



**Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

TESIS:

**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE *Tagetes filifolia* (ANISILLO) FRENTE A
*Candida albicans***

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**BACHILLER: BUSTAMANTE MELO, SANDRA
ASESORA: MG. JARAMILLO BRICEÑO, MARILÚ R.**

**LIMA – PERÚ
2018**

DEDICATORIA

En principio, a Dios, Todopoderoso que atestigua cada esfuerzo; a mis padres, por darme la vida, a mis hermanos quienes confiaron siempre en mí; a mis docentes, que supieron impartir sabiduría e inspiración. A la humanidad, que espera el aporte científico para el progreso global.

AGRADECIMIENTO

Mis agradecimientos sinceros a la Mg. Marilú R. Jaramillo Briceño, por su valiosa colaboración y asesoramiento; a la Blga. Fanny Cárdenas B., quien me guio en el trascurso de la investigación; al Ing. Pedro Romero y a todas las personas que colaboraron en el desarrollo y culminación de la presente investigación.

ÍNDICE

<i>Dedicatoria</i>	ii
<i>Agradecimiento</i>	iii
<i>Índice</i>	iv
<i>Índice de cuadros</i>	viii
<i>Índice de figuras</i>	ix
<i>Índice de gráficos</i>	x
<i>Resumen</i>	xi
<i>Abstract</i>	xii
<i>Introducción</i>	xiii

CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática	15
1.2 Problemas de Investigación	16
1.2.1 Problema General	16
1.2.2 Problemas Específicos	16
1.3 Objetivos de la Investigación	17
1.3.1 Objetivo General	17
1.3.2 Objetivos Específicos	17
1.4 Justificación, importancia y limitaciones de la Investigación	17
1.4.1 Justificación de la investigación	17
1.4.2 Importancia de la investigación	18
1.4.3 Limitaciones de la investigación	18

CAPÍTULO II HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Hipótesis de la Investigación	19
2.1.1 Hipótesis General	19
2.1.2 Hipótesis Específica	19
2.2 Variables de la Investigación	20
2.2.1 Identificación y clasificación de variables	20
2.2.2 Operacionalización de variables	20

CAPÍTULO III MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes de la investigación	21
3.1.1 Antecedentes Nacionales	21
3.1.2 Antecedentes Internacionales	27
3.2 Bases Teóricas	31
3.2.1 Los aceites esenciales	31
3.2.1.1 Características Generales de los aceites esenciales	32
3.2.1.2 Clasificación de los aceites esenciales	39
3.2.1.3 Aplicaciones y usos de los aceites esenciales	40
3.2.2 Metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas	46
3.2.3 Métodos de extracción de los aceites esenciales	51
3.2.3.1 Destilación con agua o hidrodestilación	51
3.2.3.2 Destilación por arrastre de vapor	53
3.2.3.3 Procesos de expresión aplicados a los cítricos	54
3.2.3.4 Extracción con disolventes	55
3.2.3.5 Extracción con fluidos supercríticos	55
3.2.4 Los extractos	56
3.2.4.1 Los extractos fluidos o líquidos	56
3.2.4.2 Los extractos secos	56
3.2.4.3 Los extractos blandos o semisólidos	57
3.2.4.4 Métodos de extracción de los extractos	57
3.2.5 <i>Tagetes filifolia</i> Lag (anisillo)	59
3.2.5.1 Clasificación Taxonómica	59
3.2.5.2 Hábitat y distribución geográfica	60
3.2.5.3 Descripción Botánica	60
3.2.5.4 Composición química	60
3.2.5.5 Propiedades Medicinales	61
3.2.6 Hongos	61
3.2.6.1 Generalidades	61
3.2.6.2 Infecciones fúngicas	62
3.2.7 <i>Candida albicans</i>	63
3.2.7.1 Características microbiológicas	63

3.2.7.2 Clasificación taxonómica	65
3.2.7.3 Patogenia	65
3.2.7.4 Epidemiología	68
3.2.8 Candidiasis	71
3.2.8.1 Generalidades	71
3.2.8.2 Tipos de candidiasis	72
3.2.9 Método para Evaluar la Actividad Antimicótica	75
3.2.9.1 Método de Kirby – Bauer (método de difusión en agar)	75
3.3 Definición de términos básicos	76

CAPÍTULO IV METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Tipo y nivel de investigación:	78
4.1.1 Tipo de investigación	78
4.1.2 Nivel de Investigación	78
4.2 Método y diseño de la investigación:	78
4.2.1 Método de la investigación	78
4.2.2 Diseño de la investigación	79
4.3 Población y muestra de la investigación	79
4.3.1 Población:	79
4.3.2 Muestra:	79
4.4 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos	79
4.4.1 Técnicas	79
4.4.2 Instrumentos de recolección de datos	80
4.5 Procedimiento	80
4.5.1 Identificación Taxonómica	80
4.5.2 Preparación del extracto etanólico de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	81
4.5.3 Extracción del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	82
4.5.4 Marcha fitoquímica	84
4.5.5 Determinación de la actividad antimicótica por el método de difusión en agar según Kirby –Bauer	85

**CAPÍTULO V PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE
LOS RESULTADOS**

5.1 Análisis de tablas y gráficos e interpretación 88

5.2 Discusión 94

CONCLUSIONES 97

RECOMENDACIONES 98

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

ANEXOS 104

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1 Pruebas bioquímicas para <i>Candida albicans</i>	65
Cuadro N° 2 Características del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	88
Cuadro N° 3 Solubilidad del aceite esencial <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	89
Cuadro N° 4 Marcha fitoquímica del extracto etanólico de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Componentes monoterpenos presentes en algunos aceites esenciales	34
Figura N° 2 Componentes sesquiterpenos de algunos aceites esenciales	35
Figura N° 3 Planta de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	59
Figura N° 4 Morfología del hongo <i>Candida albicans</i>	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico N°1 Actividad antimicótica del extracto etanólico de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	91
Grafico N°2 Actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	92
Grafico N°3 Actividad antimicótica del aceite esencial y extracto etanólico de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	93

RESUMEN

La investigación realizada tuvo como objetivo determinar la actividad antimicótica que presenta *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

El recurso vegetal de *Tagetes filifolia* (anisillo) fue recolectada en la provincia de Concepción en el departamento de Junín a 3 443 m.s.n.m. La obtención del aceite esencial, a partir de las hojas y tallos se obtuvo por la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua y el extracto etanólico, por maceración en etanol al 70°, a este último se ejecutó la marcha fitoquímica. Para la evaluación de la actividad antimicótica se realizó al 100% mediante el método de difusión en placa, según Kirby – Bauer.

En el resultado de la investigación, se evidenció que *Tagetes filifolia* (anisillo) presentó actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231 con un promedio de halo de inhibición de 11.55 mm para el aceite esencial y para el extracto etanólico fue de 13.28 mm, así mismo se identificó a través del screening fitoquímico cualitativo la presencia de carbohidratos, carbohidratos reductores, compuestos fenólicos, taninos, antraquinonas, flavonoides y trazas de alcaloides.

Es por ello que se concluye que *Tagetes filifolia* (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231 esto probablemente a la presencia de sus metabolitos secundarios.

Palabras claves: *Tagetes filifolia*, *Candida albicans*, actividad antimicótica.

ABSTRACT

The objective of the research was to determine the antifungal activity of *Tagetes filifolia* (anisillo) against *Candida albicans* ATCC 10231.

The vegetal resource of *Tagetes filifolia* (anisillo) was collected in the province of Concepción in the department of Junín at 3 443 m.s.n.m. The essential oil obtained from the leaves and stems was obtained by the steam distillation technique and the ethanolic extract, by maceration in 70 ° ethanol, to the latter the phytochemical march was carried out. For the evaluation of antifungal activity, 100% was carried out using the plate diffusion method, according to Kirby - Bauer.

In the result of the investigation, it was evidenced that *Tagetes filifolia* (anisillo) presented antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231 with an average inhibition halo of 11.55 mm for the essential oil and for the ethanolic extract was 13.28 mm, likewise The presence of carbohydrates, reducing carbohydrates, phenolic compounds, tannins, anthraquinones, flavonoids and alkaloid traces was identified through qualitative phytochemical screening.

That is why it is concluded that *Tagetes filifolia* (anisillo) presents antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231 this probably in the presence of its secondary metabolites.

Key words: *Tagetes filifolia*, *Candida albicans*, antifungal activity.

INTRODUCCION

El Perú es un país que cuenta con una enorme biodiversidad de recursos naturales y se caracteriza por contar con una gran cantidad de especies vegetales nativas y silvestres con propiedades medicinales. Desde épocas remotas hasta la actualidad, se usan de forma empírica por sus propiedades terapéuticas en la prevención, tratamiento y cuidado de la salud. Muchos de estos recursos vegetales contienen metabolitos secundarios; por ejemplo, taninos, flavonoides, terpenoides y alcaloides a los que se les atribuye propiedades antibacterianas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, antimicóticas, antihelmínticas, astringentes y antitumorales.

Entre las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentra el uso de las especies medicinales. Por lo que se considera necesario realizar investigaciones con la finalidad de comprobar y validar de forma científica las propiedades terapéuticas que la población les atribuye a fin de contar con información veraz y confiable respecto al uso de las mismas. De esta manera, se podría establecer la efectividad, el principio activo, la dosificación terapéutica y el modo de administración de las plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades.

Uno de los problemas de salud pública son las infecciones fúngicas mucosas e invasivas. Siendo las más comunes las ocasionadas por *Candida albicans*, que puede causar severos problemas de salud. en pacientes con tratamientos prolongados de corticosteroides, antibióticos de amplio espectro, fármacos citotóxicos, los diabéticos, en trastornos inmunológicos, son particularmente susceptibles a contraer candidiasis sistémica.

