

## ANÁLISIS FARMACOGNÓSTICO DE *Tagetes lucida* Cav. Y SUS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

Ramón Scull\*<sup>1</sup>, Yamilet I. Gutiérrez <sup>1</sup>, Arturo Sánchez <sup>1</sup>, Amanda Montes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana. Cuba

<sup>2</sup> Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La Habana. Cuba

\*email: [rscull@ifal.uh.cu](mailto:rscull@ifal.uh.cu)

### Resumen

*Tagetes lucida* Cavanilles, comunmente llamada pericón, es utilizada en el mundo por sus propiedades antiespasmódicas y por su potencial como cultivo no tradicional que podría aprovecharse como producto de exportación de materia prima para la industria farmacéutica, licorera y de perfumería. Con el propósito de brindar evidencias concretas sobre aspectos que permitan establecer su calidad, se presenta el estudio farmacognóstico de la especie. Se realizó la evaluación macroscópica y microscópica, se determinaron los parámetros físico-químicos a la droga cruda y a los extractos hidroalcohólicos (30 y 50 %). Se estimó el perfil químico de los extractos por cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución y se cuantificó el contenido de fenoles totales. Finalmente, fue evaluada la actividad antioxidante por el ensayo de FRAP. Se establecieron algunas especificaciones de calidad de la especie, siendo trascendental las características micromorfológicas de la droga en polvo y sus parámetros físico-químicos. Los métodos de análisis empleados para establecer el perfil químico permitió observar una similitud entre los dos extractos, excepto en el contenido de fenoles totales. Las dos muestras evaluadas manifestaron propiedades antioxidantes, siendo mayor para el extracto hidroalcohólico al 30 % y superiores a la Vitamina C, utilizada como sustancia de referencia. Los resultados obtenidos permitirán validar a *T. lucida* como una alternativa terapéutica a tener en cuenta dentro de nuestra Medicina Natural y Tradicional.

**Palabras clave:** *Tagetes lucida* Cavanilles, análisis farmacognóstico, antioxidante, FRAP

## PHARMACOGNOSTIC ANALYSIS OF *Tagetes lucida* Cav AND ITS HYDROALCOHOLIC EXTRACTS

### Abstract

*Tagetes lucida* Cavanilles, commonly called pericón, is used worldwide for its antispasmodic properties and its potential as a non-traditional crop that could be used as an export of raw materials for pharmaceuticals, liquor and perfume. In order to provide concrete evidence of aspects that establish their quality, pharmacognostic study of the species is presented. Macroscopic and microscopic evaluation was performed, physico-chemical parameters to the crude drug and hydroalcoholic extracts (30 and 50 %) were determined. The chemical profile of the extracts by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography were considered and the content of phenolic compounds was quantified. Finally the antioxidant activity was evaluated through FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power). Were established some quality specifications of the species, being transcendental the micromorphological characteristics of the drug powder and physicochemical parameters. The tests used to establish the chemical profile allowed to observe a similarity between the two extracts, except for the content of total phenols. The extracts showed antioxidant properties. The best results were obtained for the hydroalcoholic extract 30 % and superiors to the Vitamin C, used as reference substance. The results will validate *T. lucida* as a therapeutic alternative to consider in our Natural and Traditional Medicine.

**Keywords:** *Tagetes lucida* Cavanilles, pharmacognostic analysis, antioxidant, FRAP

### Introducción

*T. lucida*, es una planta herbácea perenne, erecta, de hasta 80 cm de alto que pertenece a la familia Asteraceae. Es conocida comúnmente en Guatemala, Honduras, México, Costa Rica, entre otros países, como anisillo, pericón, hierbanís y hierba de San Juan. Es una de las especies que merecen investigación por ser una fuente medicinal a bajo costo, ampliamente utilizada en el mundo por sus propiedades antiespasmódicas; ha sido recomendada para estimular el sistema inmunológico, tratar la ansiedad, la irritabilidad, depresión y en desórdenes ginecológicos como cólicos menstruales (García, 2011). Otras propiedades que se le atribuyen son como abortivo, carminativo, emenagogo y contra áscaris y el mal aliento (Ciccío, 2004; Acosta *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013). Por su potencial como cultivo no tradicional la planta podría aprovecharse como producto de exportación de materia prima para la industria farmacéutica, licorera y de perfumería (Rosales, 1995). En Cuba, por

lo general, la población la utiliza por sus propiedades sedantes y digestivas, lo cual ha motivado el interés en establecer su cultivo bajo nuestras condiciones (Acosta *et al.*, 2011).

