



UNIVERSIDAD ABIERTA
Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**GERMINACIÓN *IN VITRO* Y
CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE
COSMOS SULPHUREUS CAV. A PARTIR
DE SEMILLAS.**

ASESORES: DRA. EN F. GABRIELA MARÍA ÁVILA VILLARREAL
DRA. DIANA ELINOS CALDERÓN

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

BLANCA NAYELI CARDONA TORRES

ES1521202370



Agradecimientos.

Con todo el corazón a la **Dra. en F. Gabriela María Ávila Villarreal** por responder a mi solicitud en el momento en el que más lo necesitaba para culminar este viaje, infinitamente agradecida por compartir conmigo sus conocimientos y su experiencia, por ser un modelo a seguir en esta difícil rama, en un mundo colmado de tabús hacia la mujer en la ciencia.

Mi eterno agradecimiento a todo el equipo de la **Unidad Especializada en Calidad de Alimentos y Productos Naturales del Centro Nayarita de Investigación y Transferencia de Tecnología de la Universidad Autónoma de Nayarit**, por acogerme en sus instalaciones y en sus vidas durante un año, por todo el tiempo y apoyo siempre disponible para la realización de este proyecto.

Con admiración y respeto para la **QFB Guadalupe Yáñez Ibarra** por toda la paciencia y apoyo en cada momento en donde las actividades lo requerían.

Con todo mi cariño para **amigos y compañeros** quienes siempre me dieron una palabra de apoyo en los momentos de cansancio y dificultad, sin ustedes esto no sería posible.

¡GRACIAS INFINITAS!



Dedicatoria.

A mis padres, **Estela y Octavio**, porque esto se los debía, porque dedicaron mucho de su tiempo, esfuerzo y amor para hacer de mí, la persona que soy hoy en día, porque a pesar de todo, me alentaron a realizar mi sueño, porque un “no se puede” no estaba permitido. Sin su ayuda en los momentos difíciles esto no sería posible, porque nunca hubo un “no” de su parte para cuidar de mis hijos y poder culminar este viaje, esto es para ustedes.

A mi esposo **Jorge**, por su paciencia y comprensión de que esto era algo importante para mí, por haberme brindado su apoyo, aún más en este último año, en el que casi yo no estaba presente y si lo estaba, lo estaba cansada. Te amo, gracias por no dejarme sola en este viaje.

A mis hijos, **Alinna y Harlem**, que son mi mayor soporte en esta vida, por entender que su mami trabajaba por cumplir un sueño, espero que esto los motive y los aliente a cumplir los suyos. Les agradezco su paciencia y comprensión por los malos momentos, por ver muy cansada a su mami y por las horas que no les dedique a ustedes. ¡Los amo muchísimo nunca lo olviden!

A todos mis amigos, por soportar mis pláticas sobre ciencia, plantas y química. Gracias por estar en mi vida.



Contenido

Tabla de Figuras.	5
Índice de Tablas.	7
Índice de Gráficas.	7
Resumen.	8
1. Justificación.	8
2. Marco teórico.	12
2.1 Antecedentes.	12
2.2 La Fitoterapia.	20
2.3 Metabolitos Secundarios.	22
2.4 La familia Asteraceae.	23
2.5 <i>Cosmos sulphureus</i> Cav.	23
2.6 Compuestos de interés farmacológico en <i>Cosmos sulphureus</i> Cav.	26
2.7 Germinación de <i>Cosmos sulphureus</i> Cav.	29
2.8 Técnicas de Cultivo de células y tejidos <i>in vitro</i>	29
3. Hipótesis.	31
4. Objetivo general.	31
5. Objetivos específicos.	31
6. Metodología.	32
6.1 Ubicación del estudio.	32
6.2 Recolección del material vegetal.	32
6.3 Identificación del material vegetal.	32
6.4 Cultivo de semillas <i>in vitro</i>	33
6.5 Obtención de los extractos de las semillas de <i>Cosmos sulphureus</i> Cav. de dos colectas diferentes.	34

6.6 Obtención del extracto y análisis cromatográfico de la parte aérea de <i>Cosmos sulphureus</i> Cav.	35
7. Diagrama del diseño experimental general.	36
8. Resultados.	37
8.1 El mejor tratamiento de desinfección fue NaClO al 5%.....	37
8.2 El porcentaje ideal del medio de cultivo fue Murashige & Skoog adicionado con 30 g/L de sacarosa y gelzan al 50%.....	40
8.3 Germinación de 49 semillas <i>in vitro</i> y desarrollo de 14 plántulas.....	43
8.4 Identificación semejante de compuestos mayoritarios en las semillas de las colectas 2017 y 2018.	47
8.5 Ensayo de identidad comparativa y caracterización fitoquímica semejante para el extracto de la planta <i>in vitro</i> vs el extracto de la planta silvestre, colecta 2017.	48
9. Discusión.....	51
10. Conclusiones.....	53
11. Bibliografía.	54

Tabla de Figuras.

Figura 1. “Códice Martín de la Cruz-Badiano (1552)”.....	18
Figura 2. Taxonomía de <i>Cosmos sulphureus</i> Cav.	24
Figura 3. Orange Cosmos (<i>Cosmos sulphureus</i> Cav.).....	25
Figura 4. Estructura del Sulfuretin 6-O-β-d-Glucoside en <i>Cosmos sulphureus</i> Cav.	28
Figura 5. Terpenos encontrados en hojas de <i>Cosmos sulphureus</i> Cav.	29
Figura 6. Diagrama general del cultivo <i>in vitro</i>	34
Figura 7. Diagrama del diseño experimental general.	36

Figura 8. Contaminación por hongos en el cultivo in vitro de semillas, colecta 2018.	38
Figura 9. a) Semillas colectadas de plantas silvestres. b) Semillas colocadas en frascos para germinación in vitro. c) Aspecto de los brotes generados en los cultivos. d) Desarrollo de plántulas en cultivo. e) Aspecto de un callo fuera del frasco, con tres brotes	39
Figura 10. Plántula de <i>Cosmos sulphureus</i> Cav. en proceso de rusticación sin la cubierta de film de polietileno, a) Vista lateral de la plántula, b) Vista aérea de la plántula.....	44
Figura 11. Plántulas con visible oxidación durante la etapa de rusticación, a) Plántula de 6 cm de altura con oxidación del 100%, b) Plántula de 4 cm de altura con oxidación del 100%.	45
Figura 12. a) Ccs4a en lavado con agua destilada, antes de iniciar la rusticación, se identifican sus raíces entrelazadas (flecha roja) en forma circular. b) Ccs4a en rusticación durante la semana 13 de crecimiento, presenta 18 cm de altura desde la base.	46
Figura 13. Ccs4a trasplantada a maceta de barro, finalizando así su etapa de rusticación.	46
Figura 14. Se muestran las fases móviles que tuvieron mejor elución, proporción e identificación de compuestos por onda corta, larga y revelado con ácido sulfúrico al 10%.	47
Figura 15. Ensayo de identidad y perfil fitoquímico del extracto Ccs y Csm, analizados por cromatografía en capa fina, a) Cromatoplaque fase normal diluida en fase móvil de Acetato de Etilo / Metanol, 9:1 y b) Cromatoplaque fase reversa diluida en Metanol 100%.	48
Figura 16. Ensayo comparativo, par de disolventes. a) extracto acuoso, b) extracto con acetato. Cs11 = acuoso, Cs12= acetato.....	49
Figura 17. Ensayo comparativo, par de disolventes. c) extracto de hexano, d) extracto de cloroformo y e) extracto de butanol. Cs13= hexano, Cs14= cloroformo y Cs15= butanol.	50

Figura 18. Ensayo comparativo, par de disolventes contra los extractos de la Planta silvestre y la Planta in vitro. 51

Índice de Tablas.

Tabla 1. Literatura sobre la actividad biológica en *Cosmos sulphureus* Cav. Modificado de Onanong *et al.*, 2011..... 26

Tabla 2. Respuesta a los diferentes porcentajes de hipoclorito de sodio activo en cada uno de los tratamientos de desinfección de semillas. - = no se realizó. 37

Tabla 3. Porcentaje de germinación y vigor de semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. en diferente porcentaje de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS). 41

Tabla 4. Prueba t-student de muestras independientes en la variable IVG a los 15 días con 95% de intervalo de confianza. 42

Tabla 5. Respuestas y porcentajes de germinación promedio generados por las semillas en los medios de cultivo propuestos. B= formación de brotes, C= formación de callos, R= formación de raíces, -= sin cambio..... 43

Tabla 6. Peso y rendimiento total de los extractos obtenidos..... 47

Tabla 7. Rendimiento obtenido de los extractos de C_{ss} y C_{sm}. 49

Índice de Gráficas.

Gráfica 1. Índice de velocidad de germinación de semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. en función de los días de observación y según medios de cultivo. 40



Resumen.

Cosmos sulphureus Cav. es una planta originaria de América central y ampliamente distribuida en México, posee propiedades medicinales como antioxidante, antidiabético y contra la malaria. La producción de los metabolitos secundarios responsables de esta actividad puede variar debido a factores ambientales, fisiológicos, bioquímicos y genéticos. Se diseñó un protocolo de germinación *in vitro* que permitió evaluar la producción de estos metabolitos en condiciones controladas, se evaluaron tres tratamientos de desinfección de semillas, donde además de los métodos convencionales e inmersión en etanol al 70%, se utilizaron NaCl activo al 1.5, 2.5 y 5% en un diseño establecido para 72 semillas con una sola repetición por tratamiento. Las variables porcentaje de semillas germinadas (PG) e índice de velocidad de germinación (IVG) fueron evaluados 15 días posterior a la siembra. También se evaluó el porcentaje ideal del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS). Los resultados señalan que el mejor tratamiento de desinfección fue NaCl activo al 5%, el cual arrojó 0% de contaminación. El porcentaje ideal de medio de cultivo fue MS al 50% ya que los resultados no tuvieron diferencias significativas contra MS al 100%. Se obtuvo un IVG de 4.23 semillas por día y el 34.72% de germinación. Se analizaron los extractos de la parte aérea de las plantas germinadas al finalizar su proceso de rusticación mediante cromatografía en capa fina, comparando contra el extracto de una planta silvestre, obteniendo como resultado una presencia de compuestos mayoritarios idénticos en ambos, por lo que esta propuesta de germinación *in vitro* representa una estrategia para la producción masiva y obtención de los compuestos a los que se les atribuye su actividad farmacológica.

1. Justificación.

Las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como suburbano, donde los servicios de atención médica



son escasos, acentuándose en las poblaciones más alejadas de las cabeceras municipales. Es innegable los siglos de uso empírico que avalan en la mayoría de los casos, los recursos vegetales utilizados como medicinales (Osuna *et al.*, 2005), sin embargo, es necesario aplicar el método científico de manera interdisciplinaria para el estudio de las plantas que actualmente están siendo utilizadas como medicinales, abordando aspectos como la caracterización fitoquímica (Mata, 1993), ya que el método científico es preciso, crítico, objetivo, racional, comunicable y es la forma de obtener conocimiento más elevada que puede aplicar el ser humano (Álvarez, 1996), para ello, la ciencia moderna analiza y estudia los efectos terapéuticos de las plantas, para precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, y conocer los efectos activos responsables de aliviar o curar enfermedades, determinando sus estructuras químicas, su síntesis y para proponer modificaciones estructurales en la búsqueda de una mayor actividad (Cuadrado, 2004). La comprobación científica resulta muy importante ya que, de no tenerlo, el valor terapéutico de estas plantas simplemente no existe, y no se conocen sus componentes químicos responsables de la supuesta acción farmacológica. Por lo cual, el análisis de las plantas utilizadas en la medicina tradicional permitirá comprobar si efectivamente tienen un valor terapéutico, caracterizar el o los compuestos responsables de esa actividad y justificar su mecanismo de acción (Cruz, 2002).

Durante siglos la medicina tradicional ha utilizado plantas medicinales y aromáticas en la prevención y tratamiento de numerosas enfermedades, por lo que en la actualidad, la capacidad que tienen estas plantas para producir gran variedad de sustancias con características especiales ha llamado la atención de industrias farmacológicas, cosméticas y alimenticias, lo que ha provocado la necesidad de intensificar el cultivo de plantas medicinales y aromáticas buscando altos índices de producción a bajos costos (Bedoya *et al.*, 2016).

El interés de los medicamentos de origen vegetal es debido a que la medicina convencional puede ser ineficiente, debido al abuso o uso incorrecto de ésta,



originando efectos secundarios y resistencia, además de que un gran porcentaje de la población mundial, no tiene acceso al tratamiento convencional, mientras que la medicina tradicional y los conocimientos etnobotánicos sugieren que estos productos no son inofensivos. Sin embargo; el uso de estas sustancias no se encuentra siempre autorizadas por autoridades legales, debido a que los productos fitomedicinales son distribuidos comercialmente sin control de calidad en su producción, lo que tiene repercusión en su eficacia (Rates, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la fitoterapia en sus programas de salud y sugiere procedimientos básicos para la validación de medicamentos de origen vegetal dentro de su desarrollo (Vulto *et al.*, 1998), incluso países asiáticos como China y la India, cuentan con su industria de plantas medicinales bien establecida (Gruenwald, 1997). En Estados Unidos de América, los productos fitomedicinales han logrado contar con la supervisión de la Food and Drug Administration o FDA, organismo que regula los medicamentos de patente (Rates, 2001). En los países latinoamericanos se están invirtiendo en programas de investigación de plantas medicinales por medio de estandarización y regulación de los productos fitomedicinales, siguiendo el ejemplo de países europeos como Francia y Alemania, siendo este último el que vende el 50% de los productos fitomedicinales con prescripción médica, y el costo es cubierto incluso por las compañías de seguros (Gruenwald, 1997).