Una alternativa de solución a esta problemática sería la aplicación de la medicina tradicional, principalmente en la población con bajos recursos económicos. Por lo que se propone el estudio de extractos y aceites esenciales del recurso vegetal *Tagetes filifolia* (anisillo), ya que existen investigaciones en las que se ha

identificado los componentes mayoritarios de su aceite esencial que son el trans-anetol y el estragol. Dichos componentes también se encuentran en otras especies y se ha reportado que le otorgan propiedades antioxidante, antimicótica y antimicrobiana. Es por ello, que el objetivo de la investigación fue determinar la actividad antimicótica de *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans*.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

Los fármacos antifúngicos que se emplean en la actualidad no siempre suelen ser eficaces debido al uso irracional de estos. Ya que generan problemas como toxicidad hepática, resistencia, reacciones adversas e interacciones farmacológicas. Además, la terapia antifúngica tiene un elevado costo y, en muchas ocasiones, se produce el fracaso del tratamiento trayendo como consecuencia períodos de hospitalización prolongados, complicaciones, entre otros.

Según la Organización Mundial de la Salud, actualmente, un 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica.^{1,2} Su empleo se basa, sobre todo, en el uso de especies vegetales que poseen propiedades terapéuticas de sus extractos y aceites esenciales que se extraen de ellas. Esta acción sin garantía alguna podría significar un riesgo para la salud de no ser científicamente verificada su efectividad.

El Perú es un país, el cual existe una diversidad de flora silvestre, tal es así que dentro de la pluralidad de las especies silvestres tenemos *Tagetes filifolia* (anisillo) que crece de forma espontánea en la región alto andina, y que se encuentra al alcance de los pobladores quienes no dudan en emplear exclusivamente como medicina alternativa para aliviar los cólicos estomacales, flatulencia, ello gracias a la acción antiespasmódica que presenta dicha especie vegetal.

Asimismo, el extracto etanólico y el aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) han demostrado actividad antioxidante y antibacteriana; por esta razón, es conveniente realizar estudios de investigaciones a efecto de determinar si también presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

1.2 Problemas de Investigación

1.2.1 Problema General

¿Presenta actividad antimicótica *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans* (ATCC 10231)?

1.2.2 Problemas Específicos

P.E.1: ¿Presenta actividad antimicótica el extracto etanolito de *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans* (ATCC 10231)?

P.E.2: ¿Presenta actividad antimicótica el aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans* (ATCC 10231)?

P.E.3: ¿Cuáles son los metabolitos contenidos en los productos obtenidos de *Tagetes filifolia* (anisillo)?

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar si *Tagetes filifolia* (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC10231).

1.3.2 Objetivos Específicos

O.E.1: Determinar si el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC10231).

O.E.2: Determinar si el aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC10231).

O.E.3: Identificar los metabolitos contenidos en los productos de *Tagetes filifolia* (anisillo).

1.4 Justificación, importancia y limitaciones de la Investigación

1.4.1 Justificación de la investigación

Tomando en cuenta que uno de los problemas de la salud pública son las infecciones fúngicas; siendo las más frecuentes las candidiasis, causada en la mayoría de casos por *Candida albicans*. Estas infecciones han incrementado en las últimas décadas de manera importante. Llegando a originar candidiasis

superficiales o sistémica. Se realizó este trabajo para contribuir con las investigaciones de los recursos vegetales, estableciendo nuevas líneas de investigación, en búsqueda de alternativas eficaces y seguras provenientes de productos naturales donde sus fitocomponentes presenten menos efectos indeseables en comparación de los fármacos sintéticos. Además, conocer las propiedades antimicrobianas in vitro y de esta forma demostrar científicamente la actividad antimicótica de *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans* (ATCC10231).

1.4.2 Importancia de la investigación

El haber comprobado la actividad antimicótica de los productos obtenidos a partir de *Tagetes filifolia* (anisillo), permite aportar evidencia científica que sirve como precedente para desarrollar investigaciones orientadas a la formulación de fitomedicamentos constituyendo un nueva alternativa natural, económica, eficaz y segura para el tratamiento de las infecciones causadas por *Candida albicans*. Asimismo, impulsar la conservación de las especies naturales y promover su cultivo.

1.4.3 Limitaciones de la investigación

Las limitantes de la presente investigación fueron los escasos estudios publicados sobre las propiedades antimicrobianas de *Tagetes filifolia* (anisillo).

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Hipótesis de la Investigación

2.1.1 Hipótesis General

Tagetes filifolia (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC10231).

2.1.2 Hipótesis Especifica

H.E.1: El extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC10231).

H.E.2: El aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC10231).

H.E.3: Los metabolitos mayoritarios presentes en los productos obtenidos de *Tagetes filifolia* (anisillo) son los compuestos fenólicos.

2.2 Variables de la Investigación

2.2.1 Identificación y clasificación de variables

El presente trabajo es univariado.

- Actividad antimicótica de *Tagetes filifolia* (anisillo)

2.2.2 Operacionalización de variables

Variable Dependiente	Dimensión conceptualización	Indicador	Escala	Tipo
Actividad antimicótica de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	Capacidad de inhibir el crecimiento micótico que se desarrolla en un medio de cultivo. (según Stuttman & Fishbein)	Diámetro de halo de inhibición	Nominal	cuantitativa

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO III MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes de la investigación

3.1.1 Antecedentes Nacionales

En la investigación realizada por Sánchez Humala, R et. al. **Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de *Tagetes filifolia* Lag (pacha anís)** (2017), trabajo realizado en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología de la Universidad San Martín de Porres. Lima-Perú. Presento como objetivo evaluar la actividad antioxidante e identificar los componentes químicos que se encuentran presentes en los extractos acuosos, etanólicos y etéreos de los capítulos de *Tagetes filifolia* Lag. Para lo cual los extractos se trabajaron en diferentes concentraciones de 100µg/ml, 50µg/ml, 5µg/ml. Mediante el método de captación del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), en el que consistió en evaluar la potencia antioxidante mediante el barrido de radicales libres. Y del registro de la densidad óptica de los radicales libres de DPPH midieron el descenso en la absorbancia a 517 nm, según Brand

Williams. Como sustancia de referencia emplearon el ácido ascórbico por la capacidad ideal de captación de radicales libres. Utilizando el método cribado fitoquímico, donde se identifica cualitativamente la presencia de los compuestos químicos presentes en los extractos. Los resultados obtenidos presentaron capacidad antioxidante del extracto etanólico a 100 µg/ml (91.26 %), el extracto etéreo (88.94%) y el extracto acuoso (75.58%) a 50 µg/ml para el extracto etanólico (89.71%), el extracto etéreo (93.57%), extracto acuoso (47.30%) y a 25 µg/ml extracto etanólico (15.68%), el extracto etéreo (27.5%) y el extracto acuoso (6.16%). En la investigación se identificaron la presencia de quinonas en los extractos etanólico y acuoso, hallándose solo en el extracto etanólico compuestos fenólicos. Concluyeron que los extractos acuosos, etanólicos y etéreos de *Tagetes filifolia* Lag presenta actividad antioxidante, pero el que presento mayor porcentaje de captación de radiales libre con un 91.26% fue el extracto etanólico a 100ug/ml y los principales componentes químicos presentes en *Tagetes filifolia* Lag fueron fenoles y quinonas. ³

En la investigación realizada por Jara Villarreal, L. **Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo) sobre cepas de *Escherichia coli*** (2015). Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la Universidad Alas Peruanas. Lima-Perú. Presento por objetivo determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo) y establecer la concentración óptima antibacteriana sobre cepas de *Escherichia coli*. La obtención del aceite esencial fue por el método de destilación por arrastre con vapor de agua, el mismo que fue sometido a un estudio fitoquímico cualitativo para la identificación de sus componentes químicos que se encuentran

en el aceite esencial. Para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes filifolia* frente a cepas de *Escherichia coli* empleo el método de difusión en disco o Kirby Bauer, mediante el crecimiento de halo de inhibición en concentraciones de 75%, 50% y 25%. Los resultados indican que el aceite esencial de *Tagetes filifolia* posee actividad antibacteriana al 75% con un halo de inhibición de 24.02 mm promedio, mientras las concentraciones de 50% 16.83 mm de diámetro y al 25% no presento actividad antibacteriana significativa. El estudio fitoquímico revelo presencia de glucósidos, flavonoides, quinonas, aminoácidos, compuestos fenólicos, taninos, resinas, alcaloides, saponinas y lactonas. Concluyó que el aceite esencial de las hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo) tiene actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, podría deberse a sus compuestos fenólicos.⁴

En la investigación realizada por Tuyo Llipita. L. **Efecto de la actividad antimicótico in vitro del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a *Candida albicans*.** (2015), tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. frente a *Candida albicans*, e identificar sus metabolitos secundarios que se encuentran presentes en el aceite esencial. Para la extracción del aceite esencial empleo las hojas y tallos fue por el método de destilación por arrastre con vapor de agua. Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta* L., se evaluó por el método de difusión en disco o Kirby Bauer, para lo cual utilizaron volúmenes de 2.5µl, 5.0µl, 7.5µl, 10µl, 15µl y 20µl. Asimismo la identificación cuantitativa y cualitativa de sus metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial,

mediante Cromatografía Gaseosa con detección de masas. Los resultados obtenidos evidenciaron formación de halos de inhibición de 11, 17, 24, 28, 32 y 46 mm de diámetro. Los metabolitos secundarios del aceite esencial de *Tagetes minuta* L., revelo que los componentes con mayor presencia son: 1-Dodeceno o alfa-Dodeceno (17.76%); 1-Trideceno (41.4%) y limoneno (3.47%). Concluye que el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* y la identificación de los compuestos químicos, principalmente monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados y los compuestos derivados de alcoholes.⁵

En la investigación efectuada por Segovia Barrientos, I.K. et al. **Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith “Chincho” y actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica** (2010). Trabajo realizado en el Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. El objetivo fue determinar los componentes químicos, así como la actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith. Mediante el método de destilación de arrastre con vapor de agua se obtuvo el aceite esencial de las hojas frescas, para lo cual posteriormente realizo concentraciones de 10%, 50% y 100%. En la identificación de los fitocomponentes se realizó un análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas. Para la determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica fue por el método de difusión en agar o Kirby Bauer y la dilución en agar para la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Basillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* y *Candida albicans*, mediante el crecimiento de halo de inhibición.