El principal compuesto activo acumulado en las partes aéreas, es un aceite esencial constituido, fundamentalmente, por metilchavicol (Ciccío, 2004), se refiere que posee además siete cumarinas que son las responsables de su actividad como antifúngica y antibacterial (Céspedes *et al.*, 2006) y flavonoides, en especial patuletina, a la que se le adjudica la actividad en afecciones gastrointestinales (Germosén-Robineau, 1997). Los constituyentes fenólicos han demostrado tener un significativo efecto antioxidante (Aquino *et al.*, 2002).

Con el propósito de brindar evidencias concretas sobre aspectos que permitan establecer su calidad, se presenta el estudio farmacognóstico de la especie.

## **Materiales y métodos**

### Recolección y procesamiento del material vegetal

La especie vegetal utilizada fue *Tagetes lucida* Cavanilles, el proceso de colecta se realizó en áreas del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, en la localidad de La Coronela, municipio La Lisa, provincia la Habana. La planta se recolectó en el mes de Septiembre de 2014, encontrándose en estado fenológico vegetativo. De las colectas realizadas solo se emplearon las hojas y ramas

### Caracterización botánica de la especie

Se realizó una valoración de las características macromorfológicas de la especie, considerándose aspectos generales relacionados con el tipo de crecimiento de la planta y ramificación. Se describieron las hojas y ramas de la especie, a simple vista y con ayuda de una lupa (Miranda y Cuéllar, 2000). Se evaluaron 100 hojas a las cuales se les determinó la forma del limbo, borde, ápice, base, peciolo, venación y color. También se efectuaron mediciones de largo y ancho de las hojas con ayuda de un pie de rey y se calcularon los valores promedios y la desviación estándar.

Se determinaron las características microscópicas de la droga seca (mezcla de hojas y tallos). Las muestras fueron aclaradas con hipoclorito de sodio y después de lavadas se colorearon con safranina al 1% para finalmente ser fijadas en gelatina glicerizada (Gattuso y Gattuso S. 1999; Miranda y Cuéllar, 2000).

### Parámetros físico-químicos de calidad determinados al material vegetal

Se determinaron los parámetros de calidad a la droga cruda según procedimientos reportados por la NRSP 309 (1992) y Miranda y Cuéllar (2000): humedad residual (método azeotrópico), contenido de

sustancias solubles o extraíbles (agua, mezclas hidroalcohólicas al 30, 50 y 80 %), cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %.

### Obtención de los extractos y parámetros físico-químicos de calidad

A partir del material vegetal se elaboraron extractos hidroalcohólicos al 20 %, por el método de maceración, durante un periodo de siete días, a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , utilizando como disolventes mezclas hidroalcohólicas al 30 y 50 %. Se siguió el procedimiento descrito en la norma cubana NRSP 312 (1992) y por Miranda y Cuéllar (2000).

Se determinó la calidad a los extractos obtenidos mediante la determinación de los parámetros físico-químicos siguientes: propiedades organolépticas (olor y color), pH, índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales y contenido alcohólico.

### Perfil fitoquímico de los extractos

- Cromatografía en capa delgada

Se utilizaron placas de gel de sílice  $F_{254nm}$  de la Merck, sobre soporte de aluminio. El desarrollo cromatográfico fue de forma ascendente, utilizando como fase móvil cloroformo: metanol: n-propanol: agua (5:6:1:4). Para el revelado, las placas se rociaron con solución metanólica al 5 % de tricloruro de aluminio y con Anisaldehído (2,5 mL de anisaldehído, 50 mL de ácido acético glacial, 425 mL de metanoil, 25 mL de ácido sulfúrico). Se calentó la placa a una temperatura de  $105^{\circ}\text{C}$  hasta la aparición de manchas o modificación de la apariencia de las ya existentes.

- Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Los extractos fueron filtrados por un filtro RP-18 para eliminar impurezas y se inyectaron directamente en el equipo. Para el estudio se utilizó un cromatógrafo líquido SHIMADZU. Las condiciones cromatográficas más adecuadas de trabajo fueron las siguientes: fase móvil compuesta por A (95 %): agua: 0,05 % de ácido trifluoracético y B (5 %): acetonitrilo: 0,05 % de ácido trifluoracético; temperatura del horno  $25^{\circ}\text{C}$ ; detector por arreglo de diodo, 370 nm (200-400); flujo a 1 ml/min.; presión 25  $\mu\text{Pa}$ .; volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ ; columna Uptisphere 5 ODB 708965 (RP-18).

- Contenido de fenoles totales: se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Chlopicka *et al.*, 2012).

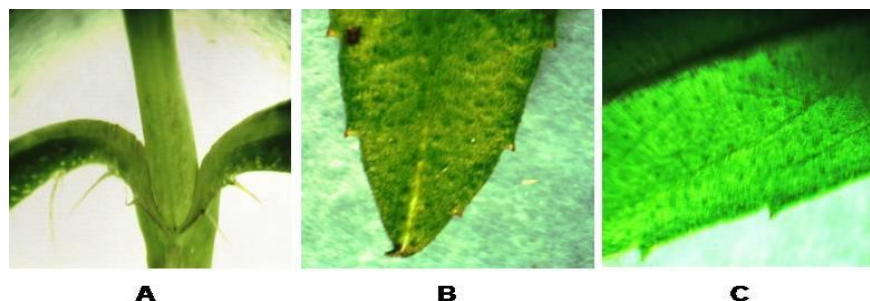
### Actividad antioxidante

Se determinó mediante la técnica del potencial de reducción total FRAP el cual mide la capacidad de la muestra para reducir el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), según la metodología descrita por Benzie y Strain (1996). Un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de las soluciones etanólicas de *T. lucida* en varias concentraciones, se mezcló con 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 900  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP. Las mezclas se

dejaron en reposo y en ausencia de luz durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo fue leída la absorbancia a 593 nm. Las actividades de los extractos se expresaron en valores de densidad óptica. Se utilizó Vitamina C como sustancia de referencia.

### Resultados

En el estudio macromorfológico de la planta se pudo constatar que se trata de una hierba de porte erecto, perenne, que puede alcanzar entre los 30 y 75 cm de altura, es fuertemente aromática y ramificada en su parte superior. Las hojas son opuestas, sésiles, ligeramente dentadas o aserradas, con numerosas glándulas o bolsas de aceites esenciales esparcidas a lo largo de las hojas. En la figura 1 se muestran los detalles morfológicos de las hojas y en la tabla 1 se reflejan las características macromorfológicas de las hojas y los datos reportados en la literatura.



**Figura 1. Características macromorfológicas de las hojas de *T. lucida***

**A:** disposición alterna de las hojas sobre el tallo, **B:** borde dentado o aserrado, **C:** glándulas de aceite esencial (puntos oscuros).