Por lo que resulta de gran importancia el reconocimiento de la investigación sobre las plantas medicinales usadas en la medicina tradicional, aunado a la carencia de falta de mercado farmacéutico, lo cual origina un satisfactorio acercamiento para el desarrollo de nuevos fármacos, reflejándose en un incremento en el número de publicaciones en este campo, además de que las instituciones gubernamentales y privadas alrededor del mundo se interesan y son las que apoyan financieramente programas de investigación en este rubro (Calixto, 1996).

Durante todo el siglo XIX y los primeros 60 años del siglo pasado, la investigación científica de la flora mexicana se realizó sin atender adecuadamente su uso médico



tradicional. En México, los especialistas en la medicina tradicional representan la única alternativa médica para más de 40 millones de mexicanos que no tienen acceso a los diferentes centros de salud (Osuna *et al.*, 2005).

En nuestro país, el conocimiento sobre las propiedades curativas de las plantas es utilizado permanentemente entre las poblaciones indígenas, y las plantas medicinales constituyen el recurso más grande y valioso de la Medicina Tradicional Mexicana (Lozoya, 1976). En el ámbito nacional, el interés científico y médico en relación con el estudio de la Medicina Tradicional y de las plantas medicinales, también se ha incrementado recientemente. Aunado a esto, se encuentra la situación provocada por la crisis económica del país, donde los costos de medicamentos de patente son cada vez más caros, llevando con esto a la convicción de que los recursos vegetales del país deben ser estudiados, para de esta manera afrontar las carencias y costos de los medicamentos. En los herbarios de nuestro país, existen una gran cantidad de plantas registradas y clasificadas taxonómicamente, donde además se ha tomado en cuenta el conocimiento popular, y se ha interrogado en forma programada sobre su uso a curanderos, chamanes y hierberos. Sin embargo, aún existe un gran número de plantas que, a pesar de su uso popular, no se encuentran incluidas en dichos acervos (Cruz, 2002).

La planta de *Cosmos sulphureus* Cav. es originaria de América central y ampliamente distribuida en México, es utilizada por las personas para combatir efectos de piquetes de alacrán, aftas, angina, como digitálico (aumenta la fuerza de la contracción cardíaca) y para la curación de llagas en la boca (Fernández *et al.*, 1998) además; ha sido identificada con propiedades medicinales como antioxidante, antidiabética y contra la malaria (Lim, 2014), por lo que representa una especie de interés farmacológico en la actualidad. Es una especie importante para la ecología ya que sus flores atraen aves y mariposas de diversas especies como la mariposa monarca (CONABIO, 2009) y a pesar de que los datos más recientes la posicionan como uno de los taxón con mayor área de ocupación (AOO) en México al arrojar 3,048 km² y un área estimada de presencia (EOO) de 1, 219,367 km² (Vargas *et al.*,



2013) se puede concluir que su (AOO) brinda el material biológico suficiente para su explotación e incluso aún más su (EOO) que se encuentra por arriba del millón de kilómetros cuadrados.

Sin embargo; se han identificado especies en peligro de extinción o peligro crítico por su excesiva recolección insustentable y a la pérdida de hábitats causados por el hombre, como ejemplo se puede identificar que en la India existen 44 especies de plantas medicinales en peligro de extinción, como es el caso de la planta endémica *Aconitum chasmanthum*, sus raíces y tubérculos contienen alcaloides que son utilizados en la medicina ayurvédica y homeopática, por lo que es recolectada en grandes cantidades (UICN, 2015).

De acuerdo a diversos análisis y artículos científicos sobre la actividad biológica de *Cosmos sulphureus* Cav. se identificó que presenta actividad contra la ictericia, fiebre intermitente, esplenomegalia y también actividad antiinflamatoria, antigenotóxica y antimicrobiana (Rasdi *et al.*, 2010).

Para ello, el cultivo de tejidos vegetales es una excelente vía para incrementar rápidamente el número de individuos, lo cual representa un gran valor no sólo para la investigación, sino también para preservar la especie (Calderón *et al.*, 1993), para este efecto la germinación *in vitro* permite altas tasas de multiplicación en un corto tiempo y facilita el control de organismos patógenos (Sánchez *et al.*, 2004).

2. Marco teórico.

2.1 Antecedentes.

La utilización de plantas medicinales ha retomado especial importancia bajo el enfoque de una nueva biotecnología que augura revolucionar el mundo de los medicamentos provenientes de las plantas (Wagner *et al.*, 1985). Este renacimiento se acompaña también con el descubrimiento de propiedades curativas y conceptos farmacodinámicos novedosos, reincorporando muchos recursos vegetales que fueron vistos en el campo farmacéutico del pasado (Famsworth *et al.*, 1985).



El uso de plantas con fines medicinales forma parte de la Medicina Tradicional (MT) la cual es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, usados para el mantenimiento de la salud, la prevención, el diagnóstico o la mejora de enfermedades físicas o mentales (OMS, 2018). La medicina tradicional se basa en el conocimiento ambiental local, es adaptiva a los contextos espacio-temporales y sus poseedores son principalmente los pueblos originarios (Chávez *et al.*, 2017). La MT es una necesidad social avalada por la sumatoria de conocimientos de diferentes culturas transmitidos de una generación a otra (Barranco *et al.*, 2013).

Los inicios de la Medicina Tradicional se remontan al origen de las ciencias médicas, las cuales fueron confundidas por una parte por el empirismo y por otra, con la superstición. El empirismo dio nacimiento a la medicina popular, fundamento de la observación rudimentaria de los fenómenos de orden médico, que aún perdura entre los pueblos salvajes. En tanto la superstición, dio lugar a la medicina sacerdotal, que apareció en las primeras edades de todos los pueblos y se explica también por la mayor ilustración de los ministros del culto respecto a una masa popular ignorante. Los inicios de las ciencias médicas en Grecia, se dieron con carácter mitológico personificado, primero en Apolo y después en Esculapio y su hijo. Atribuyendo las ciencias médicas de Esculapio al centauro Quirón, por algunos poetas. La leyenda afirma que Macaón y Podalirio asistieron a los griegos en el sitio de Troya; por entonces la medicina se limitaba a arrancar flechas, puntas de lanzas, y a controlar hemorragias y aliviar el dolor. Por otra parte, filósofos y matemáticos, como Pitágoras, se ocupaban también de la medicina, fundando algunas escuelas como la de Crotona en la antigua Grecia; así se le atribuye a Demócrito la realización de un tratado acerca de la rabia y otro sobre la influencia terapéutica de la música. Iniciado el siglo V a.C., la visión de Hipócrates reveló un poderoso genio que iluminó toda una época. El criterio racional y natural del llamado “Padre de la medicina”, se manifestó en su observación clínica de la evolución de la enfermedad, con discernimientos muy completos. Entre las causas de las enfermedades se incluyen:



la herencia, el clima, el suelo, las aguas, los vientos y la temperatura. Se le concede gran importancia a la balneación, los ejercicios físicos y la dieta; se describen las sangrías, las escarificaciones y las ventosas, se le atribuye, además; gran importancia al pronóstico, con el establecimiento de reglas generales para este. A Hipócrates se le admira su gran capacidad de observación, que lo lleva a definir, con gran acierto, el proceso de la enfermedad, la cual es considerada como un estado existencial muy similar al de la salud, pues en ambas la naturaleza e muestra como un todo. En las afecciones se producen reacciones que se verifican como salvaguarda de la salud; es decir, “la naturaleza es el médico de las enfermedades”. También, reconoció que el principio de contrariedad era aplicable en la medicina, especialmente para las afecciones resultantes de noxas evidentes, obrando sobre el exterior y considerando siempre la fuerza vital o “*dynamis* actuante” en el ser humano y la relación de similitud de la acción de las drogas con la del proceso patológico. Ofreció el concepto de “*physis*” como fuerza vital que anima y produce todos los estados de existencia en sus diversas variaciones, la fuerza vital conservadora y parte de la naturaleza toda, conceptualizada como diversas energías actuantes en forma concurrente, en la reacción de la totalidad del cuerpo humano y de la enfermedad como un proceso encaminado a eliminar el desequilibrio y volver a la salud. Hipócrates es, indudablemente, el genio de la medicina naturalista (Pascual *et al.*, 2014).

Durante el antiguo Egipto, hace 4000 años, ya contaban con médicos especializados a su servicio, desde dentistas hasta oculistas, que combinaban sus conocimientos fisiológicos con las invocaciones mágicas. Uno de los pilares en los que se asentaba la noción de enfermedad y curación en Egipto era el mito. Algunos dioses se ocupaban de un órgano concreto. El remedio se imploraba mediante rezos y cánticos, y la súplica del médico ante la divinidad constituía el preámbulo de un tratamiento. A veces, el sanador buscaba la protección de la magia para esquivar el mal. Gracias al conocimiento del nombre secreto del mal, y mediante la intervención ante la divinidad, se lograba rechazar los elementos productores del desorden físico o psíquico. El recitado de las plegarias escritas o su impregnación por el agua lustral



producían el mismo efecto terapéutico y benéfico. El médico, recurría a la ciencia y le añadía elementos rituales desde invocaciones mágicas hasta el empleo de talismanes o amuletos para lograr la curación. En Egipto convivían sin estridencias el tratamiento farmacológico con el rito y la plegaria mágica, complementándose mutuamente, como la invocación al dios Horus y Atum, el ritual se efectuaba sobre el mineral de cobre malaquita, la miel y una planta de la familia del papiro. El médico era experto en la preparación de drogas, para lo que empleaba sustancias de procedencia variopinta que la tradición había consagrado por su eficacia, y las dosificaba de forma muy precisa, como la leche de mujer como ingrediente, el cual se utilizaba en enemas. Se desconoce si existían escuelas de medicina, aunque lo más probable es que los conocimientos se transmitiesen de padre a hijo, como el resto de los oficios (Nunn, 2002).

De acuerdo a datos documentados, se sabe que la Medicina Tradicional ya habría surgido en China hace unos 3000 años y su origen se encuentra en la misma área de nacimiento y desarrollo de la Nación China: la cuenca del río amarillo. En los rasgos primitivos de la escritura China, grabados en huesos de animales o en caparazones de tortuga, descubiertos en la dinastía Han, había anotaciones sobre la medicina, la asistencia médica y la sanidad pública, incluso referencias a más de 10 tipos de enfermedades, sus síntomas y su tratamiento. La etnia de los han, más que ninguna otra, fue quien forjó, a través de milenarias experiencias y de formulaciones teóricas, lo que se conoce hoy en el mundo como Medicina Tradicional China. Para el año 1000 a.C. ya existía en China un cuerpo de doctores que seguía unos métodos para el tratamiento de las enfermedades. En el siglo V a.C., se escribió el Canón de Medicina Interna, en el que se describían numerosas enfermedades, su diagnóstico y tratamiento. Durante los siglos siguientes su desarrollo fue rápido, apareciendo numerosos médicos famosos por todo el país y a partir del siglo X d.C se sistematiza como una ciencia médica más avanzada y completa, valiéndose de diferentes herramientas terapéuticas como la Acupuntura, Moxabustión, Masaje, Fitoterapia y Qigong (Reyes, 2008).



Sin embargo; es con la sabiduría de los griegos que de manera concreta empiezan a difundirse en el mundo occidental, los usos medicinales de determinadas plantas curativas.

En Mesoamérica, durante el periodo clásico (250 a 900 d.C.), surge para los Mayas, la medicina, la cual estaba sustentada en el sistema filosófico de concebir al mundo, la vida y el hombre. Ellos tenían, un ordenamiento y un sistema real de atención al hombre y problemática. Su sustento ideológico estaba basado en el concepto de la energía y la integridad. El hombre relacionado y útil. Asimismo, estaba basado en la comprensión de las dos fuerzas, los tres impulsos y su desarmonía energética en el organismo donde confluyen caminos, fuerzas y centros energéticos unidos. Comprendían de ese modo al hombre, la enfermedad individual y colectiva, epidemias y otros lastres naturales. La clínica, se basaba en métodos de observación, percepción y reflexión. De esa manera, comprendieron a los enfermos y sus patologías. Con sus causas y determinaciones. El diagnóstico estaba sustentado en el diálogo la observación, la palpación energética, la reflexión y la inspiración, asimismo, hay glifos que muestran la vara y técnicas radiestésicas de captación de energía y comunicación vibracional. Su terapéutica se fundamentaba más en la mente y el espíritu a través de lograr la armonía de la energía, y hacer llegar lo que se estaba perdiendo o fluir aquello que era negativo. Parece ser, que la mente y el espíritu formaban parte importante de las terapéuticas, para poder integrar más al hombre con su misión y su existencia. Hacían limpiezas energéticas y meditaciones, pedían y daban, recibían y liberaban. Su terapéutica se basaba principalmente en las leyes de la naturaleza, la vida y el hombre. Usaban recursos de la naturaleza para su sanación. Agua, aire, plantas medicinales, hongos, masajes, vapores, y en la parte más sensacional usaban espinas y objetos punzantes. Comprendían que sol-planta-hombre, es la trilogía de la vida humana, lo que en la actualidad es comprender la dinámica del movimiento subatómico y comprender la dinámica molecular de la vida y su desarrollo. Sobre todo, comprender que el sol llega a las plantas y elabora procesos de fotosíntesis, produciendo la energía necesaria para crecer y reproducirse. Ese hecho, significaba



para los Mayas, no solamente la manera como las plantas existían, sino también la manera cómo podrían alimentarse de energía a través de la trilogía de la vida. Siendo así, sabían que las plantas tenían poderes también extraterrenales; es decir, capaces de regular desórdenes energéticos en los hombres. Una maravillosa concepción de porque las plantas curan, sabiéndolas utilizar adecuadamente como terapéutica (Espinoza, 1999).