La determinación de la actividad antioxidante se realizó por la Captación del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH) se basa en la reducción del radical libre estable, 2,2 – difenil picril hidrazilo que dona el antioxidante (sustancia atrapadora de radicales libres). Se cuantifica midiendo la reducción de la absorbancia a 517nm. Los resultados obtenidos de los componentes químicos cualitativa nos indica que está conformado: 2-metil-1-butil acetato; 2(10)- pineno, 1r- α -pineno, 1-verbenona, α -cadinol, forbol, ambrosin, butanimida, isocariofileno. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*, para *Staphylococcus aureus* mediante el crecimiento de halo de inhibición de 15.56 mm al 100%, para *Staphylococcus epidermidis* presento un halo de inhibición de 56 mm al 100%, para *Bacillus subtilis* la actividad fue con un halo de inhibición de 0.58 mm, para *Escherichia coli* la actividad fue con un halo de inhibición de 1.41 mm, para *Pseudomonas aeruginosa* la actividad fue con un halo de inhibición de 6.93 mm y para *Candida albicans* la actividad antifúngica fue con un halo de inhibición de 0.71 mm y frente *Klebsiella* presento resistencia. El aceite esencial no reportó actividad antioxidante significativa en comparación de la sustancia de referencia. Concluyendo que los compuestos químicos presentes en el aceite esencial de las hojas de *Tagetes elliptica Smith* presento actividad antibacteriana frente a los microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, presento actividad antifúngica frente a *Candida albicans*.⁶

En la investigación efectuada por Bonilla R, P, et al. Titulada **Efecto de la gravidez, la prolactina y hormonas sexuales en ratas del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo)** (2008). Trabajo realizado en el Instituto de

Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la universidad Nacional Mayor de san Marcos. Lima-Perú. El objetivo fue demostrar el efecto sobre la gravidez, la prolactina y hormonas sexuales de los metabolitos secundarios contenidos en el subextracto metanólico de las hojas de *Tagetes filifolia* Lag. El extracto se obtuvo por maceración etanólica de las hojas de *Tagetes filifolia* Lag. A partir del extracto seco total mediante cromatografía en columna rápida con solventes de polaridad creciente, se obtuvo el subextracto metanólico; para realizar los ensayos químicos y biológicos, utilizaron el método de Rami Srivastavas, et al, para lo cual emplearon 36 ratas Holtzmann entre machos y hembras, en tres grupos formados por 12 ratas 6 machos y 6 hembras. Grupo 1 recibió suero fisiológico 2ml/kg. Grupo 2 recibió 200ml/kg del subextracto metanólico de las hojas de *Tagetes filifolia* Lag. Grupo 3 recibió metoclopramida 15mg/kg, diariamente por vía oral durante 18 días. Asimismo, se realizó la marcha fitoquímica para la identificación de sus fitocomponentes presentes en el subextracto metanólico con reactivos de coloración y precipitación, Los resultados indicaron que el extracto de *Tagetes filifolia* Lag administrado en ratas machos, mostraron variaciones mínimas de testosteronas ($p < 0.418$); en hembras hubo más ratas grávidas ($p < 0.022$), hubo un incremento de progesterona, estrógenos y prolactina. Llegaron a la conclusión que en ratas macho no afecta la producción de testosterona, mientras que en ratas hembras produce aumento de la gravidez. Por ende, los efectos de la especie vegetal *Tagetes filifolia* Lag podrían deberse a sus compuestos fitoquímicos encontrados en la marcha fitoquímica, donde encontraron compuestos fenólicos como flavonoides y alcaloides.⁷

3.1.2 Antecedentes Internacionales

En la investigación realizada por Uvidia Ortiz, R.A. Titulada **Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus*, Y *Tagetes minuta* L.** (2012). Tesis para optar el título de Bioquímico Farmacéutico de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba - Ecuador. El objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana de especies vegetales como *Duranta triacanta*, *Callistemon speciosus* y *Tagetes minuta* L frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e identificación de los grupos fitoquímicos que se encuentran presentes en los extractos etanólicos. Por el método de maceración se obtuvieron los extractos etanólicos de *Duranta triacanta* Juss y *Tagetes minuta*, para lo cual se utilizó hojas y tallos, en el caso de *Callistemon speciosus* únicamente las semillas y por inmiscibilidad sus correspondientes subextractos etéreo y clorofórmico. Se determinó la actividad antimicrobiana que se trabajó a diferentes concentraciones de 10.000µg/ml, 1.000µg/ml y 100µg/ml en los subextractos. etéreos y clorofórmicos con 10.000µg/ml. Lo efectuó por el método de Mitscher, mediante la clasificación de tres parámetros de estudio: activo, parcialmente activo e inactivo Por el screening fitoquímico permite identificar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en las especies vegetales, mediante las reacciones de coloraciones y formación de precipitados. En los resultados se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184,

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. a 10.000 µg/mL, los extractos etanólicos de los vegetales estudiados presentan actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y únicamente *Callistemon speciosus* es parcialmente activo para *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; a 1.000µg/mL el extracto etanólico de *Callistemon speciosus* es activo para *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los subextractos etéreos de *Tagetes minuta* L y *Callistemon speciosus* inhiben a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, el subextracto clorofórmico de *Callistemon speciosus* es parcialmente activo para *Salmonella gallinarum* y *Klebsiella pneumoniae*. Se comprobó la presencia de aceites esenciales, flavonoides y terpenos en los extractos etanólicos. Concluyeron que los extractos *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus* y *Tagetes minuta* L y sus respectivos subextractos etéreos y clorofórmicos presentan actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados ya sea de forma parcial y total. El screenig fitoquímico determino la presencia de taninos y alcaloides para *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus* presento monoterpenos y *Tagetes minuta* L flavonoides, taninos y aceite esencial.⁸

En la investigación realizada a cabo por Tapia Contero, J.A. **Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*** (2012). Tesis para optar el título de Bioquímico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. El objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos y subextractos sobre

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* 10231, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y la identificación de los grupos fitoquímicos presentes en los extractos. Mediante maceración en etanol al 96° se obtuvieron los extractos de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*, y la obtención de los subextractos por extracción líquido - líquido con solventes inmiscibles (éter y cloroformo). Para la determinación de la actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de Mitscher mediante la clasificación de tres parámetros de estudio: activo, parcialmente activo e inactivo se trabajó a diferentes concentraciones 10.000µg/ml, 1.000µg/ml y 10µg/ml y solo a 10.000µg/ml para los subextractos. Por el screening fitoquímico nos permite identificar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en las especies vegetales, mediante las reacciones de coloraciones y formación de precipitados. Los resultados obtenidos para *Senna multijuga*, indica que el subextracto etéreo presenta actividad inhibitoria para *Staphylococcus aureus*; el subextracto clorofórmico actividad parcial para *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto etanólico inicial (10.000µg/ml, 1000 µg/ml) de *Tagetes zipaquirensis* tiene actividad para *Candida albicans*, el subextracto etéreo actividad inhibitoria frente a 5 cepas de microorganismos estudiados, siendo únicamente inactivo para *Escherichia coli*. El extracto etanólico inicial (10.000µg/ml, 1.000 µg/ml), extracto etanólico final y etéreo de *Coursetia dubia* presentó actividad parcial para *Candida albicans*. El tamizaje indicó que *Senna multijuga* contiene antraquinonas, triterpenos, esteroides, esteroides, monoterpenos, flavonoides, flavonas, y alcaloides. Para *Tagetes zipaquirensis* la presencia de flavonas, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenolactonas, taninos

catéticos. La *Coursetia dubia* flavonas, flavonoides, benzoquinonas, monoterpenos y alcaloides. Se concluye que los extractos etanólicos y subextractos etéreo y clorofórmico de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*, si presentan capacidad inhibitoria para las 6 cepas.⁹

En la investigación realizada por Rea Martínez, J. **Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de (*Drymaria ovata*), (*Senna macrophylla*) y (*Tagetes filifolia* Lag)** (2012). Tesis para optar el título de Bioquímico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador, tuvo por objetivo evaluar in vitro la actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones 10.000µg/ml, 1.000µg/ml y 100 µg/ml del extracto etanólico y los subextractos etéreo y clorofórmico a 10.000µg/ml frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 9637 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Y determinar la presencia de sus fitocomponentes que se encuentran presentes en las especies vegetales en estudio. La obtención de los extractos etanólicos de *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla* y *Tagetes filifolia* Lag, fueron por maceración en etanol al 96° de hojas frescas y los subextractos se extrajeron por inmiscibilidad de los solventes (éter y cloroformo). Por el método de Mitscher mediante la clasificación de tres parámetros de estudio: activo, parcialmente activo e inactivo se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos y subextractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 9637 y