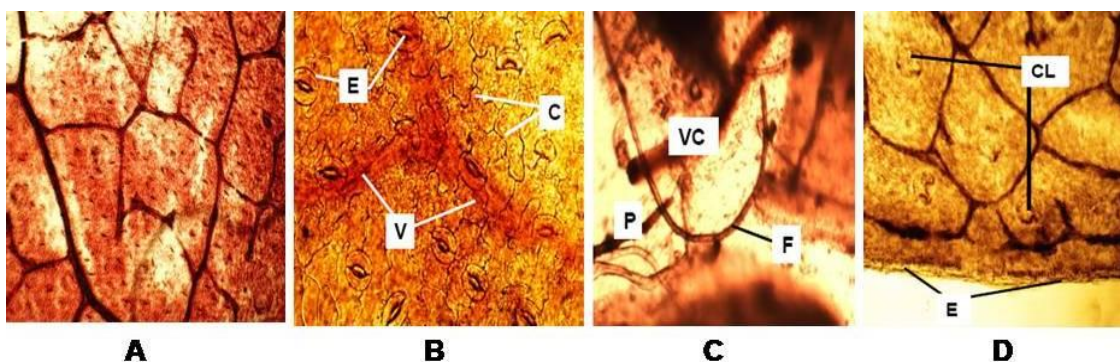
**Tabla 1. Características macromorfológicas de las hojas de *T. lucida***

| Parámetros        | Resultados   | (Germosén-Robineau, 1997)  |
|-------------------|--|--|
| <b>Forma</b>      | Lámina foliar oblonga-lanceolada, no peciolada, borde dentado-aserrado, base obtusa, | Lámina foliar oblonga-lanceoladas, base obtusa o aguda, borde ligeramente dentado o aserrado |
| <b>Nervadura</b>  | Penninervia  | -  |
| <b>Textura</b>    | Membranosa   | -  |
| <b>Superficie</b> | Glabra   | Glabra   |
| <b>Color</b>      | Verde oscuro por el haz y más claro por el envés                                     | Verde  |
| <b>Olor</b>       | Aromático (anís)   | Aromático (anís)   |
| <b>Largo (cm)</b> |  |  |

|                   |          |       |
|-------------------|----------|-------|
| $\bar{X} / S$     | 5,9/0,13 | 2-10  |
| <b>Ancho (cm)</b> |          |       |
| $\bar{X} / S$     | 0,9/0,02 | 0,5-2 |

En la figura 2 se muestran los resultados del análisis micromorfológico efectuado a la droga seca. Se pudo apreciar un sistema de vascularización foliar (figura 2A) conocido por venación reticulada, con terminaciones libres en el mesófilo y paredes fuertemente lignificadas. Otro análisis permitió observar la epidermis de las hojas (figura 2B), conformada por células de contorno sinosoide y numerosos estomas del tipo anomocítico. Se pudo apreciar en profundidad o en un segundo plano, una vena que al parecer puede responder a las llamadas venas secundarias.

Después de una tinción con safranina al 1 % se pudo visualizar un conjunto de estructuras micromorfológicas donde resaltan fibras, tricomas en forma de pelos pluricelulares y un vaso conductor (figura 2C). En la figura 2D puede apreciarse la formación de cavidades secretoras y que según la formación que presenta corresponde a cavidades lisígenas (espacios intercelulares que se forman por la desintegración de células y la consiguiente acumulación de aceites).



**Figura 2. Detalles microscópicos de la droga en polvo de *T. lucida***

**A:** sistema de vascularización, **B:** epidermis de la hoja (E: estomas, V: vena secundaria, C: contorno de la célula), **C:** P: pelo pluricelular, F: fibra, VC: vaso conductor, E: epidermis, **D:** CL: cavidades lisígenas.

El análisis de los parámetros físico-químicos evaluados durante el estudio de la droga cruda constituyen elementos imprescindibles para garantizar su calidad y pureza, lo que se traduce en el valor intrínseco del material vegetal. En la tabla 2 se presentan los resultados de cada determinación.

**Tabla 2.** Parámetros físico-químicos de la droga cruda de *T. lucida*

| <b>Parámetros (%)</b>                     | <b>Resultados <math>\bar{X} / S</math></b> |
|---|--|
| <b>Humedad residual</b>                   | 8,00/ 0,12                                 |
| <b>Sustancias solubles en agua</b>        | 19,71/0,05                                 |
| <b>Sustancias solubles en etanol 30 %</b> | 21,38/0,38                                 |
| <b>Sustancias solubles en etanol 50 %</b> | 20,66/1,05                                 |
| <b>Sustancias solubles en etanol 80 %</b> | 11,82/1,37                                 |
| <b>Cenizas totales</b>                    | 10,16 / 0,28                               |
| <b>Cenizas solubles en agua</b>           | 4,15 / 0,28                                |
| <b>Cenizas insolubles en HCL al 10 %</b>  | 0,28/0,05                                  |