Posteriormente en el periodo postclásico (1325 a 1521 d.C.) se da la llegada de los pueblos aztecas, sus reglas básicas en medicina eran el equilibrio, la moderación y el cumplimiento del deber. Los estados de salud o enfermedad se relacionaban estrechamente con una condición de equilibrio o desequilibrio, respectivamente. Para gozar de salud había que estar en equilibrio en lo físico, en las relaciones sociales y con las deidades. La moderación de la dieta, en el ejercicio y en el comportamiento era un componente esencial de un cuerpo balanceado. El trabajo y el cansancio creaban un desequilibrio de varias maneras, entre ellas porque calentaban en exceso el tonalli de las personas. Los aztecas creían que el cuerpo humano tenía varias fuerzas animistas (almas), cada una con funciones específicas para el crecimiento, el desarrollo y la fisiología del cuerpo, e incluso para su destino después de la muerte. Las tres principales fuerzas animistas eran el tonalli, localizado en la cabeza; el teyolia, en el corazón, y el ihiyotl, en el hígado. La salud del individuo dependía de las cantidades relativas de cada alma en un momento dado, y de la conservación de un equilibrio entre ellas (Ortiz, 1993).

Durante el siglo XVI y con la conquista de los españoles, llega un caudal de conocimientos médicos, como los remedios de origen vegetal, mismos que se combinan en forma integral con las especies nativas usadas en esos tiempos por los tictl o médicos indígenas. Y comienza a fusionarse la herbolaria mexicana con las especies y con los conocimientos traídos del viejo continente. La medicina prehispánica, al igual que la primitiva europea, estuvo íntimamente vinculada a la religión y a la magia de manera que los pueblos mesoamericanos pudieron asociar e identificar cualidades y poderes de plantas, animales y elementos de la naturaleza

a los de las especies vegetales introducidas por los europeos, incluyendo las traídas por naturistas y otros viajeros, las cuales aportaron nuevos conocimientos a la medicina local. Durante la conquista de España a los Aztecas, Hernán Cortés redactaba en algunas de sus “Cartas de Relación” que enviaba al Rey de España, mencionaba como los chamanes y curanderos aztecas habían curado a los españoles de enfermedades que éstos no conocían y también durante la Colonia se registraron los conocimientos indígenas sobre herbolaria y Medicina Tradicional y de ello existe un documento histórico muy valioso llamado: “El Códice Martín de la Cruz-Badiano” (Figura 1), en el cual se registran los medios curativos utilizados por los aztecas antes de la conquista, basado en los conocimientos herbolarios de Martín de la Cruz, un curandero indígena, quien plasmó sus conocimientos en náhuatl, los cuales fueron traducidos al latín por Juan Badiano (Ruíz, 2014).



Figura 1. “Códice Martín de la Cruz-Badiano (1552)”. [En línea] <https://news.artnet.com/exhibitions/relive-battle-between-aztec-king-and-the-spanish-conquistadors-140143>

Este códice es una de las fuentes más importantes desde el punto de vista médico para conocer la herbolaria y la Medicina Tradicional que se practicaba entre los aztecas, pues está ilustrado con figuras a colores de hierbas, flores y árboles



pintados a la manera indígena y facilita un enorme caudal de datos acerca de las plantas medicinales y sus usos, así como también las aplicaciones de las drogas utilizadas terapéuticamente y de donde eran extraídas, pero no solo eso, sino que también tiene enseñanzas sobre ética y moral para los médicos que son comparables a los criterios morales de Hipócrates, también incluye elementos mágicos, poniendo de manifiesto que la mente manda sobre el cuerpo y que la sugestión y otros mecanismos psicológicos forman parte muy importante del proceso salud-enfermedad y son esenciales para la curación, desde el punto de vista del paciente (Ruíz, 2014).

Durante el siglo XVIII llegaron a la Nueva España (México), dos expediciones científicas españolas dirigidas, respectivamente, por el naturalista Martín Sessé y por Alessandro Malaspina de Mulazzo, marino italiano al servicio del gobierno español. Estas recolectaron un valioso material que se trasladó a Madrid en 1820. Hacia finales del siglo XVIII, fray Juan Navarro dibujó y describió numerosas plantas medicinales mexicanas en el quinto tomo de su “Jardín Americano”. En las postrimerías de la época colonial, salieron a la luz las obras fundamentales de Von Humboldt y Bonpland acerca de la distribución geográfica de las plantas americanas (de Micheli *et al.*, 2009).

A finales del siglo XIX se realizaron las primeras investigaciones concernientes a la botánica mexicana en el laboratorio del Instituto Médico Nacional, bajo la guía del doctor Fernando Altamirano, iniciador de los estudios farmacológicos en el país. Ya en el siglo XX se efectuaron los primeros ensayos de farmacología cardiovascular en el Hospital General de la capital mexicana, por iniciativa del doctor Ignacio Chávez. La tradición botánico-farmacológica mexicana se mantiene viva y operante en las modernas instituciones científicas de la república (de Micheli *et al.*, 2009).

Es posible concluir que al surgimiento de la Medicina Tradicional se le atribuyen los aportes de Hipócrates en la antigua Grecia, sin embargo; el uso de plantas medicinales también se le atribuye a la sabiduría de muchos países como China (Taoismo), y a pesar de que su definición data del siglo XIX, las raíces de la filosofía



de la medicina tradicional son milenarias (Besalú, 2002) y tiene mayor antigüedad que cualquier otra terapia, ya que el consumo sistemático de plantas con atributos medicinales data probablemente desde hace 2 millones de años en África (Chifa, 2010).

El conocimiento de la Medicina Tradicional y la utilización de plantas medicinales es una experiencia transmitida por generaciones, a tal punto, que en pleno siglo XXI son denominadas plantas de uso tradicional. En la actualidad existen extensas investigaciones relacionadas con el uso de plantas para curar diversas enfermedades (Pascual *et al.*, 2014). Durante muchos años, los seres humanos han utilizado las plantas para tratar enfermedades de la piel, curar heridas, picaduras de insectos e incluso mordeduras de serpientes. Sin embargo, es a partir de la década de los 80's del siglo pasado, que el interés por conocer las plantas medicinales y sus usos, ha proliferado en todo el mundo, motivados por las muertes causadas por reacciones adversas a los medicamentos convencionales, como las 600 muertes sucedidas en Inglaterra entre 1986 y 1987, y las más de 200 mil en Estados Unidos de América (Pardi *et al.*, 2013).

En 1988 se llevó acabo la Conferencia Internacional sobre Conservación de Plantas Medicinales, en Chiang Mai, Tailandia, con la presencia de la OMS, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales, y el Fondo Mundial para la Vida Salvaje. Como resultado se redactó un manifiesto conocido como la "Declaración de Chiang Mai", donde se realiza una severa advertencia: "salvar plantas para salvar vidas" (MINSAP, 2002). Y es a partir del decenio de 1990 que se constata un resurgimiento de la utilización de la Medicina Tradicional en muchos países desarrollados y en desarrollo (OMS, 2018).

2.2 La Fitoterapia.

En las últimas dos décadas, la industria farmacéutica internacional ha abierto una novedosa línea de productos, basada en extractos estandarizados de especies vegetales, entendiéndose por extractos estandarizados, al contenido de principio activo del extracto que ha sido analizado y cuantificado (Alonso, 2013).



Esta tendencia, responde a la búsqueda de medicamentos naturales por parte de los consumidores. En la actualidad, se puede palpar un compromiso creciente en cuanto a la investigación, el desarrollo, la innovación, la producción y comercialización de medicamentos basados en los extractos estandarizados de especies vegetales. En este contexto surge la fitoterapia, la ciencia que estudia el uso de plantas medicinales y las incorpora en formas farmacéuticas, cuya calidad, seguridad y eficacia están garantizadas, teniendo en cuenta las características de las drogas vegetales y extractos (Cea, 2013).

Es mediante la fitoterapia que se incorporan a la industria farmacéutica los fitofármacos, que, de acuerdo a la OMS, se definen como productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa o para fines de diagnóstico (OMS, 2018). Los fitofármacos se caracterizan por el conocimiento de su eficacia y de los riesgos de uso, así como para la reproducibilidad y la constancia de su calidad (Silva, 2013).

En México, los fitofármacos son denominados “medicamentos herbolarios” y su registro y comercialización está regulado legalmente y se adhiere a diferentes normas. Debido al incremento de la existencia de los fitofármacos, la Ley General de Salud establece categorías de fármacos a base de hierbas y remedios herbolarios. El estudio científico de los productos naturales es útil para obtener sustancias activas encaminadas al desarrollo de nuevos medicamentos. Con un mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las plantas y de sus derivados, se requieren métodos analíticos que faciliten el control de calidad de los preparados fitofarmacéuticos. El desarrollo, autorización y comercialización de los preparados a base de plantas para prevenir, atenuar o curar enfermedades requiere la identificación de los principios activos de los extractos naturales, producir a gran escala la materia prima y realizar estudios farmacológicos clínicos y toxicológicos, para la posterior elaboración de los fitofarmacéuticos, tal como se haría con los medicamentos de patente (Aguilar, 2014). La investigación científica es la única



forma de comprobar que los productos fitoterapéuticos sean prescritos por los médicos (Cea, 2013).

En respuesta a la necesidad de esta validación científica se recurre a la fitoquímica y fitofarmacología, ya que existe una gran cantidad de metabolitos secundarios en las plantas que ofrecen una gigantesca posibilidad de encontrar moléculas bioactivas con actividad biológica (Chang *et al.*, 2013).

2.3 Metabolitos Secundarios.

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios, también denominados productos secundarios o productos naturales. Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos *et al.*, 2009).

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies (Ávalos *et al.*, 2009).

2.4 La familia Asteraceae.

La familia Asteraceae (o Compositae), constituye uno de los grupos más diversificados dentro de las plantas con flores (Magnoliophyta), y también uno de los grupos más naturales. Es una de las familias más importantes de las Angiospermas, contiene un número de especies que van desde los 2 200 hasta las 30 000 dependiendo del autor. Todos sus miembros se caracterizan por presentar una inflorescencia primaria formada por una cabezuela pseudántica, con un involucre de brácteas que semeja una estructura calicinal que contiene en su interior una o muchas flores gamopétalas, epiginas, carentes de cáliz o modificado en una estructura muy peculiar y variable denominada vilano, con los estambres singenosios, el estilo dividido apicalmente en dos ramas también con una gran variación morfológica, un fruto denominado aquenio que puede ser glabro o pubescente y cuyos tricomas, al ser observado bajo el microscopio óptico, parecen ser dos tricomas fusionados en uno solo (García *et al.*, 2004).

Esta familia es cosmopolita, sólo no registrada en la región antártica. Son de los elementos más característicos de las regiones con clima templado o seco, con centros importantes de diversificación en México, la región mediterránea del Viejo Mundo, la región del Cabo en África, Australia y los Andes en Suramérica (Heywood, 1985). Las evidencias geológicas y filogenéticas sugieren que el centro de origen se ubica en el hemisferio sur, probablemente en la región andina de Sudamérica, aunque autores como Turner, 1977, opina que su amplia distribución mundial pudiera más bien derivar de una mayor antigüedad, ubicando su sitio de origen en la Godwana precretácica.

2.5 *Cosmos sulphureus* Cav.

Entre las especies que conforman la familia Asteraceae, se encuentra la planta *Cosmos sulphureus* Cav. (Figura 3) la cual es originaria de América central y ampliamente distribuida en México (Jansen *et al.*, 2005). Esta especie es muy decorativa y se le suele encontrar en muchos caminos del trópico mexicano,

especialmente en la cuenca del Río Balsas. Se le conoce también con otros nombres como Mirasol amarillo o *Corepsis artemisiaefolia* Jacq. (McVaugh, 1984).

Su taxonomía fue descrita por Antonio José de Cavanilles en 1971 (Figura 2).

Reino: Plantae

División: Fanerógama

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: Cosmos

Especie: *Cosmos sulphureus* Cav.

Figura 2. Taxonomía de *Cosmos sulphureus* Cav. Modificado de Cavanilles, A. (1971). Icones et Descriptiones Plantarum.