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. La determinación de sus fitocomponentes se realizó a través de un tamizaje fitoquímico por reacciones de coloración y precipitación. Los resultados. El extracto etanólico y los subextractos etéreo y clorofórmico de *Drymaria ovata* es activo para *Candida albicans* ATCC 10231, a una concentración de 10.000 µg/mL. El subextracto Clorofórmico de *Senna macrophylla* es parcialmente activo frente a *Candida albicans* ATCC 10231 a una concentración de 10.000 µg/ml. El extracto etanólico de *Tagetes filifolia* Lag presenta actividad parcial frente a *Candida albicans* ATCC 10231 a concentración de 10.000 µg/ml. El subextracto etéreo a 10.000 µg/ml es activo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231. El subextracto clorofórmico presenta actividad parcial frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231 a 10.000 µg/ml. En la identificación de los compuestos químicos obtenidos fueron la presencia de quinonas, fenoles, taninos, flavonoides, lactonas, saponinas, triterpenos y esteroides, chalconas, flavonas, lípidos y aceites esenciales. Concluyendo que los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de las especies vegetales estudiados presentan actividad antimicrobiana.¹⁰

3.2 Bases Teóricas

3.2.1 Los aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias oleosas, volátiles, de composición compleja con más de 100 componentes, con variadas funciones químicas, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable, adquiridas generalmente

por corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos.¹¹⁻¹³

Son producto del metabolismo secundario de las especies vegetales en cuya composición intervienen una proporción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de terpenos que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, aldehídos y compuestos fenólicos).¹¹⁻¹³

3.2.1.1 Características Generales de los aceites esenciales

a. Componentes químicos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales por ser mezclas complejas y muy variables de constituyentes que pertenecen, de manera casi exclusiva, a dos grupos caracterizados por orígenes biogénicos distintos: el grupo de los terpénicos (mono y sesquiterpenos) en lo que se encuentran incluidos la mayor parte de los constituyentes de los aceites esenciales, y el grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropánicos, muchos menos frecuentes que los anteriores.

¹³⁻¹⁵

- **Los Terpénicos:** en los aceites esenciales solo se encuentran los terpenos más volátiles, con bajo peso molecular sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico y que origina el isopentenil pirofosfato como precursor: monoterpenos con 10 átomos de carbono (Figura N° 1) y sesquiterpenos con 15 átomos de carbono. ¹³⁻¹⁵

- **Los Monoterpenos:** los principales constituyentes de esta serie son los hidrocarburos. Estos pueden ser acíclicos (mirceno), monocíclicos (α - y γ -terpineno, p-cimeno) o bicíclicos. A veces constituyen más del 90% del aceite esencial, son bastantes frecuentes en representantes en las familias de angiospemas como Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myristicaceae y Rubiaceae.¹³⁻¹⁵

Existen considerables compuestos funcionales:

- **Alcoholes:** acíclicos (geraniol, linalol, citronelol), monocíclicos (mentol, α -terpineol, 1-terpinen-4-ol), bicíclicos (borneol, fenchol), que se caracterizan por presentar propiedades: antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico.¹³⁻¹⁵
- **Aldehídos:** generalmente acíclicos (geranial, neral, citronelal), presentan propiedades: espasmolítico, antiviral, sedante.¹³⁻¹⁵
- **Cetonas:** acíclicas (tagetona), monocíclicas (mentona, isomentona, carvona, pulegona), bicíclicas (alcanfor, fenchona, tuyonas) presenta propiedades: mucolítico, regenerador celular, neurotóxico.¹³⁻¹⁵
- **Ésteres:** acíclicos (acetato o propionato de linalilo, acetato de citronelilo), monocíclicos (acetato de mentilo, acetato de α -terpinilo), bicíclicos (acetato de isobornilo), característicos por presentar propiedades: espasmolítico, sedante, antitusígeno.¹³⁻

- **Éteres:** 1,8-cinelo, presenta propiedades: expectorante, estimulante. ¹³⁻¹⁵
- **Peróxidos:** ascaridol, presenta propiedades: antihelmínticas o antiparasitario. ¹³⁻¹⁵
- **Fenoles:** timol, carvacrol, presenta propiedades: antimicrobiano, irritante, estimulante inmunológico. ¹³⁻

15

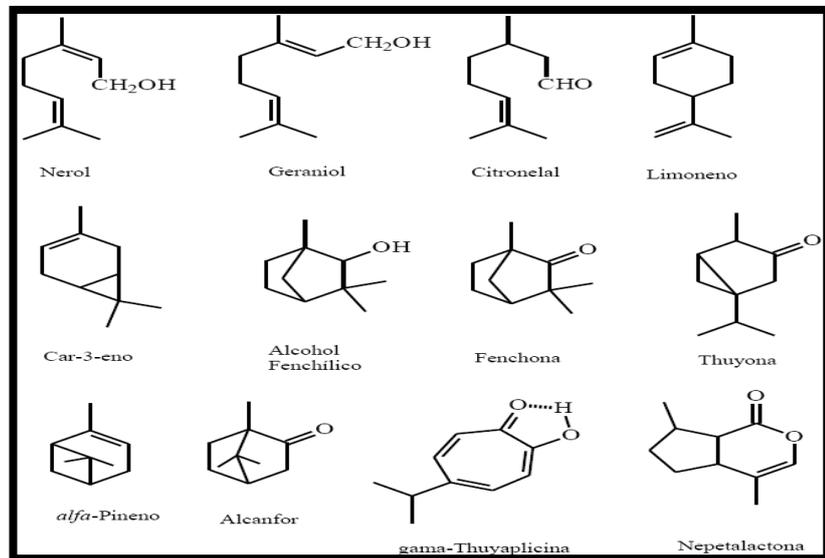


Figura N° 1 Componentes monoterpenos presentes en algunos aceites esenciales

Fuente: Farmacognosia General Jean Bruneton (2007)

- **Los Sesquiterpenos:** Las variaciones estructurales son diversos siendo los más frecuentes hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres glucósido y alcaloides sesquiterpénicos. ¹⁴⁻¹⁶

La ampliación de la cadena incrementa el número de ciclaciones y modificaciones posibles, de ahí la gran

variedad de estructuras conocidas (más de una centena de esqueletos diferentes). Estos son algunos de los sesquiterpenos (Figura N° 2) característicos de los aceites esenciales: hidrocarburos mono o policíclicos (β -bisaboleno, β -cariofileno, longifoleno), alcoholes (farnesol, carotol, β -santalol, patchulol), cetonas (nootkatona, cis-longipinano-2,7-diona, β -vetivona), aldehídos (sinensales), ésteres (acetato de cedrilo).¹⁶⁻¹⁸

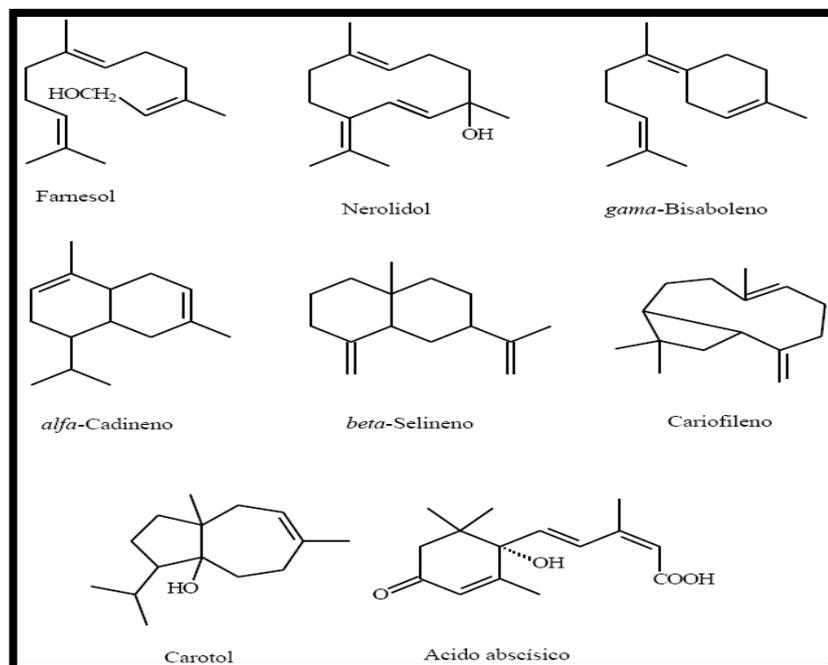


Figura N° 2 Componentes sesquiterpenos de algunos aceites esenciales

Fuente: Farmacognosia general Jean Brunenton (2007)

- **Compuestos aromáticos:** Los compuestos de esta serie, mucho menos frecuentes que los monos y sesquiterpenos, derivan del fenilpropano: fenoles, aldehídos. Estos son característicos en determinados aceites esenciales de Apiaceae: *Pinpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Petroselinum crispum*, etc.: anetol,

anisaldehído, apiol, metil-chavicol (estragol). Pero también del *Syzygium aromaticum*, *Myristica fragrans*, *Artemisia dracunculus*, *Ocimum basilicum*, (cálamo aromático), *Cinnamomum verum* (eugenol, safrol, asaronas, cinamaldehído).^{14,16,17}

También se pueden encontrar compuestos en C6-C1, como la *Vanilla planifolia* o como el antranilato de metilo. Las lactonas derivados de los ácidos cinámicos (cumarinas) al ser, al menos las más sencillas de ellas, arrastrables por corriente de vapor de agua. Se encontrarán en algunos aceites esenciales.^{14,15,17}

