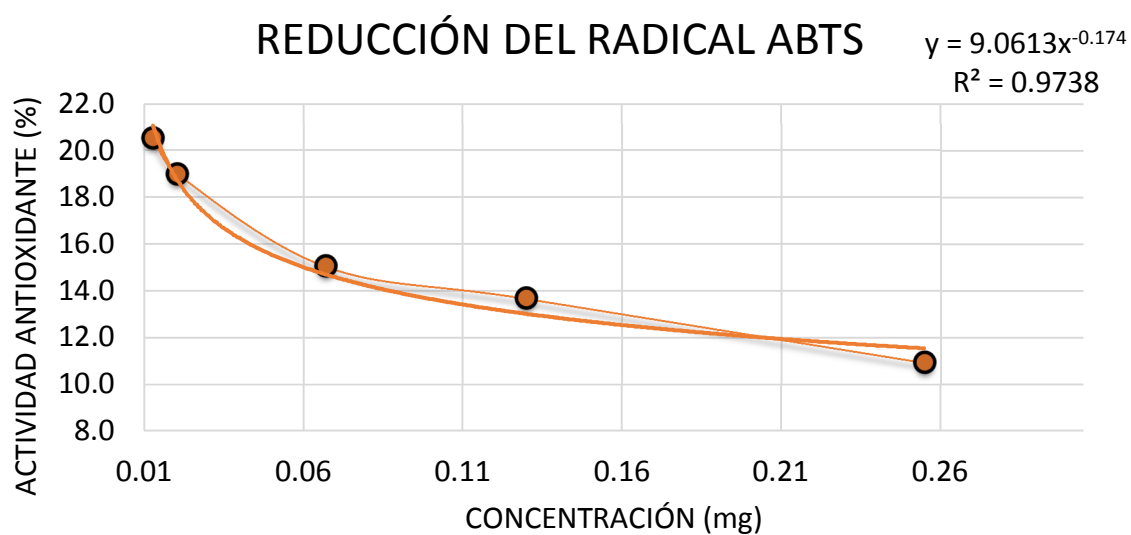
2.5.3.2 Reducción del radical libre ABTS

Al igual que en la prueba antes mencionada, el aceite de *C. coronarium* mostró un comportamiento similar, en donde a menor concentración se tiene un mayor potencial antioxidante, como puede observarse en la tabla XIX. Al analizar estos datos es obvio el hecho de que a una concentración tan baja como 0.0078 mg/ml el aceite tiene una actividad del 20.5%, y son inversamente proporcionales. Para un 100% de actividad esperaríamos una concentración sumamente baja, lo cual nos da un indicativo del buen perfil antioxidante de este aceite. Se calculó la CE_{50} arrojando una concentración de 0.00315 mg/ml o 31.5 μ g/ml.

El ácido ascórbico o mejor conocido como vitamina c, es un antioxidante natural ampliamente utilizado, el cual para esta determinación fue utilizado como control positivo, arrojando una CE_{50} de 30 μ g/ml, prácticamente la misma que el aceite, corroborando una vez más el posible potencial antioxidante.

Tabla XIX. Resultados de actividad antioxidante del aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* sobre el radical ABTS⁺