Es una planta de hierba anual (Figura 3), erecta, que alcanza los 2m de altura, su tallo es ramificado generalmente hacia la parte superior, con pelos erectos multicelulares. Sus hojas son opuestas, de hasta 20cm de largo, su contorno general es anchamente triangular, están profundamente divididas en 7 a 11 segmentos que a su vez vuelven a dividirse una o dos veces, pueden presentarse diminutos dientes poco evidentes en el margen; el pecíolo de hasta 7cm de largo, aunque a veces es mucho más corto. Su inflorescencia son cabezuelas sobre pedúnculos delgados de hasta 20cm de largo, ubicadas hacia la punta de las ramas. Las flores o cabezuelas son de unos 6.5cm de ancho, aunque tiene el aspecto de una flor, es en realidad una inflorescencia formada por pequeñas flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo plano. El conjunto de flores está rodeado por fuera por varias brácteas dispuestas en 2 series y soldadas en la base. Sus flores tienen un color anaranjado intenso o anaranjado-amarillento, de hasta casi 3 cm de largo, su forma es obovada con 3 dientecillos en el ápice que es redondeado (Nash, *et al.*, 1976).



Figura 3. Orange Cosmos (*Cosmos sulphureus* Cav.) [En línea]
http://www.missouriplants.com/Others/Cosmos_sulphureus_page.html

El fruto es seco y no se abre (indehiscente), contiene una sola semilla, se le conoce como aquenio, es delgado, tetragonal, curvado, con diminutos pelillos, angostado hacia los dos extremos y muy alargado hacia el ápice, en el que se presenta una estructura llamada vilano que consiste en 2 (raramente 3, o a veces ausentes) aristas delgadas, a veces recurvadas, que tienen en su superficie diminutos ganchillos dirigidos hacia abajo (McVaugh, 1984).

Las personas utilizan las flores de esta planta para combatir efectos de piquetes de alacrán, aftas, angina, como digitálico (aumenta la fuerza de la contracción cardíaca) y para la curación de llagas en la boca (Fernández *et al.*, 1998).

Actividad

Referencias



Antioxidante, antidiabética, contra la malaria, antiinflamatoria, antigenotóxica, antimicrobiana, contra la ictericia, fiebre intermitente y la esplenomegalia.	Jang, Park, Park, Park, & Lee (2008); Alexandros (2007); Akihisa <i>et al.</i> (1996); Rasdi, Samah, Sule, & Ahmed (2010)
---	--

Tabla 1. Literatura sobre la actividad biológica en *Cosmos sulphureus* Cav. Modificado de Onanong *et al.*, 2011.

2.6 Compuestos de interés farmacológico en *Cosmos sulphureus* Cav.

Las flores de la mayoría de las especies de *Cosmos*, contienen flavonoides, estos son metabolitos secundarios polifenólicos comúnmente con un grupo cetona y normalmente pigmentos de coloración amarilla de donde viene su nombre del latín flavus, “amarillo”. Los flavonoides ejercen un amplio espectro de funciones en las plantas, principalmente como pigmentos de colores amarillos en los pétalos de las flores con la función de atraer los insectos polinizadores. A nivel celular, los flavonoides tienen funciones reguladoras del ciclo celular. Ciertos flavonoides se sintetizan en las raíces de las plantas y tienen papeles cruciales en el establecimiento de hongos simbióticos o de micorrizas y, al mismo tiempo, en combatir las infecciones causadas por hongos patógenos (Fundación CANNA, 2017).

Existen flavonoides de interés farmacológico por sus actividades biológicas, como la quercitina, que inhibe enzimas virales pudiendo tener acción antivírica, y también inhibe la producción de prostaglandinas ejerciendo efectos antiinflamatorios. Por su parte, la luteonina, posee actividades farmacológicas demostradas en estudios preclínicos como antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas y para combatir el cáncer (Fundación CANNA, 2017).

Los glucósidos de chalcona, son otro tipo de flavonoides de interés farmacológico, ya que presentaron una potente actividad contra parásitos de *Plasmodium falciporum*, *Plasmodium belghri* y *Plasmodium yoelii*, los dos primeros probados *in*



vitro los cuales mostraron inhibición en el crecimiento celular en amastigotes humanos, lo cual implica la inhibición de síntesis del ADN de dichos parásitos. (Ramírez *et al.*, 2012). La actividad biológica de una chalcona–imidazol conjugada se comprobó en la evaluación de 53 líneas de células tumorales humanas, ya que conduce a la apoptosis del ADN por afectación de telómeros, demostrándose sus propiedades anticancerígenas, especialmente sobre cáncer de mama (Janaki *et al.*, 2011).

Los flavonoides específicos en especies de *Cosmos* no han sido del todo interpretados, aunque se han encontrado los siguientes: luteolina, un grupo de flavonoles que tienen quercetina y un grupo de glucósidos de chalcona (Jansen *et al.*, 2005). En 1952, Shimoloriyama y Hattori aislaron un nuevo pigmento de antocloro glicosidado en las flores de *Cosmos sulphureus* Cav. identificado como el flavonoide Sulfuretin 6-O-β-d-Glucoside, del tipo Aurona (Figura 4). La formación de pigmentos de antocloro se basa en la ruta de biosíntesis común a todos los flavonoides. La clave del proceso es la enzima chalcona sintasa (CHS), que cataliza la formación de una hidroxilalcocona de tres moléculas de malonil-CoA y una molécula de cinnamoil-CoA, los pigmentos de antocloro sirven como guías de néctar UV en algunas plantas (Harborne *et al.*, 1978).

Funcionando como intermedios de la subsiguiente biosíntesis de flavonoides, las hidroxil-chalconas no son químicamente estables y se isomerizan rápidamente a flavanonas. Sin embargo, algunas plantas son capaces de acumular hidroxiauronas, formadas por la enzima aurona sintasa (AUS) (Jagtap *et al.*, 2016).

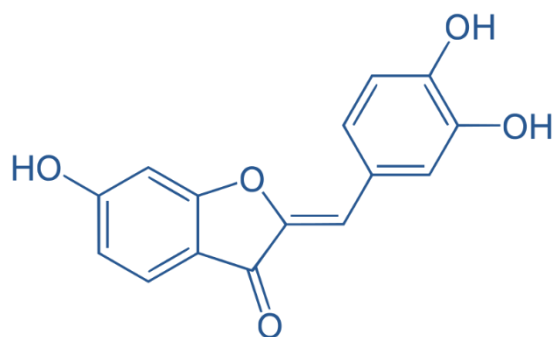


Figura 4. Estructura del Sulfuretin 6-O- β -d-Glucoside en *Cosmos sulphureus* Cav. Modificado de Shimoloriyama *et al.*, 1952.

Los antocloros representan una importante adaptación de las flores amarillas para promover la polinización atrayendo a los insectos como muchas especies de la familia Asteraceae que acumulan carotenoides y pigmentos de antocloro (Jagtap *et al.*, 2016).

De acuerdo con Cassio *et al.*, 2015, en su análisis de las hojas de *Cosmos sulphureus* Cav. se identificaron componentes terpénicos (Figura 5) pudiéndose indicar la presencia de diterpenos, triterpenos o lactonas sesquiterénicas.

Los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. Los terpenos son los metabolitos secundarios que dan las características organolépticas (aroma y sabor) de las plantas y que constituyen la mayor parte del aceite esencial producido por las plantas aromáticas (Fundación CANNA, 2017). Se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno ensambladas en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Los terpenos han sido evaluados para actividad antiviral, como es el caso del VIH, encontrando valores significativos con dosis mínimas inhibitorias (Macías *et al.*, 2010). Otros terpenos han sido evaluados para actividad antimicrobiana contra la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Bueno *et al.*, 2009).

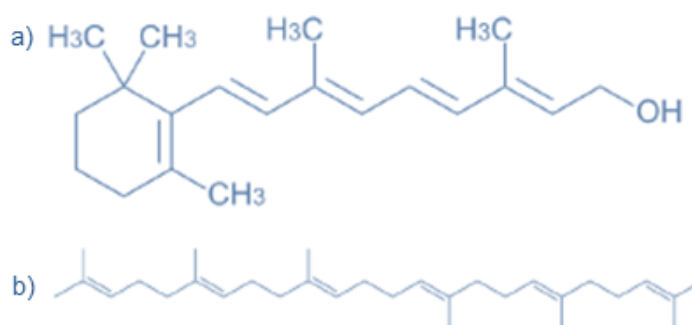


Figura 5. Terpenos encontrados en hojas de *Cosmos sulphureus* Cav. a) Diterpenos, b) Triterpenos. Modificado de Cassio *et al.*, 2015.

2.7 Germinación de *Cosmos sulphureus* Cav.

De acuerdo con Lim, 2014, esta especie puede desarrollarse en suelos promedio, de humedad media, moderadamente fértil, bien drenada a pleno sol y tolera el suelo bastante seco.

La germinación de plántulas a partir de semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. se tarda entre 7 a 21 días con una temperatura óptima de 24°C, las flores dan comienzo entre 50 a 60 días de emergida. Requiere, además; un pH de entre 6.0 a 8.5, reflejando con ello, su hábitat nativo de regiones alcalinas de Centroamérica. Las flores pueden tolerar la media sombra, aunque es mejor a pleno sol. La planta es tolerante a la sequía una vez que ya se encuentra germinada, y debido a sus metabolitos secundarios de defensa, raramente es atacada por insectos o enfermedades (Cronquist, 1980).

2.8 Técnicas de Cultivo de células y tejidos *in vitro*.

Durante las últimas décadas, la técnica del cultivo *in vitro* ha ganado especial interés para el establecimiento de diversas plantas para la producción de compuestos o la obtención de cultivos más sanos y con características genéticas específicas. El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta, como el ápice, una hoja, un segmento del tallo, nudo, embrión, semilla o completa y colocarla en un medio



nutritivo estéril usualmente gelificado o semisólido, donde se regenerará una o muchas plantas (Höxtermann, 1997).

Esta técnica se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes. El cultivo de células y tejidos *in vitro* (CCTV) involucra diferentes técnicas a partir de diferente material vegetal tales como cloroplastos, células, tejidos, órganos e incluso plantas completas (Höxtermann, 1997).

Las primeras experiencias relacionadas al cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero recién en 1922 se logró el primer experimento exitoso: germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos, como hongos, virus y bacterias (ArgenBio, 2007).

Las bases biológicas del CCTV se encuentran en la Totipotencia de la planta, la cual se define como la capacidad de una célula de generar un individuo completamente idéntico a la célula madre, la cual tiene la misma información genética y la misma función (Kieran *et al.*, 1997), es decir; indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl *et al.*, 2000).

El CCTV es una forma de reproducción asexual, la cual se puede realizar gracias al mecanismo de división mitótico de las células vegetales. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que poseen un genotipo idéntico al de la célula madre (Bouharmont, 1994). La potencialidad de una célula diferenciada para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por la célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que

se la someta. De este modo y desde la óptica de la conservación de especies vegetales la aparición de la variación espontánea no controlada y al azar durante el proceso del cultivo *in vitro* se convierte en un fenómeno inesperado y no deseado en la mayoría de los casos. Contrariamente a estos efectos, su utilidad en la mejora de los cultivos mediante la creación de nuevas variantes también ha sido bien documentada (Predieri, 2001).

Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son en los campos de micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Fowler, 1987). La clonación debe utilizarse para evitar el empobrecimiento genético de las especies, teniendo el cuidado de introducir nuevos clones, variedades e híbridos de manera permanente (Albarrán *et al.*, 2003). También es necesario considerar que no todas las especies son viables de propagar *in vitro*; algunas son recalcitrantes y cada especie requiere de métodos específicos (Calva, 2005).

3. Hipótesis.

El perfil fitoquímico de *Cosmos sulphureus* Cav. en una planta silvestre es idéntico al de una planta desarrollada *in vitro*.

4. Objetivo general.

Realizar la caracterización fitoquímica de plantas desarrolladas *in vitro* a partir de semillas de *Cosmos sulphureus* Cav.

5. Objetivos específicos.

- Establecer un protocolo de desinfección y germinación *in vitro* para la especie *Cosmos sulphureus* Cav. a partir de semillas colectadas.
- Germinar semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. en medios asépticos de dos colectas diferentes (2017 y 2018).

- Identificar la existencia de compuestos mayoritarios en las semillas de dos colectas diferentes (2017 y 2018), a partir de técnicas cromatográficas convencionales, empleando la EAU.
- Realizar un ensayo de identidad comparativo y la caracterización fitoquímica de la parte aérea de las plantas obtenidas, contra el extracto de una planta silvestre de la misma especie, a partir de técnicas cromatográficas convencionales.

6. Metodología.

6.1 Ubicación del estudio.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Calidad de Alimentos y Productos Naturales (CAyPN) del Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología (CENIT2) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN), ubicado a 6.8 km del centro de la ciudad de Tepic, Nayarit con coordenadas 21.483384, -104.848358 (Google Maps).

6.2 Recolección del material vegetal.

Plantas completas y semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. fueron previamente recolectadas en su hábitat natural por personal del laboratorio de CAyPN, dicho material fue recolectado en las cercanías del CENIT², las plantas colectadas fueron secadas y almacenadas con técnicas de prensado utilizando cartón y papel periódico quedando depositadas en el herbario del laboratorio. Se realizó una segunda colecta en el mismo lugar de la anterior, exactamente un año después de haberse llevado a cabo, esto con el fin de realizar el cultivo de ambas semillas y evaluar sus diferencias fenotípicas apreciables y posteriormente en el análisis cromatográfico.

6.3 Identificación del material vegetal.

El material recolectado fue previamente identificado mediante el método general de análisis MGA-FH 0040, examen visual e inspección microscópica de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos por medio de métodos macroscópicos.