Determinados aceites esenciales, contienen pequeñas cantidades de compuestos acíclicos no terpénicos: alcoholes aldehídos o cetonas de peso molecular bajo. Según la forma de extracción, la esencia puede contener también productos más pesados; cumarinas, homólogos superiores de los fenilpropanos.^{14,16,17}

b. Factores de variabilidad de los aceites esenciales

- Quimiotipo
- Origen botánico
- Ciclo vegetativo
- Factores del entorno
- Procedimiento de obtención

- El Quimiotipo

En algunas especies vegetales con aceites esenciales, son muy frecuentes las razas químicas. El quimiotipo es importante para definir la actividad terapéutica de un aceite esencial. La aromaterapia científica exige un conocimiento perfecto de la clasificación. La especie vegetal botánicamente homogénea y cariológicamente estable, de las especies aromáticas, un conocimiento preciso de sus constituyentes químicos y un dominio riguroso de las precauciones de uso en lo que concierne a la dosis, la posología, el modo de empleo y las contraindicaciones ocasionales.¹⁶⁻¹⁸

- Origen botánico

La composición de un aceite esencial está en función de la especie productora, el origen geográfico.^{18,19}

- Ciclo vegetativo

Para una especie dada, la proporción de los diferentes componentes del aceite esencial, puede modificar de manera significativa su desarrollo. Así que, es necesario elegir convenientemente la fecha de recolección y las características edáficas.^{18,19}

- Factores del entorno

Los medios climáticos y la naturaleza del suelo influyen directamente en la producción del aceite esencial. Lo mismo ocurre con el conocimiento del cultivo: densidad de

plantación, intensidad, circunstancias de riego y manejo de abonos.^{18,19}

- Procedimiento de obtención

La composición puede ser diferente de la mezcla contenida en los órganos secretores del vegetal y el producto obtenido por hidrodestilación. Ocasionalmente, será idéntico al que resulte de la extracción con disolventes volátiles. Esto depende de la labilidad y la reactividad significativa, de las moléculas constituyentes de estas mezclas naturales que fácilmente se isomerizan, racemizan, recombinan y oxidan.^{18,19}

c. Propiedades físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente, volátiles, aunque algunas se solidifican a baja temperatura como, por ejemplo, la esencia de *Pimpinella anisum*. La mayoría de estos son prácticamente transparentes, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos), con excepciones como la esencia de *Matricaria chamomilla*, que contiene camazuleno de un intenso color azul. Algunos aceites esenciales son inflamables.^{14,16,18,19}

Generalmente, son menos densos que el agua, aunque también hay excepciones de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum verum*, que son más densas, poseen un índice de refracción elevada y la mayoría derivan la luz polarizada.

^{14,16,18,19}

Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay algunas que son parcialmente solubles, porque algunos de sus componentes se solubilizan, como, por ejemplo, los fenoles). Los aceites esenciales son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc). Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos.^{13,}

^{14, 18,19}

3.2.1.2 Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se clasifican con bases en diferentes criterios: por su consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.^{13,14,18,19}

a. Por su consistencia. Los aceites esenciales de acuerdo a su consistencia se pueden clasificar en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas.¹⁸⁻²⁰

- **Las esencias fluidas:** son líquidos, muy volátiles a temperatura ambiente.¹⁸⁻²⁰

- **Los bálsamos:** son líquidas de consistencia más espesa y menos volátiles, propensos a sufrir reacciones de polimerización.¹⁸⁻²⁰

- **Las oleorresinas:** tienen un aroma en forma concentrada y son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.¹⁸⁻²⁰

b. Por su origen: se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos.¹⁸⁻²⁰

- **Los naturales:** son obtenidos directamente del recurso vegetal y no son modificadas química ni físicamente. Son costosos y de composición variada.^{14,16,18,19}

- **Los artificiales:** se obtienen por enriquecimiento de esencias naturales con uno de sus componentes o por mezclas de varias esencias naturales de distintas especies vegetales.^{14,16,18,19}

- **Los sintéticos:** son mezclas de diversos productos obtenidos por procesos químicos. Son menos costosos y, por lo tanto, se emplean como aromatizantes y saborizantes.^{14,16,18,19}

c. Por la naturaleza química: según su estructura química de los componentes principales se dividen en tres principales grupos: monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides.^{14,16,18,19}

3.2.1.3 Aplicaciones y usos de los aceites esenciales

Las aplicaciones de los aceites esenciales son múltiples y variables. Se utilizan tanto por sus propiedades aromáticas, en la industria alimentaria, en la perfumería y en la industria de productos de limpieza, como por sus propiedades farmacológicas. Son muy variadas tanto en su utilización por vía tópica como en su uso vía interna.^{12-14,18,19}

a. Propiedades farmacológicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales no son empleados en forma farmacéutica definida y con una dosis definida. Pero por sus

aplicaciones, podrían ser considerados como un alcaloide, un antibiótico o una enzima.^{13,14,18,19}

Son muchas las propiedades farmacológicas que se podrían atribuir a los aceites esenciales como bactericida o antimicótica; pero sólo algunas de ellas han sido estudiadas totalmente. Hay que tener en cuenta, no obstante, que algunas esencias pueden ser muy peligrosas si no son manipuladas con un criterio profesional, en la forma, la dosis y circunstancias apropiadas.

^{13,14,18}

- **Acción antiséptica y antibacteriana:** la diversidad de los componentes con propiedades antimicrobianas que forman parte de los aceites esenciales a que se muestren activos frente a bacterias patógenas variadas e incluso frente a distintos hongos responsables de la aparición de micosis y levaduras (*Candida*), presentando en conjunto un amplio espectro de actuación. Se ha sugerido la posibilidad de que los aceites esenciales inhiban con más facilidad a los microorganismos Gram positivo (+) que a los Gram negativo (-). Los aceites esenciales de distintas especies que poseen una actividad antimicrobiana son *Satureja hortensis*, *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, *Lavandula angustifolia*, *Foeniculum vulgare*, etc.^{13,14,18}
- Se destacan los derivados de terpénicos oxidados, representados por los derivados fenólicos, timol y carvacrol. Los cuales se unen a los grupos amino e hidroxilamino de las proteínas de la membrana bacteriana. Lo que conduce a la modificación de su permeabilidad y origina la muerte bacteriana. Los derivados alcohólicos y cetónicos, tales como linalol, geraniol, citral, alcanfor, etc., poseen

igualmente propiedades antibacterianas, si bien menos marcadas las de timol y carvacrol. Las propiedades antisépticas dependen mucho de los compuestos activos presentes.^{13,14,18}

- Los compuestos más activos son los aceites esenciales ricos en fenoles: *Thymus vulgaris* (contiene altos porcentajes de timol y carvacrol), *Syzygium aromaticum* contiene eugenol e isoeugenol, *Salvia officinalis*; y las esencias con alcoholes y cetonas: *Mentha piperita* (mentol y mentona), *Origanum vulgare* (carvacrol y timol) y *Camellia sinensis* (*Melaleuca alternifolia*) con un gran contenido en (terpin-1-en-4-ol). Gracias a esta actividad, las esencias son muy usadas para problemas de las vías respiratorias y como antiséptico bucal o en pasta dental, para infecciones urinarias, de la epidermis y en odontología. Se han propuesto métodos analíticos para la evaluación de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales; haciendo una analogía a un antibiograma se realiza un aromatógrama.^{13,14,18,19}

- **Acción antihelmíntica o antiparasitaria:** *Dysphania ambrosioides* (por su contenido en ascaridol tal vez sea el más conocido en América, así como también el *Peumus boldus*. Sin embargo, no es recomendable su uso si no es a través de un profesional de la salud, debido a que presenta una alta toxicidad. Teniendo así su dosis efectiva muy cercana a la tóxica, por lo que es muy común que aparezcan problemas, sobre todo cuando es usado en niños. La incuestionable virtud del *Chenopodium ambrosioides* es mejor aprovechada en veterinaria. Otras

esencias antihelmínticas son las de *Artemisia absinthium* L, *Eucalyptus globulus*, *Syzygium aromaticum* y *Sasafrás albidum*.^{13,14,18,19}

- **Efectos sobre el sistema nervioso central:** existen esencias con efectos sedantes cuando son inhaladas, como las de *Citrus aurantium* y *Lavandula angustifolia* o euforizantes como la esencia de *Citrus limonum*. Se ha demostrado el efecto benéfico de la esencia de lavanda en caso de insomnios seniles. Es tradicional el uso de la *Valeriana officinalis*, el *Hamulus lupulus* y la *Melissa officinalis* como tranquilizantes. Aunque no se sepa con seguridad en la primera especie si esta acción se debe a la esencia de la planta o a los valepotriatos, o a una sinergia de efectos.^{13,14,18}
- En la *Melissa officinalis* sí fue demostrado que los causales de este efecto son el citral, citronelal y el linalol presentes en la esencia. El efecto ansiolítico de muchos de estos terpenos se cree que es debido a un efecto sobre los receptores benzodiazepínicos. Y, además, se ha visto una relación directa entre la liposolubilidad de los terpenos presentes en las esencias y su acción sedante. Otras esencias, en cambio, presentan una actividad estimulante sobre el sistema nervioso central. Esto fue claramente demostrado con la esencia de *Rosmarinus officinales*. Por ejemplo, donde se comprobó una relación directa entre las concentraciones de eucaliptol de la esencia de *Rosmarinus officinalis* y su estimulación de la actividad motora en ratones.^{13,17,18}