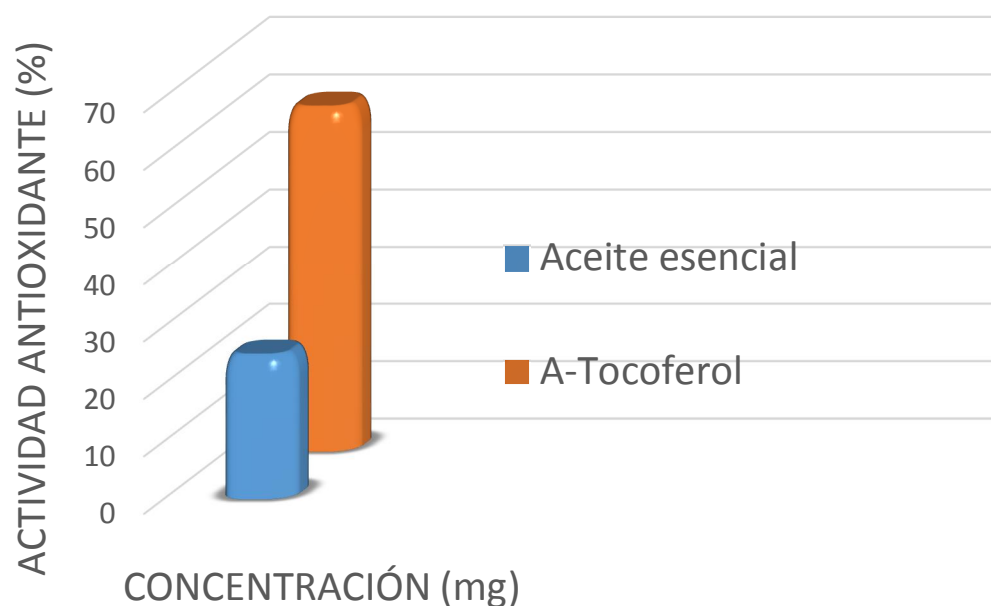
Concentración (mg)	Absorbancia (nm)			Promedio	Actividad Antioxidante (%)
	1x	2x	3x		
0.0078	0.1510	0.1960	0.1770	0.1747	20.4856
0.0155	0.2000	0.1530	0.1810	0.1780	18.9681
0.0620	0.2140	0.1690	0.1770	0.1867	15.0228
0.1250	0.2180	0.1830	0.1680	0.1897	13.6571
0.2500	0.2140	0.1950	0.1780	0.1957	10.9256



Gráfica 5. Perfil de actividad antioxidante del aceite esencial de *C. coronarium* sobre el radical ABTS⁺

2.5.3.3 Decoloración oxidativa de β -Caroteno

El ensayo de la decoloración oxidativa de β -caroteno se realizó bajo la técnica propuesta por **Burda (2001)**. El aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* presento un 25% de actividad antioxidante a la concentración evaluada de 1mg/ml. Se utilizó como control positivo la vitamina E o α -Tocoferol, la cual presento un 60% de actividad antioxidante por esta técnica. Contrario a lo observado en las 2 técnicas antirradicalarias, en la decoloracion oxidativa del β -caroteno, el aceite no presento actividad significativa comparada con el control, se requerirían de concentraciones más altas para poder mejorar la actividad. Es importante destacar el hecho de que esta prueba antioxidante presenta un mecanismo de acción muy distinto al de las técnicas antirradicalarias, lo cual nos permite pensar en la posibilidad de que los constituyentes químicos del aceite esencial presenten mayor afinidad para intervenir en un mecanismo antirradicalario.



Gráfica 6. Actividad antioxidante del aceite esencial de *C. coronarium* y α .tocoferol



CONCLUSIONES

Como resultado final de este proyecto de tesis se obtienen las siguientes conclusiones:

- ❖ De las flores de *Chrysanthemum coronarium* se obtuvo un **aceite esencial** con las siguientes características: color azul intenso, olor desagradable, rendimiento de 0.134 %, densidad relativa de 0.755 g/mL y un índice de refracción de 1.658.
- ❖ Mediante un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/MS), se caracterizaron once metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium*, mostrándose como mayoritarios el **2,6,6-trimetil-2-Ciclohexeno-1-metanol (23.392%)**, **santolina trieno (14.495%)**, **(Z)- β -farneseno (9.676%)**, **β -mirceno (6.461%)** y **trans-tonghaosu (8.705%)**.
- ❖ Otro metabolito secundario bioactivo identificado y característico del género *Chrysanthemum sp.* fue el **Acetato de trans-crisantenilo**, el cual se encontró en una concentración de 4.077 %. Su identificación se confirmó con el índice de retención calculado de 1282.3 y fue comparado con los resultados de la base de datos NIST (National Institute of Standards and Technology).
- ❖ Del bioensayo acaricida en el que se utilizó a *Tetranychus urticae* como modelo biológico, se determinó que las concentraciones más activas del aceite esencial fueron las del **10 % y 5 %** en donde se observó una mortalidad de la población ácaros del **100 y 99 %** respectivamente.
- ❖ En el análisis de la actividad antifúngica, no se observó una efecto biológicamente relevante por parte de las diferentes concentraciones utilizadas del aceite esencial, en este caso se utilizó como control positivo al fungicida conocido como Benomilo.