6.4 Cultivo de semillas *in vitro*.

Las semillas se lavaron con agua y jabón, se desinfectaron superficialmente por inmersión en etanol al 70% durante un minuto, seguido de inmersión por 15 minutos en una solución de NaCl con una concentración de cloro activo de 1.5, 2.5 y 5%, con enjuague y remojo en agua destilada durante 24 horas, repitiendo este último procedimiento una vez transcurrido este tiempo.

La siembra de las semillas se llevó a cabo en campana de flujo laminar, para la germinación de las semillas se utilizaron frascos de vidrio conteniendo 20 mL de medio MS al 50% el primer lote y un segundo lote con MS al 100%, ambos adicionados con 3.6 g/L de sacarosa y gelzan como agente gelificante, el pH se ajustó a 6.0 utilizando hidróxido de sodio para elevar su alcalinidad, tanto los frascos como el medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave vertical a 120°C durante 15 minutos.

Todos los cultivos *in vitro* se mantuvieron en cuarto de germinación con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con iluminación equivalente a 78 watts de radiación fotosintéticamente activa PAR de 50 watts tipo LED a 4500 lúmenes y a temperatura de $\pm 26^{\circ}\text{C}$.

Posterior a la germinación de las semillas y desarrollo de plántulas, se llevó a cabo un proceso de rusticación empleando una preparación de tierra negra, tierra de hoja, tierra de montaña y perlita estéril en partes iguales como sustrato.

Las plántulas fueron extraídas del medio de cultivo *in vitro*, se lavaron con agua destilada para eliminarlo totalmente y después fueron trasplantadas a un frasco previamente esterilizado con capacidad de 500 ml, donde se colocó una porción del sustrato propuesto para su rusticación, una vez trasplantadas, fueron regadas con 10 ml de agua destilada y se cubrieron con film de polietileno y no con la tapa original del frasco. Se realizaron dos riegos con 10 ml de agua destilada en los primeros ocho días, para lo cual se levantó de manera momentánea la cubierta de film de polietileno, a partir del décimo día se comenzó a regar con 10 ml de agua corriente

todos los días, perforando parcialmente el film de polietileno. A los 20 días se eliminó completamente la cubierta, y a los 30 días se dio por finalizada la etapa de rusticación siendo trasplantadas de los frascos a maceta de barro, las condiciones ambientales fueron las mismas que en la etapa *in vitro*.

Diagrama general del cultivo *in vitro*.



Figura 6. Diagrama general del cultivo *in vitro*. Elaboración propia.

6.5 Obtención de los extractos de las semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. de dos colectas diferentes.

De las semillas colectadas se procedió a pesar en fresco la cantidad de 14.88mg de cada colecta, se molieron en mortero de porcelana y se colocaron por separado en un frasco de vidrio con capacidad de 25 ml conteniendo 5 ml de etanol-agua proporción 85:15.

Posterior, se inició la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) en un Sonicador del tipo Digital Ultrasonic Cleaner aplicarles energía en forma de sonido que permite agitar las partículas de las muestras, esto; mediante un Digital Ultrasonic Cleaner, aplicando ultrasonido por 90 segundos, con descansos de dos minutos, esto en un lapso de 30 minutos.

Al termino del ultrasonido, la solución obtenida se filtró con papel filtro de la marca Whatman #1 con la finalidad de filtrar impurezas insolubles y permitir el paso a la solución a través de sus poros. Una vez obtenido el filtrado, el solvente fue retirado

del extracto por presión reducida, por medio de un rotaevaporador de la marca BUCHI™.

El extracto obtenido de ambas colectas se dejó en placa de calentamiento durante 48 hrs con el fin evaporar el solvente restante. Pasado el tiempo de evaporación, los extractos se analizaron mediante el uso de Cromatografía en Capa Fina (CCF), para identificar la presencia de compuestos mayoritarios semejantes. Para ello, se utilizaron cromatoplas base de aluminio kieselgel 60 F₂₆₄ de 1mm de espesor de capa, se probaron diferentes proporciones y combinaciones de solventes como fase móvil, hasta identificar la fase móvil con la elución ideal.

Los resultados de la comparación se definieron por el factor de retardo o retraso en cada una de las manchas de ambos extractos, este factor midió la movilidad relativa de cada componente con respecto al máximo posible.

6.6 Obtención del extracto y análisis cromatográfico de la parte aérea de *Cosmos sulphureus Cav.*

Una vez finalizada la etapa de rusticación, se cortó la parte aérea de las plantas y se pusieron a secar por almacenamiento a temperatura ambiente durante tres semanas, una vez secas se molieron en mortero de porcelana.

El material vegetal se colocó en un frasco conteniendo una proporción 85:15 de etanol-agua respectivamente, se dejó macerar por 72 hrs. Posteriormente se realizó filtrado con papel Whatman #1, se realizó destilación a presión reducida con rotaevaporador de la marca BUCHI™ hasta obtener la mayor cantidad de extracto y la menor cantidad de solvente. El extracto obtenido fue colocado en placa de calentamiento a 40°C por 72 hrs para evaporar el solvente restante.

Este procedimiento también se realizó con la parte aérea de la planta silvestre

Con los extractos secos se procedió a realizar un análisis comparativo por Cromatografía en Capa Fina (CCF) empleando cromatoplas base de aluminio kieselgel 60 F₂₅₄ de 1mm de espesor de capa y cromatoplas base de aluminio gel

de sílice modificado con NH_2 recubierto con indicador fluorescente $\text{F}_{254\text{s}}$. Se compararon además los extractos obtenidos por par de disolventes previamente realizados en el laboratorio, contra el extracto silvestre e *in vitro* para este caso solo se emplearon cromatoplasmas en fase normal kieselgel 60 F_{254} .

Todas las cromatoplasmas fueron analizadas bajo luz ultravioleta de onda corta a 254nm, onda larga a 365nm y revelador con ácido sulfúrico al 10%. Se probaron diferentes proporciones y combinaciones de solventes como fase móvil, hasta identificar la fase móvil con la mejor elución.

Los resultados de la comparación se definieron por el factor de retardo o retraso observados en cada una de las manchas de ambos extractos.

7. Diagrama del diseño experimental general.

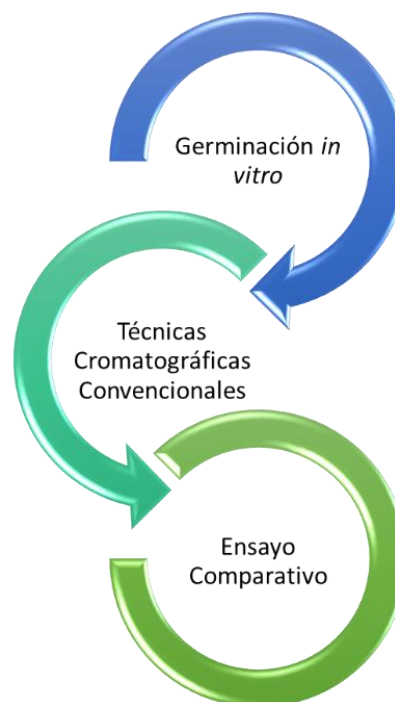


Figura 7. Diagrama del diseño experimental general. Elaboración propia.



8. Resultados.

8.1 El mejor tratamiento de desinfección fue NaClO al 5%.

Para la elección del método de desinfección idóneo para este trabajo se efectuaron tres procesos de desinfección con diferente porcentaje de Hipoclorito de sodio activo, esto debido a que las semillas fueron colectadas directo de la naturaleza y no se tenía certeza si el cultivo presentaría contaminación por hongos o bacterias.

Los resultados del proceso de desinfección fueron los siguientes:

Medio	Colecta 2017		Colecta 2018	
	NaClO (%)	Contaminación (%)	NaClO (%)	Contaminación (%)
MS al 50%	1.50%	100%	1.50%	100%
	2.50%	100%	2.50%	100%
	5.00%	0%	5.00%	100%
MS al 100%	1.50%	-	-	-
	2.50%	-		
	5.00%	0%		

Tabla 2. Respuesta a los diferentes porcentajes de hipoclorito de sodio activo en cada uno de los tratamientos de desinfección de semillas. - = no se realizó.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 2, se observa una severa contaminación en la colecta 2018, para la cual ningún tratamiento de los propuestos brindó el efecto adecuado para la germinación de la planta, en los tres casos se tuvo una evidente contaminación por hongos como se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Contaminación por hongos en el cultivo *in vitro* de semillas, colecta 2018. Estos resultados no son de asombrar considerando que se partió de semillas colectadas de plantas creciendo de manera silvestre, las cuales se encuentran muy contaminadas y suelen presentar serios problemas de oxidación, las cuales además tenían muy poco tiempo de ser colectadas.

A diferencia de la colecta 2017, que respondió satisfactoriamente al tratamiento con NaClO al 5%, se identifica que estas semillas tuvieron un secado por almacenamiento con duración de un año en el cual; permanecieron en una caja de cartón en un lugar seco.

Este tiempo permitió remover el agua contenida en las semillas, ya que el agua en forma líquida puede estar presente en los constituyentes celulares y en forma gaseosa en los espacios intercelulares, por lo que el secado requirió que la evaporación de la humedad de su superficie fuera acompañada por la migración de la humedad de su interior (Taiz y Zeiger, 2006), eliminando de esta forma el agua total y evitando con ello el crecimiento de hongos o bacterias.

Dando seguimiento a la germinación de la colecta 2017, en las figuras 9a, 9b, 9c, 9d, 9e y 9f se observan respectivamente, el aspecto de las semillas colectadas, las semillas dentro de los frascos para su germinación *in vitro*, aspecto de los brotes, el desarrollo de las plántulas germinadas en los cultivos bajo condiciones asépticas, alcanzando un aproximado de 16 cm de altura en un periodo de 12 semanas, la apariencia de un callo fuera del frasco con la aparición de tres brotes y el aspecto de las raíces desarrolladas en los cultivos.