- **Efecto rubefaciente:** algunas esencias, como las de *Pinus sylvestris L*, *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomun verum*, y el *Cinnamomun camphora*, son usadas en masajes por provocar irritación local. Este efecto que, si es manejado con cautela, es muy apropiado para realizar masajes en zonas con dolores musculares o reumáticos, o para favorecer la circulación sanguínea capilar.^{14,18,19}
- **Efectos sobre el aparato respiratorio:** además de las esencias usadas como antisépticas en casos de infecciones de las vías superiores como el orégano, otras son empleadas como expectorantes, como las esencias de *Pinus sylvestris*, *Thymus vulgaris* y de *Eucalyptus globulus*.^{13,14,18,19}
- **Efectos sobre el aparato digestivo:** infinidad de especies aromáticas son usadas en todo el mundo como digestivas, en infusión o en licores y amargos: la *Matricaria chamomilla*, el *Aloysia citrodora*, la *Minthostachys mollis*, la *Mentha piperita*, el *Foeniculum vulgare*, *Pimpinilla anisum*, *Rosmarinus officinalis*, etc.^{13,14,18,19}
- La disminución o supresión de los espasmos gastrointestinales. Este hecho, junto a su capacidad de estimular las secreciones gástricas, destacan el *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*, *Angelica archangelica* y *Rosmarinus officinalis*. Para este último está demostrando que produce relajación del esfínter de Oddi, favoreciendo la salida de bilis (efecto cologogo).^{13,14,18,19}
- **Efectos sobre las vías urinarias:** es típico el uso de la esencia de bayas de *Juniperus communis* y la esencia de

hojas de *Agathosma betulina*, como diurético. Aunque también en este caso hay que tener cuidado sobre la dosis y a quién se le da la esencia, porque en dosis mayores a las normales puede ser irritante y hasta provocar hemorragias urinarias.^{13,14,18}

- **Efectos antiinflamatorios:** los azulenos y el bisabolol son ejemplos de sesquiterpenos presentes en varias especies vegetales. Pero, sobre todo, en la esencia de *Matricaria chamomilla*, por lo que esta especie es ampliamente usada. Debe tenerse en cuenta que en la *Matricaria chamomilla* hay otros compuestos ajenos a la esencia (polisacáridos y flavonoides como la apigenina, por ejemplo) que también tienen esta actividad, motivo por el cual se usan también extractos hidroalcohólicos o alcohólicos de *Matricaria chamomilla*. Otras esencias naturales han sido también empleadas como antiinflamatorias, como las de *Aloysia citrodora* y *Jasminum polyanthum*.^{14,18,19}

- **Acción antiartrítica, antirreumática:** se ha encontrado que el eugenol, la verbenona y el timol, presentes, por ejemplo, en las esencias de *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum verum* y *Thymus vulgaris*, tienen efectos debido a una acción sobre la síntesis de prostaglandinas.^{14,18,19}

- **Otros efectos y aplicaciones medicinales:** la administración continua de aceites esenciales de *Melissa officinalis* reduce los niveles plasmáticos de colesterol anormalmente elevados. Esto debido a la actuación de los monoterpenos acíclicos presentes en el aceite esencial de

Melissa officinalis sobre la hidroximetilglutaril CoA reductasa, enzima que actúa en los primeros pasos de la biosíntesis del colesterol. ^{14,18,19}

- Los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Myristica fragrans* son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria, debido a su contenido de eugenol. A veces se han utilizado a las esencias naturales como vehículos o coadyuvantes para facilitar la absorción de otros medicamentos, como antibióticos y alcaloides. ^{13,14,18,19}

3.2.2 Metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas

A diferencia de los carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento y desarrollo básicos de vegetal. Pero desempeñan un papel importante en la supervivencia de numerosos vegetales, especialmente al proporcionarles protección contra la actuación de herbívoros y contra las enfermedades. Existen tres categorías principales de los metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides. ^{14,18,19}

Entre los compuestos más conocidos que presentan actividad antifúngica son los flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc. ^{14,18,19}

Las hojas de la especie vegetal australiana *Melaleuca alternifolia* se obtiene el aceite esencial del árbol del té. Ha mostrado actividad antimicótica por la acción directa de los componentes activos, terpinen-4-ol y 1,8-cineol, a una concentración que varía del 29% al 45% y del 4,5% al 16,5%, respectivamente, contra las estructuras de las membranas

celulares, no solo en hongos sino también en bacterias. El aceite se utiliza para el tratamiento de infecciones en la piel por hongos de los géneros *Candida* y *Malassezia* y en las onicomicosis causadas por dermatofitos.^{14,18,19}

En los extractos alcohólicos, los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los bulbos del *Allium sativum* (ajo) se ha demostrado efecto antimicótico. Se le atribuye a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, así como contra especies de dermatofitos. De *Eucalyptus globulus* se obtienen aceites esenciales, extractos e infusiones con actividad antimicótica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol. Las especies vegetales *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis* poseen metabolitos como el timol y carvacrol. Es reconocida su actividad principalmente contra *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Saprolegnia* y *Zygorhynchus*.^{14,16,17}

a. Los Flavonoides: compuestos fenólicos con un grupo carbonilo, hidroxilo y se agrupan generalmente a un anillo aromático. Estos son productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico. Intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la protección frente a la radiación ultravioleta, en la defensa durante la interacción especie vegetal – patógeno y, posiblemente, modificando la acción de distintas hormonas vegetales (auxinas y citoquininas). Se ha demostrado, además, que los flavonoides de las plantas causan la activación de los genes bacterianos implicados en la formación de nódulos y en la transformación de la especie vegetal.^{13,17,18}

Desde el punto de vista químico, los flavonoides son fenoles de tipo diaril- propano (Ar-C3-Ar) unidos, la mayoría, a una cadena de azúcar. Están constituidos por un anillo bencénico condensado a una pirona sustituida en posición 2(3) por un radical fenilo. ^{13,17,18}

Los flavonoides están ampliamente en todo el reino vegetal constituyendo la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalconas, auronas), rojos y azules (antocianos) de flores y algunos frutos. Son particularmente abundantes en las plantas vasculares. Destacan las familias Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbelliferae, Lamiaceae, entre otras, por el contenido y diversidad estructural de flavonoides que existen en ellas. Salvo algunas excepciones, los antocianos están presentes en todas las Angiospermas; en Gimnospermas son característicos los biflavonoides (formas dímeras, con frecuencia, de flavonas y flavanonas). ^{14,17-19}

Se encuentran sobre todo en órganos aéreos, hojas y flores, donde se acumulan, relativamente a altas concentraciones, en las células epidérmicas, también están presentes en número elevado en raíces. ^{14,17-19}

- **Propiedades de los flavonoides**

Sólidos cristalinos, solubles como heterósidos en agua y alcohol e insolubles en disolventes orgánicos apolares; las geminas solubles en éter, acetato de etilo, metanol, etc., e insoluble en agua. Se disuelve fácilmente en soluciones alcalinas. Muchos flavonoides presentan actividad frente a la úlcera

péptica, reduciendo el índice de ulceración, protector vascular.^{14,17-19}

La acción vasoprotectora de los flavonoides implica una mejora en la microcirculación, lo que favorece el proceso de cicatrización y la neoformación de vasos.^{14,18,19}

b. Los Taninos: Grupo de compuestos fenólicos poliméricos que poseen la capacidad de unirse a proteínas y desnaturalizarlas.

Se dividen en dos grupos: hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables se basan en el ácido gálico, por lo general como múltiples ésteres con D-glucosa, mientras que los taninos condensados se derivan a partir de monómeros de flavonoides. Los taninos también se pueden formar por polimerización de unidades de quinonas.^{14,18,19}

Se han distinguido dos tipos de taninos, diferentes por su estructura y su origen biosintético.^{14,18,19}

-Taninos hidrolizables: Llamados también gálicos o pirogálicos. Estos taninos se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática. Se encuentran en este grupo los taninos gálicos propiamente dichos que son polímeros del ácido gálico, ésteres de un poliol, generalmente de la glucosa con varias moléculas de ácido gálico y los taninos elágicos o elagitaninos también ésteres. Pero en este caso del ácido hexahidroxidifénico y sus derivados.^{14,18,19}

-Taninos condensados o proantocianidinas: Se conocen

también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y, por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos). Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal. Químicamente, se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavanoles) con uniones directas C-C entre las moléculas, y no contienen azúcares en su estructura. Biogenéticamente, proceden del metabolismo de los flavonoides; se forman a partir de una flavanona por hidroxilación en el C-3.^{13,17,18}

- **Propiedades de los taninos:** Destacan por sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. Por vía interna, se emplean como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad por cierto efecto antiséptico. Ya que precipitan los enzimas extracelulares secretados por los microorganismos causantes de las infecciones, lo que hace que sean de utilidad en diarreas infecciosas. Poseen también propiedades vasoconstrictoras venosas por lo que se utilizan tanto interna como tópicamente en el tratamiento de afecciones vasculares como várices o hemorroides y en pequeñas heridas. En uso tópico, están indicados en diversos problemas de la piel, empleándose en ciertas dermatosis. Presentan también los taninos propiedades antioxidantes comportándose como captadores de radicales libres.^{14,18,19}

3.2.3 Métodos de extracción de los aceites esenciales

El método de extracción depende del tipo de material a procesar ya sea pétalos, hojas, cortezas, entre otros. Es importante considerar el lugar donde se ubica la sustancia aromática dentro de la estructura celular, la cual es dependiente del tipo de material vegetal y de la familia botánica de la misma.^{14,18-20}

Los principales métodos son los siguientes:

- Destilación con agua o hidrodestilación.
- Destilación por arrastre con vapor de agua.
- Extracción con disolventes.
- Extracción con fluidos supercríticos
- Expresión aplicados a los cítricos.