- ❖ En la evaluación antioxidante, se determinó que el aceite esencial de *C. coronarium* no presenta buen potencial de inhibición oxidativa del sustrato natural β -caroteno.
- ❖ En las determinaciones de la reducción química de los radicales ABTS y DPPH, se observó relativamente una buena actividad del aceite esencial, con concentraciones efectivas (CE_{50}) de **31.534 $\mu\text{g/mL}$ y 15.5 $\mu\text{g/mL}$** respectivamente, comparado con los controles antioxidantes ya conocidos.



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. M. El-Sayed. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semi chemicals. Hort Research, Lincoln, New Zealand: [<http://www.pherobase.com>]
2. Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, V. An approach to the genus *Tanacetum* L. (Compositae): Phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research* 9, 79-92. 1995.
3. Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Eco. Entomol*; 18: 265-267. 1995
4. Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi-Goltapeh E, Zare R and Phillips AJL. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.
5. Acosta, L., Granda, M., Sánchez, E., Martín, G., Rodríguez, E. Variation in the content of essential oil and (-)- α -bisabolol in chamomile (*Matricaria recutita*) harvest of head flowers at different stages of development. *Revista: Plantas Medicinales* 9, 25-32. 1989.
6. Addor, R.W. *Insecticides* C.R.A. Godfrey (Ed.), *Agrochemicals from Natural Products*, Marcel Dekker, New York. pp. 1–63. (1995)
7. Álvarez, MG. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 169 p. 1976.
8. Álvarez-Castellanos, P.P., Bishop, C.D., Pascual-Villalobos, M.J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry* 57, 99–102. 2001.
9. Alvidrez-Villarreal R, Hernández-Castillo FD, García-Martínez O, Mendoza-Villarreal R, Rodríguez-Herrera R y Aguilar CN. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. *Agricultural Sciences* 3:405-416. 2012.
10. Badii, M.H., Landeros, J. and Cerna, E. Regulación poblacional de ácaros plaga de impacto agrícola. *Daena Int J Good Conscienc* 5:270-302. 2011.
11. Bandoni, A. y otros tres autores, ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?, *BLACPMA*, 8(5), 317-22 (2009).
12. Basta, A., Couladis. M., Tzakou, O. "Essential oil composition of the flowerheads of *Chrysanthemum coronarium* L. from Greece". *Flavour and Fragrance Journal*. 22: 197-200. 2007.
13. Basta, A., Pavlović, M., Couladis, M., Tzakou, O. Essential oil composition of the flower headsof *Chrysanthemum coronarium* L. from Greece. *Flavour Frag. J.* 22,197–200. 2007.
14. Becerra L. Enfermedades del cultivo de mango. Pág. 83- 101. In: Mata B, Mosqueda V (eds.) *La producción de mango en México*. Editorial Limusa. México. 159 p. 1995.