Considerando los resultados obtenidos en la determinación de sustancias solubles, donde los disolventes con mayor poder extractivo fueron las mezclas hidroalcohólicas al 30 y 50 %, se procedió a la obtención de extractos a partir del material vegetal. Se analizaron desde el punto de vista físico-químicos donde fueron considerados los aspectos siguientes: propiedades organolépticas (olor y color), análisis del pH, densidad relativa, sólidos totales, índice de refracción y contenido alcohólico. En la tabla 3 se muestran los resultados de los diferentes estudios.

**Tabla 3.** Parámetros físico-químicos de los extractos de *T. lucida*

| <b>Parámetros</b>                 | <b>Resultados obtenidos (<math>\bar{X}/S</math>)</b> |                         |
|-----------------------------------|--|-------------------------|
|                                   | <b>Extracto al 30 %</b>                              | <b>Extracto al 50 %</b> |
| <b>Propiedades organolépticas</b> | Líquidos traslúcidos de color ámbar y                |                         |

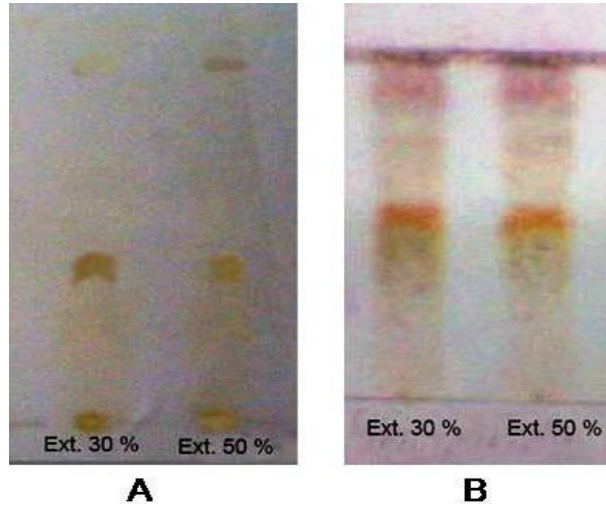
|                                 | olor aromático (anís) |            |
|---------------------------------|-----------------------|------------|
| <b>pH</b>                       | 5,71/0,01             | 6,00/0,005 |
| <b>Sólidos totales (%)</b>      | 3,09/0,14             | 2,61/0,11  |
| <b>Índice de refracción</b>     | 1,347/0,00            | 1,354/0,0  |
| <b>Densidad relativa (g/mL)</b> | 0,9819/0,0            | 0,9476/0,0 |
| <b>Contenido alcohólico (%)</b> | 25/1,01               | 46/1,24    |

En la estandarización de productos herbarios se integran un conjunto de técnicas analíticas modernas, con el objetivo de lograr una huella dactilar de ese preparado y poder identificar el o los marcadores químicos que están relacionados con el efecto terapéutico. En la investigación realizada se estimó el perfil fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos al 30 y 50 %. Se realizó un análisis por cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución y determinación cuantitativa de fenoles.

El análisis por cromatografía en capa delgada de los dos extractos se muestra en la figura 3. Al revelar con solución metanólica al 5 % de tricloruro de aluminio (figura 3A), algunas manchas intensificaron su color amarillo, lo que pudiera ser indicativo de la presencia de flavonoides. Al revelar con anisaldehído (figura 2B) se aparecieron varias manchas, siendo notoria la presencia de una mancha de color naranja en cada extracto, también indicativo de estructuras tipo flavonoides.

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución permitió constatar que los extractos mantenían un perfil muy parecido. La diferencia fundamental estuvo en la intensidad de los picos, siendo menor en el extracto hidroalcohólico al 50 %. En la figura 4 se refleja el cromatograma CLAR.