3.2.3.1 Destilación con agua o hidrodestilación

Es la forma más habitual de obtención de los aceites esenciales, basada en las propiedades de volatilidad. Consiste en hervir una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. Debido a la diferencia de densidad con respecto al agua y su insolubilidad en la misma, es posteriormente separado. El agua se calienta generalmente, a través del fuego directo, o por medio de un serpentín o camisa de vapor, con la cantidad de agua suficiente para generar el proceso de destilación. Para que la dispersión del material

vegetal en la suspensión sea uniforme, se recomienda que se pulverice.^{14,18-19}

Este proceso puede presentar algunas desventajas, los aceites esenciales obtenidos tienen un color más oscuro y una cantidad inferior en relación con otros procesos. Algunos componentes de los aceites esenciales, como los ésteres, pueden sufrir hidrólisis, mientras otros (aldehídos y los hidrocarburos monoterpénicos acíclicos) pueden sufrir polimerización, los componentes oxigenados, como los fenoles, pueden ser disueltos y no son removidos completamente por la destilación.^{14,18,19}

Es importante considerar:

- El material vegetal siempre debe estar en contacto con el agua.
- El agua en el alambique debe ser suficiente y permanente para todo el proceso, a modo de evitar sobrecalentamiento y carbonización en el fondo del recipiente.^{14,18,19}
- El material vegetal debe mantenerse en constante agitación a fin de evitar su aglomeración y sedimentación en el fondo del recipiente.^{14,18,19}
- Someter el sistema a vacío: con ello se consigue reducir la temperatura, con lo que los componentes termolábiles del aceite esencial están menos sujetos a degradaciones.^{14,18,19}

3.2.3.2 Destilación por arrastre de vapor

Este proceso se lleva a cabo con un vapor seco sobrecalentado, generando usualmente por una caldera externa por medio de tubos difusores, que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica. La corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en el recurso vegetal y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante. Los vapores salen y se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceites esenciales y finalmente se separan en un decantador o vaso florentino.^{13,14,19}

Esta técnica tiene muchas ventajas como, por ejemplo:

- El vapor de agua es muy económico en comparación al costo de los disolventes orgánicos.
- Asegura que no se recaliente el aceite esencial.
- No requiere uso de equipos sofisticados

La extracción por vapor de agua o arrastre con vapor de agua es la técnica más habitual para obtener aceites esenciales. Es la única técnica autorizada por la Farmacopea Europea. Es un método de destilación en cual se coloca la muestra vegetal, de preferencia, seca (por lo general, depende del tipo de recurso vegetal), pues fresca contiene mucílagos que oscurecen el aceite y disminuyen su calidad.¹⁸⁻²⁰

En el arrastre de vapor, se debe tomar en cuenta la calidad de vapor: la presión de vapor. Por experimentación se conoce que la presión en la cual se obtiene mayor rendimiento es a 40 psi, la temperatura de vapor; el área de la columna de

destilación, la cantidad de material vegetal que se va a alimentar; las condiciones de condensación, la temperatura de condensación debe estar alrededor de los 40°C. Para una mejor separación del condensado: el flujo del de separación: diseño del vaso florentino, la temperatura del destilado.^{15,16,18,20}

3.2.3.3 Procesos de expresión aplicados a los cítricos

Estos procesos son aplicados fundamentalmente a los frutos de los cítricos cuyas esencias se encuentran en las cáscaras, y su aplicación es muy antigua.⁷⁻¹⁹

El proceso ocurre en varias etapas:

- Laceración de la epidermis y de las celdas que contienen la esencia.
- Creación en la cáscara de áreas con presión mayor que sus circundantes a través de las cuales el aceite fluye al exterior.
- Abrasión de la cáscara, con la formación de pequeñas partículas de la raspadura.¹⁸⁻²⁰

La extracción del aceite se realiza sobre la fruta entera o sobre la cáscara, y en ambos procesos se puede realizar con un proceso manual o mecánico.¹⁸⁻²⁰

Este método se basa en la ruptura de las glándulas secretoras de aceite y en recolectar en forma inmediata la esencia, para evitar que sea absorbida por la corteza esponjosa que resulta después del proceso. Por esta razón los equipos de extracción

de cítricos cuentan con un sistema de aspersión de agua que moja constantemente la superficie del fruto.¹⁸⁻²⁰

3.2.3.4 Extracción con disolventes

Mediante la aplicación de este método se obtienen los productos denominados concretos y absolutos. El principal factor para el éxito del proceso de extracción es la adecuada elección del disolvente, que debe poseer especificidad y elevado poder solubilizante, bajo punto de ebullición, inercia química, baja capacidad residual, baja inflamabilidad y bajo costo.¹⁸⁻²⁰

Los disolventes más usados son los hidrocarburos alifáticos: éter de petróleo, éter de etílico, hexano, pentano, diclorometano y etanol, hidrocarburos aromáticos benceno y tolueno. Presenta la ventaja frente a la hidrodestilación de operar a baja temperatura, con lo cual existe una mayor posibilidad de alteración de los componentes termolábiles. Por el contrario, se extraen otros compuestos solubles en el disolvente seleccionado.¹⁸⁻²⁰

3.2.3.5 Extracción con fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos poseen propiedades intermedias entre las de líquidos y gases. La densidad de un fluido supercrítico es 100 a 1.000 veces superior al de un gas y, por lo tanto, comparable a la de un líquido. El poder solvente de estos fluidos no se explica tan solo por el incremento de densidad, originado por pequeñas variaciones en la presión, sino que hay que considerar otros factores tales como la interrelación entre fluido supercrítico de elección y soluto, equilibrio ácido-base, enlaces de hidrógeno, etc.¹⁸⁻²⁰

Como fluido supercrítico de elección está el CO₂, inerte químicamente, no inflamable, atóxico, fácil de eliminar, disponible y selectivo. Este proceso de extracción presenta como ventaja de proporcionar productos extractivos que reproducen con gran finalidad la presencia de cualitativa y cuantitativa de los mismos en el material vegetal.¹⁸⁻²⁰

3.2.4 Los extractos

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecada o fresca. Se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en extractos fluidos o líquidos, secos, blandos o semisólidos.²⁰⁻²²

3.2.4.1 Los extractos fluidos o líquidos

Son extractos de drogas que, con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido. Teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca, por lo general se obtienen por maceración o percolación. Los extractos fluidos se alteran fácilmente en contacto con la luz y al aire.²⁰⁻²²

3.2.4.2 Los extractos secos

Son aquellos que tienen una consistencia seca, polvos o granulados y son fácilmente pulverizables. Se obtiene por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los

extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5%. Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original. Son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua. Actualmente es posible obtener extractos secos nebulizados que son más estables que los tradicionales, por ser menos higroscópicos.²⁰⁻²²

3.2.4.3 Los extractos blandos o semisólidos

Los extractos blandos poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida, con contenido de agua alrededor del 60%. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan.²⁰⁻²²

3.2.4.4 Métodos de extracción de los extractos

a. Maceración: El proceso de maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente y depende de factores que están unidos a la droga, como, por ejemplo, su naturaleza, el tamaño de partícula, su cantidad de humedad y factores que están relacionados con el solvente, la selectividad y la cantidad. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación droga/solvente aumenta. El incremento de la droga es factor importante, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente. La velocidad con que se obtiene el equilibrio está en función del tamaño de partícula de la droga

debidamente fragmentada, su viscosidad y polaridad del solvente.²⁰⁻²²

Dentro del proceso de maceración se considera dos tipos: maceración simple o estática que es sumamente lento y la maceración dinámica; en este proceso, la droga y el solvente deben mantenerse en agitación esporádica. Tanto la maceración simple o dinámica pueden ser realizada a temperatura ambiente o temperaturas más elevadas.²⁰⁻²²

b. Percolación o lixiviación: Consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple comprende la extracción exhaustiva de la droga se requiere agregar solvente constantemente. En pequeña escala, se emplean percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provisto de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del solvente.²⁰⁻²²

c. En contracorriente: El proceso de extracción en contracorriente, el solvente fluye en sentido contrario a la dirección con que fluye la droga. Existen tres variantes en este proceso: continuo absoluto, continuo relativo y discontinuo absoluto.²⁰⁻²²

- **En el proceso continuo absoluto,** tanto la droga como el solvente se encuentra en un único recipiente, aunque ambos se mueven en sentido contrario.²⁰⁻²²

- **En el continuo relativo,** solamente el solvente está en movimiento, mientras la droga permanece estática.²⁰⁻²²

- En el proceso discontinuo absoluto, la droga al igual que el solvente, se mueven; por lo general la droga está colocada en una batería de percoladores.²⁰⁻²²

3.2.5 *Tagetes filifolia* (anisillo)



Figura N° 3 Planta de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Fuente: Elaboración propia

3.2.5.1 Clasificación Taxonómica

Taxonomía: Según Cronquist, A.1988

DIVISIÓN : Magnoliophyta

CLASE : Magnoliopsida

SUBCLASE : Asteridae

ORDEN : Asterales

FAMILIA : Asteraceae.

GÉNERO : *Tagetes*

ESPECIE : *Tagetes Filifolia* Lag.

NOMBRES POPULARES: anisillo, anís dulce, anís criollo, anís de la sierra, anís en grano.^{23, 24}

3.2.5.2 Hábitat y distribución geográfica

Tagetes filifolia es una hierba aromática nativa de América y cuya extensión abarca países como México, Ecuador, Chile. En el Perú se distribuye por todas las regiones de la Sierra (Junín, Apurímac, Cusco, especialmente entre los valles interandinos, crece entre los 2 300 y 3 500 m.s.n.m.).