15. Bello, A., Estudios de aceites esenciales de especie Myrtaceae de la flora de Pinar del Río. Tesis de Maestría, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad del rio, Rio, Brasil (1999).
16. Bishop, C.D., Thornton, I, B. Evaluation of the antifungal activity of the essential oil of *Monard citriodora* var. citriodora and *Melaleuca alternifolia* on post-harvest pathogens. Journal of Essential Oil Research, 9, pp. 77–82. 1996.
17. Bojórquez RG. Efectos Genotóxicos de Azinfos Metílico y OxidemetonMetil: Insecticidas de Amplio Uso en Baja California. (Tesis Maestría) Universidad Autónoma de Baja California. 1994.
18. Borembaum, M.R.1989. "What is synergy? " Pharmacological. Review 41: 93-141
19. Bowers, W., Aregullin, M. Discovery and identification of an antijvenil hormone from *Chrysanthemum coronarium*. Department of entomology, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721. USA. 1987.
20. Burt, S.A., Antibacterial activity of essential oil: potential applications in food, PhD thesis, Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health, Utrecht University, Utrecht, Netherlands (2007).
21. Canales CR. Tecnología para la producción temprana de mango. 1 ed. Comité Editorial del Campo Experimental Edzna. 12 p. 1998.
22. Canales, C.R. Control de la necrosis en frutos de marañón *Anacardium occidentale* en la península de Yucatán. Reporte anual de investigación e innovación tecnológica INIFAP. [http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias_agricolas.php]. 2007.
23. Chuda, Y., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T., Tsushida, T. Structural identification of two antioxidant quinic acid derivates from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). J. Agric. Food Chem. 44, 2037–2039. 1996.
24. Combariza, M. y otros tres autores, Limonene concentration in lemon (*Citrus volkameriana*) peel oil as a function of ripeness, Journal of High Resolution Chromatography, 17(9), 643 – 646 (2005).
25. Curtis, C., Barnes, K.M., Smalley, P.P., Kirk, K. Kindscher, Hillary L. y Douglas M.S. 2003- "Characterization of an antituberculosis resin glycoside from the prairie medicinal plant *Ipomea leptophylla*. Journal of Natural Products 66(11): 1457-1462
26. D'Urso, G., Avondo, M., Biondi, L. Effect of supplementary feeding on grazing behaviour of Comisana ewes in a Mediterranean semi-extensive production system. Anim. Feed Sci. Technol. 42, 259–272. 1993.
27. Elbert A., Naven, R., Cahill, M., Devonshire, A, L., Scarr, A.W., Sone, S., y Steffens. R. Resistance management with chlrrronicotinyl insecticides using imidacloprid as example. Pflanzens- chutz-Nachrichten. Bayer. 270. 49: 5-54. 1996.
28. Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I.; Bighelli, A.; Castola, V.; Casanova, J. GC/MS and ¹³C-NMR of the essential oil from leaves, branches and female cones of *Cupressus arizonica* from Italy. J. Essent. Oil Res. 2003.

29. FLEXNER, et al., Experimental evaluation of resistance management for twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on Southern Oregon pear: 1987- 1993. *Journal of Economic Entomology*. 88:1517-1524, 1995.
30. Follett, J.M. Mitsuba and Shungiku—two traditional Japanese vegetables. *Horticulture in New Zealand* 2, 22–25. 1990.
31. Gobierno del Estado de Baja California. Plan Estatal de Desarrollo 2008-2013.
32. Godfrey, L. D. Pest Notes: Spider Mites. Integrated Pest Management for Home Gardeners and Landscape Professionals. UC ANR Publication 7405. 1-4 pp. 2011.
33. Hernández FLM, Gómez JR y Andrés AJ. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. *Campo Experimental Santiago Ixcuintla*, INIFAP. Libro Técnico No. 1. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 87 p. 2013.
34. Hernández M, Rafael., Gally J, Mireya. "Plantas medicinales. Uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en América latina". Ed. Pax México. 1981. 254 pág.
35. Hernández, A.M. "Caracterización cualitativa de frutos de rambután (*Nephelium lappaceum* L.) almacenamiento post-cosecha y patógenos asociados". Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 50 p. 2010.
36. Ho, C.C. Spider mite problems and control in Taiwan. *Exp. Appl. Acarol.*, 24. pp. 453–462. 2000.
37. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2007
38. Kameoka, Kitagawa & Husebe. H. Kameoka, C. Kitagawa, Y. Husebe. The constituents of the steam volatile oil from *Chrysanthemum coronarium* L. var *spatiosum*. *Journal of Agricultural Chemical Society of Japan*, 49 (1975), pp. 625–627. 1975
39. Kaneko, H., Naruto, S., Takahashi, S. Sesquiterpenes of *Achillea subrica*. *Phytochemistry* 10, 3305-3306. 1971.
40. KHERADPIR, N., et al., The comparasion of Demographic Traits in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on Five Different Greenhouse Cucumber Hybrids (*Cucumis sativus*). *Acta Horticulturae*. 747: 425- 429, 2007.
41. Knobloch, K., Pauli, A., Iberi, B., Weis, N., Weigand, H. Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests. In: Schreier, P. (Ed.), *Bioflavor 87: Analysis, Biochemistry, Biotechnology* (Proceedings of the International Conference, 29–30 September 1987), Würzburg, Germany, Walter de Gruyter, Berlin, pp. 287–299. 1987.
42. Koppert México. En línea. Arañas rojas. [http://koppert.com.mx/pdf/f_arana_roja.pdf]. 2013
43. Macke, E., Magalhaes, S., Khan, H.D.T., Luciano, A., Frantz, A., Facon, B. and Olivieri, I. Sex allocation in haplodiploids is mediated by egg size: evidence in the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proc Royal Soc Biol Sci* 278:1054-1063. 2011.
44. Madsen, H. & Bertelsen, G., Spices as antioxidants, *Trends in food science & technology*, 6(8), 271-277 (1995).