El contenido de fenoles totales varió de una muestra a otra, siendo mayor para el extracto hidroalcohólico al 30 %. En la tabla 4 se muestran los resultados.

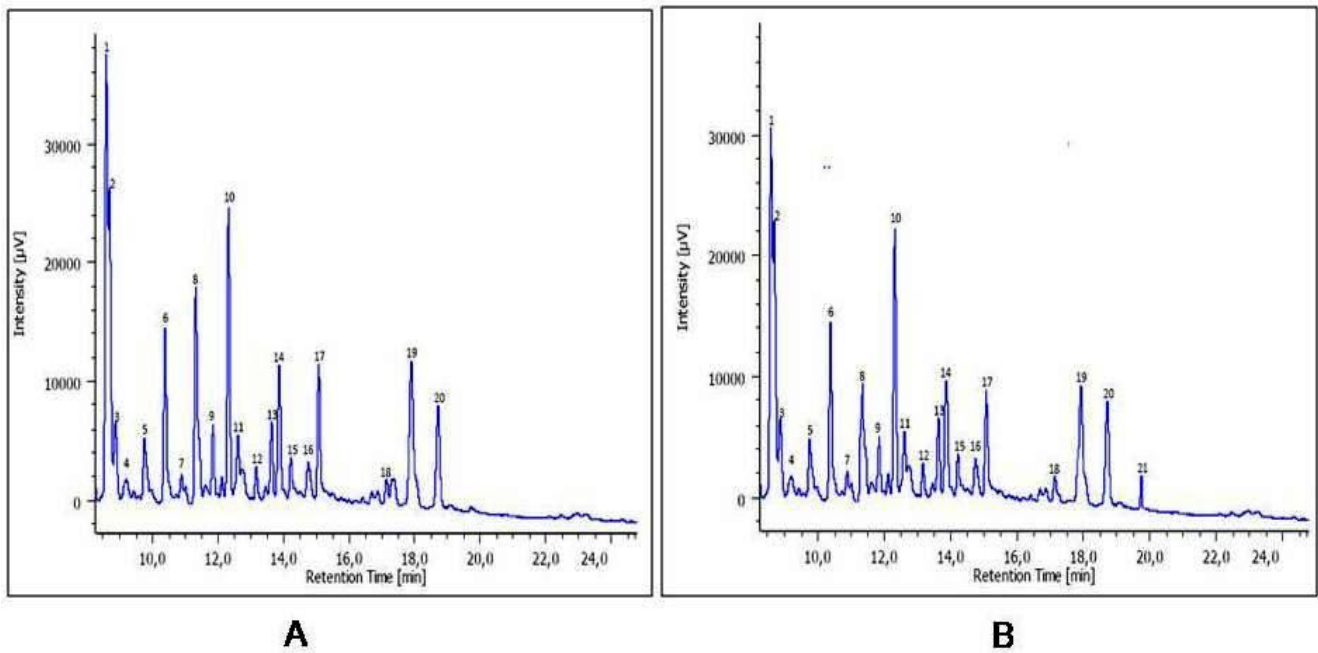


**Figura 3: Cromatograma de los extractos de *T. lucida***

Soporte: gel de sílice sobre soporte de aluminio

Fase móvil: cloroformo: metanol: n-propanol: agua (5:6:1:4)

**A:** revelado con solución metanólica al 5 % de tricloruro de aluminio, **B:** revelado con anisaldehído.



**Figura 4. Cromatogramas CLAR de los extractos hidroalcohólicos de *T. lucida***

**A:** extracto al 30 %, **B:** extracto al 50 %.

**Tabla 4. Contenido de fenoles totales en los extractos de *T. lucida***

| Extractos | Fenoles totales (mg/mL) |
|-----------|-------------------------|
|           | $\bar{X} / S$           |
| 30 %      | 7,24/0,71               |
| 50 %      | 6,67/0,34               |

Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante mediante el ensayo de FRAP se presentan en la tabla 5. Los valores de densidad óptica de las muestras evaluadas difieren de la sustancia de referencia (Vitamina C, reconocido antioxidante). El valor encontrado para todos los extractos es superior a dicho patrón, lo cual demuestra la elevada capacidad reductora de los mismos a una concentración de 30 µg/mL.