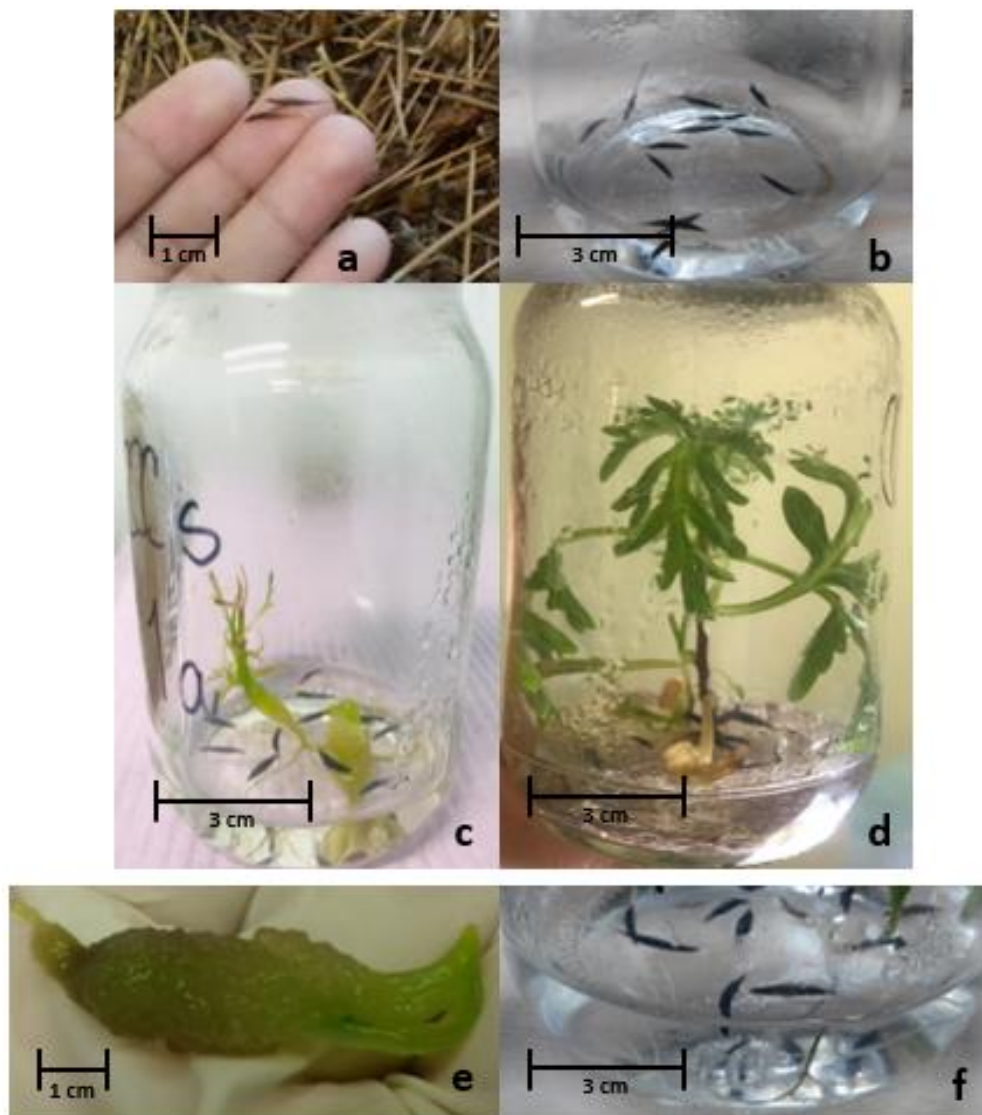


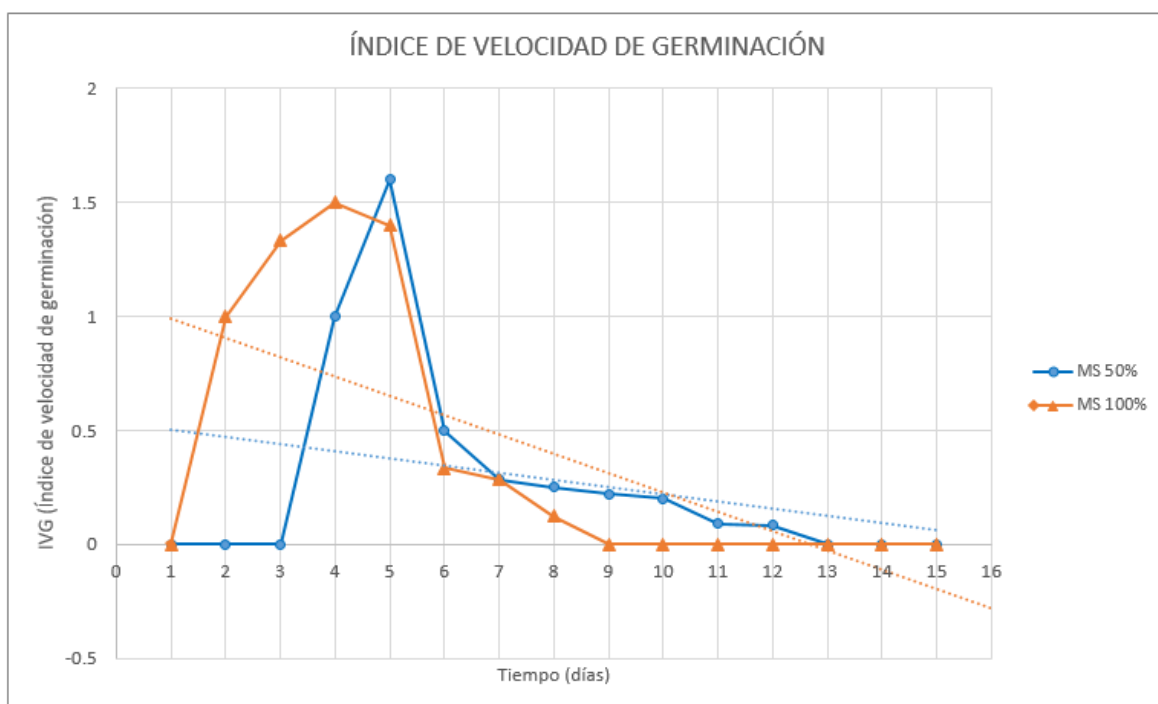
Figura 9. a) Semillas colectadas de plantas silvestres. b) Semillas colocadas en frascos para germinación *in vitro*. c) Aspecto de los brotes generados en los cultivos. d) Desarrollo de plántulas en cultivo. e) Aspecto de un callo fuera del frasco, con tres brotes. f) Aspecto de las raíces desarrolladas en los cultivos.

8.2 El porcentaje ideal del medio de cultivo fue Murashige & Skoog adicionado con 30 g/L de sacarosa y gelzan al 50%.

Se observó que las semillas colectadas iniciaron su proceso de germinación *in vitro* cuatro días después de haber sido colocadas, esto para el medio de cultivo MS al 50% y a los dos días en el medio de cultivo MS al 100%.

Se calculó el Índice de Velocidad de Germinación (IVG) para ambos medios de cultivo *in vitro* por el método de Maguire (1962), se realizaron conteos diarios del número de semillas germinadas, considerando semillas con la radícula brotada.

En la Gráfica 1 se observa el IVG de ambos cultivos sobre un gradiente de tiempo, este índice expresa la velocidad en número de semillas germinadas por día. Por lo que, cuanto mayor es, mayores son la velocidad y el vigor del lote (Maguire, 1962).



Gráfica 1. Índice de velocidad de germinación de semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. en función de los días de observación y según medios de cultivo.

En la gráfica anterior es posible identificar que el mayor IVG se alcanza en el medio de cultivo MS al 50%, durante el día cinco después de la siembra, con un IVG de 1.6, en este día germinaron ocho semillas, lo cual representa el 11.11% del total de



la germinación, siendo el mayor porcentaje en este lote; conforme fueron pasando los días, la germinación fue cesando.

En el medio de cultivo MS al 100% se observó que la germinación inicio antes, a tan solo dos días después de la siembra, sin embargo; el número de semillas germinadas fue decayendo con mayor velocidad.

Aunque el porcentaje de germinación más alto se logró con semillas cultivadas en MS al 50%, el IVG mayor se tuvo en el MS al 100%, esto se debe a que el número de semillas germinadas presentó una mayor disminución conforme pasaban los días.

De acuerdo con Visweshara y Raju (1972), quienes señalan que la germinación y la velocidad de la misma se incrementan significativamente conforme aumenta la madurez de la semilla, por lo que la caída en el vigor de estas indicaría una inmadurez embrionaria, tomando en cuenta, además; que las semillas seleccionadas no pasaron por ningún tipo de filtro en cuanto a tamaño, he ahí los resultados diferidos entre el PG y el IVG resultantes (Tabla 3).

Medio de cultivo	Ensayo de Germinación (PG %)	Ensayo de Vigor (IVG)
MS al 50%	34.72% ^a	4.23 ^a
MS al 100%	33.33% ^a	5.97 ^a

Valores seguidos por la misma letra, dentro de las columnas no difieren entre sí por la prueba t-student ($p < 0.05$)

Tabla 3. Porcentaje de germinación y vigor de semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. en diferente porcentaje de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).

Para identificar si el IVG de ambos medios de cultivo difiere significativamente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba t-student (Tabla 4). Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics.

Medio de cultivo	N	Media	Desviación Estándar	Desv. Error	Prueba t para la igualdad de medias	
					Sig. (bilateral)	
MS al 50%	9	2.78	2.167	0.722		0.571
MS al 100%	7	3.43	2.299	0.869	gl	14

Tabla 4. Prueba t-student de muestras independientes en la variable IVG a los 15 días con 95% de intervalo de confianza.

Los porcentajes de germinación en general muestran una tendencia interesante considerando que se partió de semillas colectadas directo de la naturaleza con alta contaminación, sin selección específica, en condiciones no probadas con anterioridad para esta especie y en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. El porcentaje restante de semillas no germinadas es un ejemplo de lo que sucede en los hábitats naturales en las especies vegetales, donde tienen una pérdida de semillas muy alta y sus índices de germinación son bajos. Por lo que el cultivo *in vitro* representa una ventaja competitiva muy importante para el establecimiento de sistemas de micropropagación, ya que es posible experimentar con diferentes reguladores de crecimiento, medios de cultivo, condiciones climáticas y con las plántulas obtenidas, reproducirlas a partir de sus hojas, tallos o raíces (Gómez *et al.*, 2010).

Durante esta investigación, se decidió no adicionar ningún regulador de crecimiento, como auxinas, agua de coco o ácido giberélico ya que se desea identificar los compuestos bioactivos presentes en una planta germinada en condiciones asépticas y comparar estos con los de una planta germinada en condiciones silvestres.

8.3 Germinación de 49 semillas *in vitro* y desarrollo de 14 plántulas.

Al cabo de 15 días se observó que la germinación en nuevas semillas había cesado, por lo que los resultados por cada frasco se pueden observar en la Tabla 5.

Frasco	A los 7 días			A los 15 días		
	Medio	Respuesta	Germinación (%)	Medio	Respuesta	Germinación (%)
1	MS 50	C	16.66%	MS 50	B, R	41.66%
	MS 100	B	41.66%	MS 100	R	41.66%
2	MS 50	C	8.33%	MS 50	B, R	16.66%
	MS 100	B	33.33%	MS 100	R	41.66%
3	MS 50	C	8.33%	MS 50	B	16.66%
	MS 100	-	0.00%	MS 100	-	0.00%
4	MS 50	B	16.66%	MS 50	R	25%
	MS 100	-	0.00%	MS 100	-	0.00%
5	MS 50	B	66.66%	MS 50	R	66.66%
	MS 100	B	50.00%	MS 100	R	50%
6	MS 50	B	25.00%	MS 50	R	41.66%
	MS 100	B	66.66%	MS 100	R	66.66%

Tabla 5. Respuestas y porcentajes de germinación promedio generados por las semillas en los medios de cultivo propuestos. B= formación de brotes, C= formación de callos, R= formación de raíces, -= sin cambio.

Al día 31 del experimento se inició la etapa de rusticación de las plántulas obtenidas que presentaban raíces del medio MS 50 y MS 100, se preparó una proporción 50-50 de tierra preparada (tierra negra + tierra de hoja + tierra de montaña) y perlita estéril como sustrato, no se adicionó ninguna fitohormona o abono.

Las plántulas fueron extraídas del medio de cultivo *in vitro*, se lavaron con agua destilada para eliminarlo totalmente y después fueron trasplantadas a un frasco previamente esterilizado con capacidad de 500 ml, donde se colocó una porción del sustrato propuesto para su rusticación (Figura 10), una vez trasplantadas, fueron regadas con 10ml de agua destilada y se cubrieron con film de polietileno y no con la tapa original del frasco.



Figura 10. Plántula de *Cosmos sulphureus* Cav. en proceso de rusticación sin la cubierta de film de polietileno, a) Vista lateral de la plántula, b) Vista aérea de la plántula.

Se realizaron dos riegos con 10 ml de agua destilada en los primeros ocho días, para lo cual se levantó de manera momentánea la cubierta de film de polietileno, a partir del décimo día se comenzó a regar con 10ml de agua corriente todos los días, perforando parcialmente el film de polietileno.

A los 20 días se eliminó completamente la cubierta, y a los 30 días se dio por finalizada la etapa de rusticación, las condiciones ambientales fueron las mismas que en la etapa *in vitro*.

Durante el proceso de rusticación en una primera etapa se trasplantaron seis plántulas del MS 50 de entre 6 y 8cm de alto, de las cuales sólo sobrevivió una, el resto presentó oxidación del 100% al cuarto día (Figura 11), por lo que tuvieron que ser desechadas. En una segunda etapa de este proceso, se trasplantaron tres plántulas del MS 50 y cinco del MS 100 de entre 6 y 10 cm de altura, de las cuales cinco sobrevivieron a la etapa de rusticación, tres del MS 50 y dos del MS 100, el resto presentó oxidación del 100% al tercer día de iniciado el proceso.

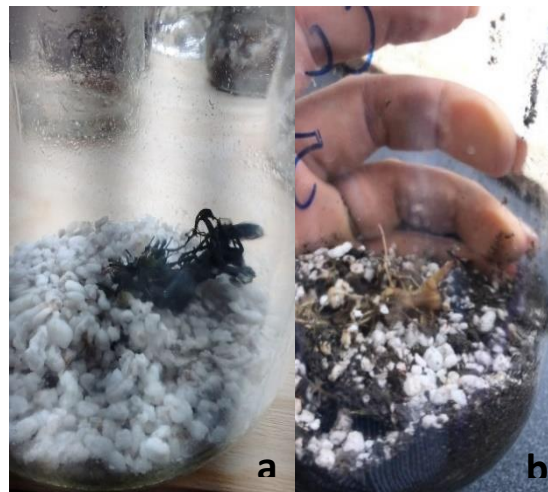


Figura 11. Plántulas con visible oxidación durante la etapa de rusticación, a) Plántula de 6 cm de altura con oxidación del 100%, b) Plántula de 4 cm de altura con oxidación del 100%.

Ante esta situación, se identificó que, entre las plántulas sobrevivientes y el resto, las raíces jugaron un papel muy importante, ya que el resto de ellas no contaban con raíces entrelazadas en forma circular (Figura 12a) como en las sobrevivientes, que para efectos de identificación se nombrarán Ccs4a, Ccs3b, Ccs5b, Ccs2c, Ccs4c y Ccs6c, lo que les permitió absorber nutrientes, permanecer erguidas y en crecimiento.

Se observó que una vez en proceso de rusticación, las plantas logran un crecimiento de entre 2 y 3 cm cada siete días en condiciones normales sin fitohormonas o abonos. Finalmente, fueron trasplantadas a maceta de barro utilizando el mismo sustrato que en la rusticación, una proporción a partes iguales de tierra preparada y perlita estéril.

Una vez ahí, la planta fue sometida a condiciones ambientales normales como luz natural directa durante 15 días.



Figura 12. a) Ccs4a en lavado con agua destilada, antes de iniciar la rusticación, se identifican sus raíces entrelazadas (flecha roja) en forma circular. b) Ccs4a en rusticación durante la semana 13 de crecimiento, presenta 18 cm de altura desde la base hasta la última hoja.



Figura 13. Ccs4a trasplantada a maceta de barro, finalizando así su etapa de rusticación.

8.4 Identificación semejante de compuestos mayoritarios en las semillas de las colectas 2017 y 2018.

El análisis en CCF de los extractos de las semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. arrojaron semejanza por el factor de retardo observados. Confirmando la presencia de compuestos mayoritarios en ambas colectas.