45. Martínez SC. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado de cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados. Montecillo, Estado de México. 88 p. 2010.
46. Martínez-Ferrer, M.T., Jacas, J.A., Ripollés-Moles, J.L. and Aucejo-Romero, S. 2006. Approaches for sampling the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on Clementines in Spain. *J Econ Entomol* 99:1490-1499. 2006.
47. Miresmailli, S., Isman, M.B. Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on greenhouse tomato. *J. Econ. Entomol.*, 99, pp. 2015–2023, 2006.
48. Moller, K.S.J., Lindberg, M.H., Aaltonen, T., Skibsted, L.H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chem.* 64, 215–219. 1999.
49. Moraes, G.J. and Flechtmann, C.H.W. Manual de Acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Holos Editora, Ribeirão Preto. 2008.
50. Mosqueda VR, De los Santos RF, Becerra LEN, Cabrera M, Ortega ZDA y del Ángel PAL. Manual para cultivar mango en la planicie costera del Golfo de México. Campo Experimental Cotaxtla. INIFAP-CIRGOC. Folleto Técnico No. 15. Veracruz, México. 130 p. 1996.
51. Ochoa-Ascencio S, Vázquez M y Farías R. Identificación genético molecular de hongos asociados a la pudrición peduncular del fruto de aguacate en Michoacán, México. Memorias X Congreso Internacional/ XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Abs. 2007.
52. Pantoja, G. L.E. Productos naturales de *Ipomea pausiflora* con actividad Biológica sobre Insectos (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Biotecnología. 2010
53. Park, Y.L. and Lee, J.H. Leaf cell and tissue damage of cucumber caused by twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *J Econ Entomol* 95:952-957. 2002.
54. Pérez, M.P., Pascual-Villalobos, M.J. Efectos del aceite esencial de inflorescencias de *Chrysanthemum coronarium* L. en mosca blanca y plagas de almacén. Estación sericícola. Consejería del medio ambiente, Agricultura y Agua. CIDA. La Alberca, Murcia. 1999.
55. Picman, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones *Biochemical Systematics and Ecology*, 14. pp. 255–285. 1986.
56. Raworth, D.A. Control of two-spotted spider mite by *Phytoseiulus persimilis*. *J. Asia Pac. Entomol.*, 7 (2001), pp. 5–1, 2001.
57. Sá, A.P. Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Tesis Doctoral. 140 pp. 2012.
58. Sacco, T., Frattini, C., Bicchi, C. Constituents of essential oil of *Artemisia arborescens*. *Planta Med.* 47, 49-51. 1983.
59. Sánchez, T. "Contaminación del suelo y lucha biológica". 2002

60. Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas JS, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M, y Silva-Rojas HV. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47:61-73. 2013.
61. Sebastián, B., Urzúa, A.M., Vines, M. Analysis of surface and volatile compounds of flower heads of introduced plants of *Chrysanthemum coronarium* L. growing wild in Chile. *Flavour Frag. J.* 21, 783–785. 2006.
62. Segura Munguía, Santiago. "Historia de las plantas en el mundo antiguo". Bilbao, Universidad de Deusto; Madrid; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2009. 478 pág.
63. Senatore F, Rigano D, De Fusco R, Bruno M. *Flavour Frag. J.* 19: 149–152. 2004
64. Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD and Wingfield MJ. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycological* 96:83-101. 2004.
65. Soto Nieto, R.M., Juárez, B.I y Jasso, Y. Evaluación insecticida de *Parthenium incanum* y de *Zinnia* spp. en *Sitophilus zeamais*. Memorias del VI Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Acapulco, Guerrero, México. 2000.
66. Stoll, G. Protección Natural de Cultivos en zonas tropicales. J. Margaf Ed. 1989
67. Sulas, L., Caredda, S., Introduzione in coltura di nuove specie foraggere: produttività e composizione bromatologica di *Chrysanthemum coronarium* L. (crisantemo) sottoposto a pascolamento simulato. *Riv. diagron.* 31, 1019–1026. 1997.
68. Tada, M. Chiba, K. "Novel plant growth inhibitors and an insect antifeedant from *Chrysanthemum coronarium* (Japanese Name: Shungiku)" *Agric. Biol. Chem.*, 48 (5), 1367-1369, 1984.
69. Takafuji, A., Ozawa, A., Nemoto, H., Gotoh, T. Spider mites of Japan: their biology and control. *Exp. Appl. Acarol.*, 24, pp. 319–335, 2000.
70. Tucuch CFM, Palacios PA, Ku NR y Guzmán EC. Manejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. Campo Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Técnico. Campeche, Camp., México. 33-34p. 2005.
71. Universidad Autónoma de Morelos. 95 p.
72. Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, Guevara J and Gubler WD. Identification and pathogenicity of *Lasioidiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92:519-529. 2008.
73. Varela FSE, Orozco SM, Torres ARI y Silva AGL. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428 p. 2013.
74. Villaseñor et al. Patrones geográficos de la flora sinantrópica de México. Instituto de Biología UNAM. Departamento de botánica. 1998.

75. Waterhouse D., Carman W.J., Schottenfeld D., Gridley G., MacLean S. Cancer, 1996, 77, 763-770.
76. Zhang, Z. Mites of greenhouses: identification, biology and control, CABI Publishing, Wallingford, pp. 54–56. 2003.



APÉNDICE

INSTRUMENTACIÓN

❖ CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a masas Agilent Technologies 7890A / 5975C, con una columna capilar de 30m × 0.25 mm × 0.25 μm utilizando un volumen de inyección 0.5 μL. Se realizó una dilución con gas de 1:2000. La temperatura de columna inició con 70°C marcando una rampa de temperatura de 2°C/min hasta llegar a 100°C., continuando con una rampa de 10°C/min hasta llegar a 250°C. En cuanto al inyector la temperatura de éste fue de 250°C.

Los espectros de masas obtenidos fueron comparados con los proporcionados por la base de datos NIST.

❖ ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA (UV)

Las mediciones de absorbancia de las pruebas antioxidantes se realizaron en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC, modelo Genesys 20, en celdas de cuarzo de 10 mm. Como disolvente se empleó metanol o agua destilada. Los valores de absorbancia (λ) se expresan en nm.

❖ EXTRACCIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

Para esta técnica se adaptó un aparato Clevenger con algunas modificaciones, en el que fueron utilizados un matraz bola de 5 litros, condensador y codos para conexión. Se aplicó calor utilizando parrilla eléctrica; los periodos de extracción fueron de 5 horas.