**Tabla 5. Actividad antioxidante por la técnica FRAP**

| Muestras  | Densidad óptica |
|---|-----------------|
|   | $\bar{X} / S$   |
| <b>Vitamina C<br/>(sustancia de referencia)</b> | 0,632/0,001     |
| <b>Extracto al 30 %</b>                         | 0,992/0,003     |
| <b>Extracto al 50 %</b>                         | 0,824/0,009     |

### Discusión

Los resultados del estudio macromorfológico realizado a las hojas en cuanto a las características y dimensiones, concuerdan en términos generales con la descripción reflejada en la literatura (Germosén-Robineau, 1997). Otras características como el tipo de nervadura y textura no habían sido descritas con anterioridad para la especie.

El estudio micromorfológico de la droga en polvo permitió visualizar una serie de estructuras no descritas con para la planta, siendo evidente numerosos estomas del tipo anomocítico; estas estructuras anatómicas son las encargadas de realizar el intercambio gaseoso del vegetal con el medio, en este caso, los mismos parecen estar en fase abierta, lo cual puede ser un indicador de que las condiciones de humedad y temperatura estaban en equilibrio.

En la determinación de los parámetros físico-químicos de calidad del material vegetal el primer parámetro evaluado fue el contenido de humedad residual por el método azeotrópico; el promedio de las determinaciones estuvo en el intervalo exigido (8-14 %), lo que demostró la eficiencia del proceso de secado (estufa de recirculación de aire a 35° C).

La determinación de sustancias solubles es uno de los índices numéricos más importantes para seleccionar los mejores disolventes en el proceso de extracción. Se utilizaron cuatro menstros y los resultados revelaron que se obtiene mayor rendimiento de sustancias extraíbles con las mezclas hidroalcohólicas al 30 y 50 %.

Las cenizas son indicativas de la calidad del material con que se trabaja y constituye una base para juzgar su pureza e identidad, brindando información relativa a la posible adulteración con materias inorgánicas o cuerpos extraños que posea la droga, aunque también están en dependencia de la composición en minerales de los suelos (Miranda y Cuéllar, 2001). Las Farmacopeas y normas plantean un índice de cenizas totales de hasta un 5 % (Lou Zhi-cen, 1980; WHO 1998). El valor obtenido fue algo elevado. Las cenizas solubles en agua, son indicativa de la presencia de metales alcalinos y alcalinotérreos, mientras que las insolubles en ácido, pueden estar relacionadas a la presencia de metales pesados, este último no sobrepasa el 2 %, límite establecido por la literatura (Lou Zhi-cen, 1980; WHO 1998).

Al determinar los parámetros físico-químico de calidad a los extractos se evidenció que el mayor porcentaje de sólidos totales correspondía al extracto hidroalcohólico 30 %, lo cual está en correspondencia con los resultados obtenidos en la determinación de sustancias extraíbles. Las diferencias en los resultados pudieron estar condicionadas por la polaridad del disolvente empleado, propiciando mayor extracción de metabolitos polares.

El contenido alcohólico, fue otra de las cuantificaciones realizadas a los extractos como medida de su calidad; en este caso, el valor alcanzado tras la determinación inicial estuvo muy cercano al porcentaje de la mezcla hidroalcohólica con que fueron elaborados los extractos (mezcla hidroalcohólica al 30 y 50 %).