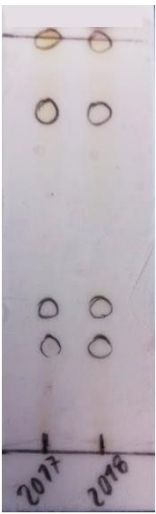
Fase Móvil	Proporción	Análisis		
		Onda Corta (254nm)	Onda Larga (365nm)	Revelador (H ₂ SO ₄ al 10%)
ButOH / H ₂ O / CH ₃ COOH	(4 : 1 : 1)			

Figura 14. Se muestran las fases móviles que tuvieron mejor elución, proporción e identificación de compuestos por onda corta, larga y revelado con ácido sulfúrico al 10%.

El rendimiento obtenido fue el siguiente:

Colecta	Peso fresco	Extracto total	Rendimiento
2017	14.88mg	3.5mg	2.35%
2018	14.88mg	2.0mg	1.34%

Tabla 6. Peso y rendimiento total de los extractos obtenidos.

8.5 Ensayo de identidad comparativa y caracterización fitoquímica semejante para el extracto de la planta *in vitro* vs el extracto de la planta silvestre, colecta 2017.

Los análisis confirman que tanto el extracto de la planta silvestre (C_{ss}) como el extracto de la planta *in vitro* (C_{sm}) son idénticos de acuerdo al factor de retardo observado (Figura 15).







Fase Móvil	Proporción	Análisis		
		Onda Corta (254nm)	Onda Larga (365nm)	Revelador (H ₂ SO ₄ al 10%)
a)	AcOET / MeOH (9 : 1)			
b)	MeOH 100%			

Figura 15. Ensayo de identidad y perfil fitoquímico del extracto C_{ss} y C_{sm}, analizados por cromatografía en capa fina, a) Cromatoplaca fase normal diluida en fase móvil de Acetato de Etilo / Metanol, 9:1 y b) Cromatoplaca fase reversa diluida en Metanol 100%.

Los factores de retardo en cromatoplaaca fase normal para ambos extractos fueron 0.125, 0.750, 0.875 y 1.0, y para fase reversa 0.125, 0.25, 0.375 y 0.575, por lo que se confirma que existen compuestos mayoritarios idénticos en ambas plantas sin importar sus condiciones de crecimiento.

El rendimiento total obtenido de ambos extractos se visualiza en la Tabla 7.

Extracto	Peso seco	Extracto total	Rendimiento
Css	353.8mg	25.2mg	7.12%
Csm	80.8mg	15.9mg	19.67%

Tabla 7. Rendimiento obtenido de los extractos de Css y Csm.

Comparación de los extractos Css y Csm con los extractos obtenidos por par de disolventes de la planta silvestre (Figuras 16, 17 y 18).

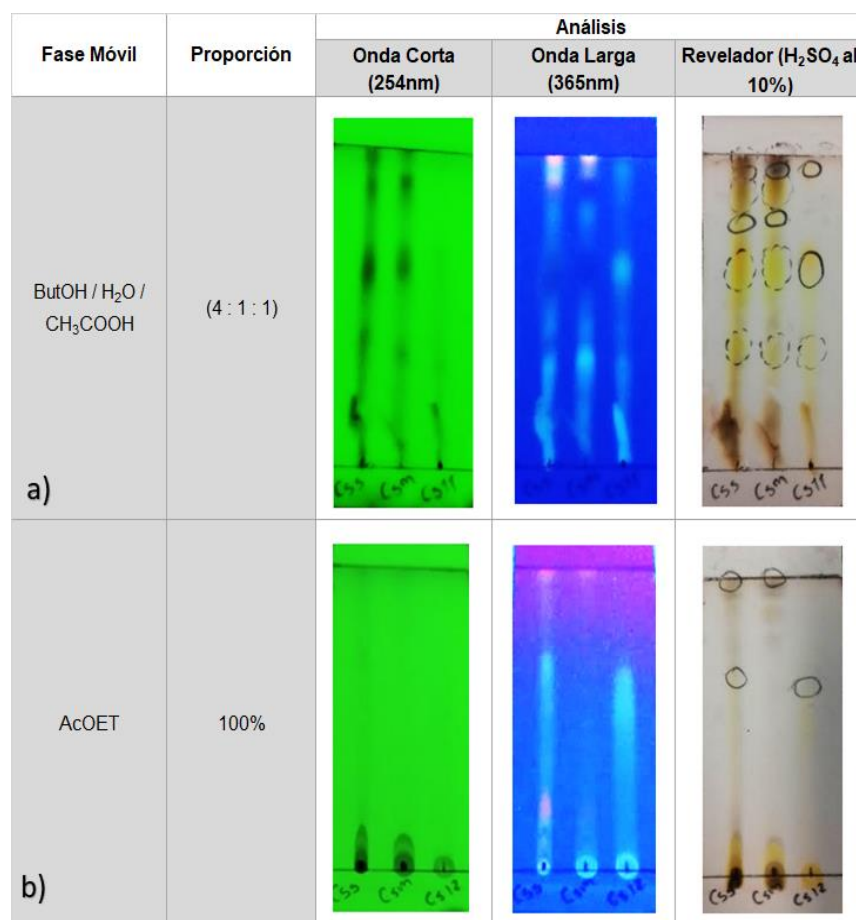


Figura 16. Ensayo comparativo, par de disolventes. a) extracto acuoso, b) extracto con acetato. Cs11 = acuoso, Cs12= acetato.

Fase Móvil	Proporción	Análisis		
		Onda Corta (254nm)	Onda Larga (365nm)	Revelador (H ₂ SO ₄ al 10%)
c) CH ₂ Cl ₂ / MeOH	(9 : 1)			
d) CH ₂ Cl ₂ / MeOH	(9 : 1)			
e) C ₄ H ₁₀ O	100%			

Figura 17. Ensayo comparativo, par de disolventes. c) extracto de hexano, d) extracto de cloroformo y e) extracto de butanol. Cs13= hexano, Cs14= cloroformo y Cs15= butanol.

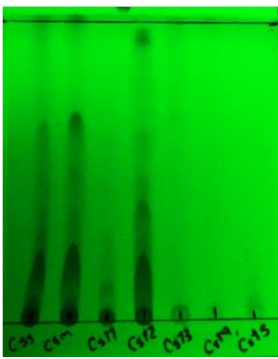
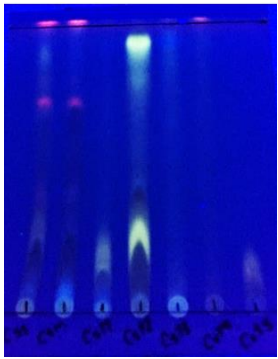
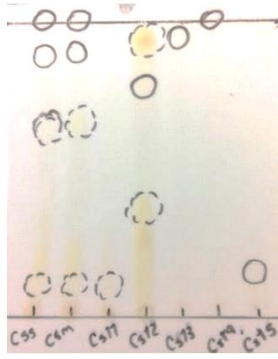
Fase Móvil	Proporción	Análisis		
		Onda Corta (254nm)	Onda Larga (365nm)	Revelador (H ₂ SO ₄ al 10%)
AcOET / MeOH	(9 : 1)			

Figura 18. Ensayo comparativo, par de disolventes contra los extractos de la Planta silvestre y la Planta in vitro.

9. Discusión.

En la siembra de las semillas colectadas en 2018 se presentó contaminación al 100% en los dos tratamientos de desinfección empleados, al contrario de la colecta 2017 que lograron germinar con 0% de contaminación, esto pudo deberse de acuerdo a Folgueras (2000) a dos factores, el primero a que los medios de cultivo *in vitro* contienen altas concentraciones de azúcar y otros nutrientes orgánicos, el medio de cultivo se convierte en un buen sustrato para el desarrollo de hongos, levaduras y algunas especies de bacterias. Por otro lado, la humedad relativa dentro de los frascos de cultivo es aproximadamente 95%. Esto resulta favorable para el desarrollo de muchos hongos, y levaduras, y es muy diferente a la situación en el campo y en las casas solares, donde la humedad relativa es muy variable y sólo permite cierto rango de microorganismos en la superficie de las plantas. Dicho esto, y tomando en cuenta que las semillas de la colecta 2018 no tuvieron el mismo proceso de secado por almacenamiento que la colecta 2017 de alrededor de un año, esto concuerda con lo descrito por Taiz y Zeiger (2006) los cuales indican que este tiempo permitió remover el agua contenida en las semillas, ya que el agua en forma líquida puede estar presente en los constituyentes celulares y en forma gaseosa en los espacios intercelulares, por lo que el secado requirió que la



evaporación de la humedad de su superficie fuera acompañada por la migración de la humedad de su interior. Logrando con ello una menor cantidad de humedad en esta colecta, reduciendo en gran medida la contaminación por hongos u otros microorganismos.

Al utilizar el medio de cultivo Murashige & Skoog al 50 y 100% se identificó que no se presentaron diferencias significativas (t -student < 0.05) en el proceso de germinación de las semillas, por lo cual es posible indicar que para la germinación, la saturación de sales inorgánicas en el medio de cultivo no es un factor determinante en *Cosmos sulphureus* Cav., sin embargo; de acuerdo a Martínez-Villegas *et al.*, (2015), indica que, para confirmar el efecto que tienen las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de plantas *in vitro*, es necesario cuantificar la altura de brote, diámetro de tallo, número de hojas, contenido relativo de clorofila y peso de materia seca, con lo que podríamos asegurar que un medio de cultivo u otro nos proveerá de un mejor desarrollo en etapas posteriores a la germinación. Cuantificación que en esta investigación no se realizó.

El porcentaje de germinación (PG) y el Índice de Velocidad de Germinación (IVG) obtenidos en ambos medios de cultivo no tuvieron diferencias significativas (t -student < 0.05), y de acuerdo con lo dicho por Visweshara y Raju (1972) quienes señalan que la germinación y la velocidad de la misma se incrementan significativamente conforme aumenta la madurez de la semilla, el PG (34.72% MS 50 y 33.33% MS 100) obtenido en cada medio de cultivo podría deberse a que no se llevó a cabo una selección específica en cuanto al tamaño, teniendo una inmadurez embrionaria en las semillas utilizadas para la siembra en esta investigación.

La literatura no reporta trabajos en cultivo de aquenios (semillas) de *Cosmos sulphureus* Cav. y comparación de su extracto con el de una planta silvestre, pero si existen trabajos que reportan la producción de metabolitos secundarios observados en sistemas de cultivo *in vitro* de diversos grupos vegetales (hojas, raíces, tallos, etc.) Yeoman (1970), Tempé y Schell (1985) indican que en las



plantas silvestres el tejido calloso se forma en respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del medio ambiente o por invasión de tejidos por ciertos microorganismos, este sistema de defensa forma parte del metabolismo secundario de las plantas, produciendo compuestos que por sus características podrían tener actividad biológica de interés. De acuerdo con Lindsey y Yeoman (1983), cuando los cultivos se inician de tejidos que naturalmente presentan la mayor producción de determinados metabolitos, se obtienen cultivos que dan mejores rendimientos respecto a otros provenientes de órganos o tejidos que no producen o lo hacen en muy bajas cantidades. Coincidiendo con Yeoman *et al.*, (1980) que indica, si en los cultivos *in vitro* se someten a condiciones de estrés fisiológico, pueden expresar características de adaptación y resistencia que en condiciones naturales nunca manifestaron, creciendo selectivamente sólo aquellas células capaces de adaptarse a sus nuevas condiciones. En esta investigación las plantas sufrieron estrés fisiológico al ser trasplantadas del medio de cultivo *in vitro* al medio de cultivo tradicional, en el cual dejan de obtener los nutrientes y sustrato en el cual se desarrollaron hasta ese momento, por lo que, al dejar de recibirlos, comienzan a producir por si mismas sus propios nutrientes por medio de la fotosíntesis Taiz y Zeiger (2006).

10. Conclusiones.

- La utilización de NaCl activo al 5% para la desinfección de semillas resultó ser la mejor opción al presentar 0% de contaminación.
- El porcentaje de medio de cultivo no influye en el porcentaje de germinación e índice de velocidad de germinación de las semillas, por lo que se pudo reducir el costo de cultivo utilizando solamente el 50%.
- Las semillas que no germinaron puede deberse a una inmadurez embrionaria y no a una saturación de sales inorgánicas en el medio de cultivo, por lo que concluimos que la selección de la semilla debe estar basada en su madurez.

- Por todos los experimentos realizados, se concluye, que, para garantizar el éxito en la fase de rusticación, solo se deben elegir plántulas con desarrollo de raíces circulares, sin estas las plántulas no logran pasar de estadio.
- En el análisis cromatográfico del extracto obtenido de la parte aérea de las plantas *in vitro* y la parte aérea de las plantas silvestres ambos contienen compuestos mayoritarios idénticos y característicos a la presencia de flavonoides.

11. Bibliografía.

Aguilar, A. y Martínez, A. (1993). Los herbarios medicinales de México, *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*, (p. 89). México: Secretaría de Salud.

Aguilar, M. (2014). Fitomedicamentos. Recuperado de [8 de septiembre de 2018] <http://www.fundacionunam.org.mx/salud/fitomedicamentos/>

Albarrán, J., Fuenmayor, F. y Fuchs, M. (2003). Propagación Clonal Rápida de Variedades Comerciales de Yuca Mediante Técnicas Biotecnológicas. *Ceniap*, Venezuela.

Alonso, J. (2013). Avances de Fitomedicina. Buenos Aires: *ISIS Ediciones*

Álvarez, R. (1996). El método científico en las ciencias de la salud. *El método científico*, (p.13). Díaz de Santos: Madrid, España.