Respecto al comportamiento cromatográfico de los extractos en capa delgada, es de señalar que la fase móvil empleada logró separar de alguna manera los componentes según su polaridad, pudiendo sugerir la presencia de flavonoides. No se observaron diferencias en la apariencia total de los extractos evaluados. En el análisis por CLAR los extractos también mostraron un perfil similar

El contenido de fenoles totales en los extractos fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu, donde el reactivo utilizado es una mezcla de ácidos de coloración amarilla (fosfowolfrámico y fosfomolibdico), que al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes en una preparación, dan lugar a óxidos de color azul (óxidos de wolframio y molibdeno) que exhiben un máximo de absorción a 765 nm, lo cual permite su cuantificación por espectroscopia de UV/VISIBLE. La intensidad de la absorción de luz a esa longitud de onda, es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos, la cual se expresa en equivalentes de ácido gálico. El contenido de fenoles totales fue mayor para el

extracto hidroalcohólico al 30 % lo que pudiera estar asociado con el poder extractivo del disolvente empleado.

La elevada actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico al 30 % está en correspondencia con el mayor contenido de fenoles totales. Lo anterior sugiere, que dichos compuestos, están relacionados de manera muy directa con la actividad antes descrita (Faustino *et al.*, 2010; Dejan *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos permitirán validar a *T. lucida* como una alternativa terapéutica a tener en cuenta dentro de nuestra Medicina Natural y Tradicional.

### Referencias bibliográficas

- Acosta L, Hecheverría I, Rodríguez C, Milanés M. Momento óptimo de plantación y cosecha en *Tagetes lucida* Cav. Revista cubana de plantas medicinales. Editorial ciencias médicas. Ciudad de la Habana. 2011;16 (2).
- Acosta L, Hecheverría I, Rodríguez C. Estudios preliminares para el establecimiento del cultivo de *Tagetes lucida* Cav. Revista cubana de plantas medicinales. Editorial ciencias médicas. Ciudad de la Habana. 2010;15(1).
- Aquino R, Cáceres A, Morelli S, Rastrelli L. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. J Nat Prod. 2002;65(12):1773-6.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power". The FRAP assay. Anal. Biochem. 1996;239:70-76.
- Céspedes CL, Avila JG, Martínez A, Serrato B, Calderón-Mugica JC, Salgado-Garciglia R. Antifungal and antibacterial activities of mexican tarragon (*Tagetes lucida*). J Agric Food Chem. 2006;54(10):3521-7.
- Chlopicka J, Pasko P, Gorinstein S, Jedryas A, Zagrodzki P. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. LWT- Food Science and Technology 2012;46:548-555.
- Ciccio JF. A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. Rev Biol Trop. 2004;52(4):853-857.
- Dejan ZO, Neda MMD, Marina M. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. Chemistry Central Journal 2011;5:34.
- Faustino H, Gil N, Baptista C and Duarte AP. Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. Molecules 2010;15:9308-9322.
- García K. Temazcalli. Un recinto de sanación: Salud y sexualidad de la mujer. 2011;3(1):8-9.

- Gattuso MA, Gattuso SJ. Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Editorial de la Universidad nacional de Rosario Urquiza. Argentina. ISBN N<sup>o</sup> 950-673-199-3. 1999.
- Germosén-Robineau L. Farmacopea vegetal caribeña. 1<sup>ra</sup> edición. Ediciones Emile Desormeaux. Martinique, 1997:317-319.
- Lou Zhi-cen. General control methods for vegetable drugs. Comparative study of methods included in thirteen pharmacopoeias and proposals on their international unification. WHO/PHARM/80.502, 1980:8-39.
- Martínez ML, Bettucci G, Gattuso M, Cortadi A. Caracteres micrográficos analíticos de hojas, tallos, inflorescencias-flores de *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae – Helenieae). Farmacobotánica. Área Biología Vegetal. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531, Rosario (S2002LRK), Santa Fe, Argentina. Dominguezia. 2013; 29(1).
- Miranda MM, Cuéllar AC. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana, 2000:25-49, 74-79.
- NRSP 309. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo, 1992:16-29.
- Rosales AC. Estudio de la biología celular, modo de reproducción y viabilidad de semilla de seis poblaciones de Pericón *Tagetes Lucida* Cav. Nativas de Guatemala. "Tesis en opción al título de licenciado en Biología". Universidad de San Carlos y Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 1995.
- WHO. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO/PHARM/92.559. Ginebra. 1998.