Álvarez, R. (1996). El método científico, *El método científico en las ciencias de la salud*, (p. 14). Madrid, España: Díaz de Santos.

ArgenBio (2007). Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Recuperado de [14 de septiembre de 2018] <http://argenbio.org/index.php?action=notas¬e=3545>



ArtNet. "Códice Martín de la Cruz-Badiano (1552)". Recuperado de [02 de septiembre de 2018] <https://news.artnet.com/exhibitions/relive-battle-between-aztec-king-and-the-spanish-conquistadors-140143>

Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca: Serie Fisiología Vegetal*, 119-145.

Azuola, R. y Vargas, P. (2017). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, vol. 50.

Barranco, L. y Batista, I. (2013). Contribución social de la Medicina Tradicional y Natural en la salud pública cubana. *Revista de Humanidades Médicas*, vol. 13.

Bedoya, J., Sánchez, C., Bermúdez, S. y Ramírez, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo *in vitro* de *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol. 14 No. 2 (38-46).

Besalú, C. (2002). Breve historia de la medicina natural. Recuperado de [15 de agosto 2018] <http://www.bonesherbes.com/ingles/historiaesp.htm>

BioModel. Técnicas cromatográficas. Recuperado de [18 de septiembre de 2018] <http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/inicio.htm>

Bouharmont, J. (1994). Application of Somaclonal Variation and *in vitro* Selection to Plant Improvement. *Acta Horti*, 213-331.

Bueno, J., Martínez, J. y Stashenko, E. (2009). Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Salud UIS*, 231-235.

Calderón, X., Pérez, F. y Rotella, A. (1993). Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: Gomortega keule (Mol.) Baillon (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). *Bosque 14*, 23-28.

Calva, C. y Pérez, V. (2005). Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de Alimentos para el Futuro. *Revista Digital Universitaria*, México.

Cassio, R., Macedo, F. & Syogo, N. (2015). Análise fitoquímica das folhas de *Cosmos sulphureus* (asteraceae) visando o isolamento de terpenóides. Encontro anual de iniciacao científica.

Cavanilles, A. (1791). *Icones et Descriptiones Plantarum*. (p. 79).

Cea, R. (2013). Célula química y farmacia: Fitofármacos. *DICA Inventa, Gobierno de El Salvador*.

Chang, L., García, A., Rosabal, Y., Espinoza, A., Ramos, E. y Remon, H. (2013). Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* L. que crece en Cuba. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 30-35.

Chávez, M., White, L., Moctezuma, S. y Herrera, F. (2017). Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*, vol. 56, núm. 2, 2017, pp. 26-47.

Chifa, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (4), pp. 242-245.

CONABIO (2009). *Cosmos sulphureus* Cav. Recuperado de [12 de septiembre de 2018] <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/cosmos-sulphureus/fichas/ficha.htm>

Cronquist, A. (1980). Vascular Flora of the Southeastern United States, Vol. 1, Asteraceae, *Univ. of North Carolina Press, Chapel Hill*.

Cronquist, A. J. (1980). Asteraceae. 1: i–xv, 1–261. In Vasc. Fl. S.E. U. S. The *University of North Carolina Press, Chapel Hill*.

Cruz, D. (2002). Análisis fitoquímico y caracterización parcial de compuestos con actividad estimuladora sobre macrófagos o actividad antimicrobiana en extractos de raíz, tallo y hoja de *Carlwrightia cordifolia* A. GRAY. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.shizuo

Cuadrado, L. (2004). Estudio bromatológico y fitoquímico de la jícama (*Smallanthus sonchifolia*) para determinar el tiempo óptimo de cosecha. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

De Micheli, A. e Izaguirre, R. (2009). De la herbolaria medicinal novohispana a los inicios de estudios botánico–farmacológicos sistematizados (bosquejo histórico). *Archivos de Cardiología México*, 1405-9940.

Espinoza, E. (1999). Rejqalem ri Wa'ix, Dimensión Cero: filosofía maya, etnomedicina y física moderna. *Etnomedicina Maya*, (pp. 52-61). CHOLSAMAJ: Guatemala.

Fagetti, A. (2011). Fundamentos de la medicina tradicional mexicana. En: Argueta, A., Corona-M, E. y Hersch, P. *Saberes colectivos y diálogo de saberes en México*, (p. 137). Toluca, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Famsworth, N. & Soejarto, D. (1985). Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany*.

Ferl, R. & Paul, A. (2000). Genome Organization and Expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.

Fernández E., Pérez, M., Gandarilla, H., Vázquez, R., Fernández, M., Paneque, M., Acosta, O. y Basterrechea, M. (1998). Guía para disminuir infestaciones de *Meloidogyne* spp. mediante el empleo de cultivos no susceptibles. *Boletín Técnico*, 4(3):1-1.



Folgueras, M. (2000) La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales/ Maryluz. Folgueras. -Tesis para aspirar al título de Master en Agricultura Sostenible (Mención Sanidad Vegetal), L. Herrera, Tutor. Santa Clara, Villa Clara. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Fowler, M. (1987). Products from Plant Cells. En: Bu'lock J., Kristiansen B. (Eds.) Basic Biotechnology. *Academic Press*, London, England. pp. 525-544.

Fundación CANNA: Investigación científica y análisis de Cannabis. Recuperado de [10 de septiembre de 2018] <https://www.fundacion-canna.es/flavonoides>

García, A., Ordóñez, M. y Briones, M. (2004). Biodiversidad de Oaxaca. Asteráceas, (p. 177). Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza: México.

Google (s.f.) [Mapa de Tepic, Nayarit, México en Google Maps]. Recuperado de [17 de septiembre de 2018] <https://www.google.com.mx/maps/place/Tepic,+Nay./@21.5009712,-104.946945,12z>

Gómez, G., Cristiani, E. y Villegas, T. (2009). Establecimiento de protocolos para la propagación *in vitro* de plantas de *Acourtia cordata* (Cerv.) Turner (Compositae), colectadas en la Sierra de Guadalupe. *Polibotánica*, no. 30.

Gruenwald, R., (1997). The market situation and marketing of herbal medicine products in Europe. In: Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human, Welfare, 2:33.

Grupo GIDOLQUIM. Elección del disolvente. Recuperado de [18 de septiembre de 2018] www.ub.edu/talq/es/node/198

Harborne, J. & Smith, D. (1978). Anthochlors and other flavonoids as honey guides in the compositae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 287–291.

Heywood, J. (1985). The Biology and Cheistry of the Compositae. *Academic Press*, New York, 21-39.



Höxtermann, E. (1997). Cellular “Elementary Organisms” in vitro. The Early Vision of Gottlieb Haberlandt and its Realization, 716-728.

Jagtap, S. & Ayesha, A. (2016). Synthesis and biological activities of aurones: A Review. Department of Chemistry, Savitribai Phule Pune University, Pune, India

Janaki, M., Pushpavalli, S., Rama, G., Pranjali, S., Debasmita, M., Ahmed, K., Utpal, B. & Manik, P. (2011) Chalcone-imidazolone conjugates induce apoptosis through DNA damage pathway by affecting telomeres. *Can Cell Int*, DOI:10.1186/1475-2867-11-11.

Jang, I., Park, J., Park, E., Park, H., & Lee, H. (2008). Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from cosmos (*Cosmos bipinnatus*) flowers. *Plant Foods for Human Nutrition*, 205–210.

Jansen, P. & Cardon, D. (2005). Alphabetical treatment of dyes and tannins: Cosmos, Dyes and tannins: Plants resources of Tropical Africa, (p. 61). Wageningen, Netherlands: PROTA Foundation / Backhuys Publishers / CTA.

Kieran, P., MacLoughlin, P. & Malone, D. (1997). Plant Cell Suspension Cultures: Some Engineering Considerations. *Journal of Biotechnology*, 39-52.

Lim, T. K. (2014). *Cosmos sulphureus* Cav, Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 7, Flowers, (p. 288). New York: Springer.

Lindsey, K. & Yeoman, M. (1983). The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.*

Lozoya, X. (1976). Estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales.

Macías, V., Alvares, J. y Suarez, H. (2010). Terpenos con actividad biológica anti-VIH. *Revista de la facultad de ciencias de la salud*, 2010.

Maguire, J. (1962) Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.

Marin, F., Torres, O., Santafé, G y Robledo, S. (2016). Estudio Fitoquímico y Evaluación del Potencial Leishmanicida de la Especie *Esenbeckia litoralis* (Rutaceae). *Información Tecnológica*, Vol. 27, 159-168.

Martínez-Villegas, Y., Andrade, M., Colinas, M., Villegas, O., Castillo, A. y Alia, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Rev. fitotec. mex* vol.38 no.4

McVaugh, R. (1984). Compositae. Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico. The University of Michigan Press, Vol. 12.

MINSAP (2002). Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Estomatología. Programa Nacional de Atención Estomatológica Integral a la Población, La Habana, Cuba.

Missouri Plants. Orange Cosmos (*Cosmos sulphureus* Cav.) Recuperado de [01 de septiembre de 2018]
http://www.missouriplants.com/Others/Cosmos_sulphureus_page.html

Nash, D. & Williams, L. (1976) Flora of Guatemala, Compositae. Part XII. Fieldiana Botany, 96-97.

Nunn, J. (2002). La medicina del antiguo Egipto. FCE, México.

OMS (2018). Medicina tradicional. Recuperado de [11 de agosto de 2018]
http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.

Onanong, K., Konczak, I & Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Research International*, 563-571.



Ortiz, B. (1993). Medicina, salud y nutrición aztecas. La cultura azteca en el momento de la conquista, (pp. 30-45). Siglo XXI Editores: México, D.F.

Osuna, L., Tapia, M., y Aguilar, A. (2005). Introducción, Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico (pp. 10-17). España: PUBLICACIONES I EDICIONES DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA.

Pardi, G., Cardozo, E., Perrone, M. y Salazar E. (2003). Detección de especies de Candida en casos de recidiva de pacientes con estomatitis sub-prótesis, medicados con miconazol jalea oral. Acta Odontol Venez, 41(2).

Pascual, D., Pérez, Y., Morales, I., Castellanos, I. y González, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. MEDISAN, 1444.

Predieri, S. 2001. Mutation Induction and Tissue Culture in Improving Fruits. Plant Cell Tissue Organ Cult. 64: 185-210.

Ramírez, M., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A. y Silva, Y. (2012). Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias*.

Rasdi, N., Samah, O., Sule, A., & Ahmed, Q. (2010). Antimicrobial studies of *Cosmos caudatus* Kunth. (Compositae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 669–673.

Rates, SMK. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.

Reyes, A. (2008). Evolución histórica de la medicina tradicional china. *Comunidad y Salud*, 42-49.

Riechmann, J. (2003). Impactos ecológicos crecientes: suelo, biodiversidad, agua. Cuidar de la T(t)ierra: Políticas agrarias y alimentarias sostenibles para entrar en el siglo XXI. Barcelona, España: Romanyá/Valls, s.a.



Ruíz, S. (2014). Códice de la Cruz Badiano, tratado azteca de medicina y herbolaria. Recuperado de [03 de septiembre de 2018] <https://2012profeciasmayasfindelmundo.wordpress.com/tag/medicina-tradicional/>

Sánchez, M., Ríos, D., Pedraza, M., Pereira, G., Castellanos, H. y Escobar, R. (2004). Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* (Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados. *Bosque*, 123-128.

Shimokoriyama, M. & Hattori, S. (1953). Anthochlor Pigments of *Cosmos sulphureus*, *Coreopsis lanceolata* and *C. saxicola*. Botanical Institute, University of Tokyo, 1900-1904.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal: Volumen I. El agua y las células vegetales (p. 51). Publicacions de la Universitat Jaume I, D.L.

Tempé, J. y Schell, J. (1985). La manipulación de las plantas. Mundo Científico.

Turner, B. (1977). Fossil history and geography. Academic Press, New York, 21-39.

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN-IUCN) (2015). Actualización de la Lista Roja de la UICN: éxitos de conservación ensombrecidos por más declive de las especies. Recuperado de [20 de agosto de 2018] <https://www.iucn.org/>, Gland, Suiza.

Vargas, G., Castro, A., Mollie, H., Villaseñor, J., Ortiz, E. y Rodríguez, A. (2013). Distribución geográfica y riqueza del género *Cosmos* (Asteraceae: Coreopsidaeae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Vol. 84, 536-555.

Visweshwara, S. & Raju, K. (1972). Seed germination coffee. *Indian Coffee*. Bangalore, India. v. 36, p. 278-290.

Vulto, S., Neerken, S., Louwe, R., de Baat, M., Amesz, J. & Aartsma, T. (1998). Excited-State Structure and Dynamics in FMO Antenna Complexes from Photosynthetic Green Sulfur Bacteria. *American Chemical Society*, 10630–10635.



Wagner, H., Hikino, H. & Farnsworth, N. (1985). *Economic and Medicinal Plant Research*. Academic Press, New York.

Yeoman, M. (1970). Early development in callus cultures. *Int. Rev. Cytol.*

Yeoman, M., Miedzybrodska, B., Lindsey, K., & Mclauchlan, W. (1980). The synthetic potential of cultured plant cells. En: Sala F., Parisi B., Cella R., Cifferri O. (Eds.) *Plant cell cultures: Results and perspectives*. Elsevier/North Holland Biomedical. Press. Amsterdam.