Habita en campos abiertos o suelos húmedos, de preferencia de grava o arenoso-arcilloso y praderas herbáceas de manera espontánea, además en Guatemala, Bolivia, y Colombia hasta casi los 4.000 metros de altura. Se han encontrado algunos ejemplares en el ambiente urbano de Quito.²³⁻²⁵

3.2.5.3 Descripción Botánica

Planta herbácea anual, erecta de tallo simple, delgado, muy ramificado, que alcanza hasta 50 cm de altura, generalmente entre 10 y 20 cm, hojas alternas, compuestas y con el margen hendido, de 0.5 - 1.4 cm de largo, los folíolos filiformes; inflorescencia en pequeñas cabezuelas cilíndricas, de 5 – 10 mm de largo, con bracteadas uniseriadas soldadas; fruto aquenios de color negruzco en la madurez, caedizo (Figura N° 3) cuando están maduros. Se caracteriza por un olor fuerte, similar al anís verde. Tiene flores de color amarillo pardo, agrupadas en capítulos sésiles.²¹⁻²³

3.2.5.4 Composición química

La composición química de *Tagetes filifolia* es de carbohidratos, alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas, ésteres. Destaca el contenido de aceites esenciales, resinas

sesquiterpenolactonas, trans-anetol, estragol, cis-anetol, p-anisaldehído, Monoterpenos como el citral, citrol, limoneno y tagenona, compuestos fenólicos (taninos, flavonoides). La variación de su composición química es atribuible a los factores externos y genéticos de la especie vegetal.^{23,24}

3.2.5.5. Propiedades Medicinales

Tiene acción antiespasmódica, se utiliza especialmente en desórdenes vías digestivas como carminativo en casos de meteorismo, diarrea y flatulencia digestiva. Por lo que es útil en los cólicos estomacales, dolores menstruales. También se emplea como tónico general, en el tratamiento del dolor de cabeza y descongestionante de las vías respiratorias; por vía externa, se utiliza como hemostático y antiinflamatorio.^{25,26}

3.2.6 Hongos

3.2.6.1 Generalidades

Los hongos forman un grupo diverso de microorganismo que ocupan numerosas posiciones ambientales. En general, en la naturaleza son abundantes y llevan una vida libre, y tan solo unos pocos forman parte de la flora humana normal. Aunque se han descrito numerosas especies de hongos, habitualmente son menos de 100 las que se asocian con la aparición de enfermedades en el ser humano.²⁷⁻²⁹

Los hongos son microorganismos eucariotas y cada uno tiene al menos un núcleo y una membrana nuclear, un retículo endoplásmico, mitocondrias y un aparato secretor. Muchos son aerobios obligados o facultativos. Son quimiótrofos, secretores

de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos en nutrientes solubles que luego son absorbidos pasivamente o integrados a la célula por transporte activo.²⁷⁻³⁰

Todas las infecciones por hongos tienen su origen en una fuente exógena, sea por inhalación o implantación traumática. Las micosis son las infecciones producidas por hongos. Muchos de estos organismos patógenos son exógenos y su hábitat natural se sitúa en el agua, la tierra y los restos orgánicos. Las micosis que aparecen con la máxima incidencia, como son la candidiasis y las dermatofitosis, son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o que están muy adaptados a sobrevivir en hospederos humano.²⁷⁻³⁰

3.2.6.2 Infecciones fúngicas

Las células fúngicas pueden crecer en forma de filamentos multicelulares, llamados mohos o como células únicas o cadenas de células llamadas levaduras. La mayoría de las levaduras se reproducen por gemación. Algunas levaduras, como *Candida albicans*, pueden producir yemas que no consiguen liberarse, produciendo una cadena de células levaduriformes elongadas llamadas pseudohifas. Los mohos constan de filamentos en forma de hilos (hifas) que crecen y se dividen en sus extremos. Pueden producir células redondeadas, llamadas blastoconidios, que son transportadas fácilmente por el aire diseminado por el hongo.²⁸⁻³⁰

Las infecciones fúngicas, han aumentado en frecuencia e importancia, son clasificadas principalmente de acuerdo con el sitio anatómico en que surgen y con sus aspectos epidemiológicos. Las categorías anatómicas generales más

comunes son las infecciones mucocutáneas y las de órganos profundos; las categorías epidemiológicas más frecuentes son las de tipo endémico y por oportunista.²⁸⁻³⁰

3.2.7 *Candida albicans*

3.2.7.1 Características microbiológicas

El género *Cándida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas.²⁸⁻³⁰

Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre. Es un hongo diploide asexual (forma de levadura) saprofita de la familia de los sacaromicetos.²⁸⁻³¹

Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variables, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas o hifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí, hongo dimorfo que forma largas pseudohifas o hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 µm) (Figura N° 4). Presenta numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 µm de diámetro) situadas al final de las hifas, pseudohifas laterales sobre blastoconidios ovalados.²⁸⁻³¹

El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura, se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes exactos, centro levemente prominente, con olor característico a levadura.

28-30

En habitual *Candida albicans* coloniza de manera comensal entre un 30-60% de los humanos, pudiendo ser aislada desde el tracto gastrointestinal, mucosa oral, mucosa vaginal y / o piel en muchos individuos sanos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones como cambios de temperatura, pH y una alteración de la inmunidad del hospedero, es capaz de causar una infección.²⁸⁻³⁰

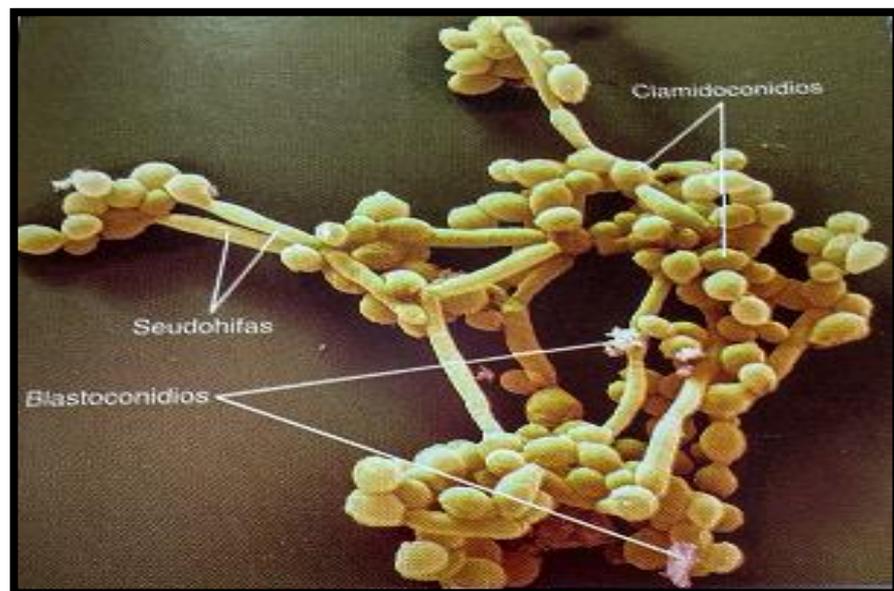


Figura N° 4 Morfología del hongo *Candida albicans*

Fuente: Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas color (2007)

3.2.7.2 Clasificación taxonómica

REINO : Fungi
DIVISIÓN : Deuteromycota
CLASE : Blastomicetes
ORDEN : Pseudosaccharomycetales
FAMILIA : Cryptococcaceae
GENERO : *Candida*
ESPECIE : *Candida albicans*
SINÓNIMOS : *Monilia albicans*, *Candida stellatoidea*.³¹

Cuadro N° 1 Pruebas bioquímicas para *Candida albicans*

Prueba	Reacción
pseudohifas	(+)
glucosa	(+)
lactosa	(-)

Fuente: Brooks G.F. Microbiología médica (2010)

3.2.7.3 Patogenia

Una misma cepa de *Candida albicans* puede tener éxito como comensal o como patógeno. *Candida albicans* puede desplazarse entre diferentes fenotipos de forma reversible y aparentemente aleatoria. El cambio fenotípico incluye una regulación coordinada de genes específicos de fase y proporciona un medio para que *Candida albicans* se adapte a los cambios en el entorno del huésped (producidos por tratamiento antibiótico, la respuesta inmunitaria o una fisiología

alterada del anfitrión). Estas variantes pueden mostrar alteraciones de la morfología de las colonias, de la forma celular, de la antigenicidad y de la virulencia.²⁹⁻³¹

Candida albicans es capaz de sobrevivir como comensal en diferentes localizaciones, y por ello está sometido a distintas presiones medioambientales. Esta habilidad amplía el espectro de enfermedades causadas por *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, siendo su incidencia mayor que la de otros microorganismos comensales.²⁹⁻³²

También existe otros tipos de factores de la patogenicidad que facilitan la colonización y la infección del huésped:

- **Adhesinas**, que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del huésped o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres.²⁹⁻³²

- **Proteinasas y fosfolipasas**, las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del huésped.²⁹⁻³²

- **Tigmotropismo**, factor que permite encontrar discontinuidades entre las células que penetra en los tejidos, producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras. La pared de *Candida albicans* es básica para su patogenicidad.²⁹⁻³²

En estos últimos años, en las unidades de cuidados intensivos hospitalarias, se ha experimentado un avance considerable en los sistemas de soporte vital, con un incremento en la utilización de antibióticos de amplio

espectro, un evidente aumento de edad y gravedad de los enfermos ingresados, y mayor utilización de nutrición parenteral total y suspensiones lipídicas. Como consecuencia de lo anterior la incidencia de infección fúngica invasora (IFI) ha aumentado significativamente en este contexto; siendo, por consiguiente, la morbimortalidad asociada a este tipo de patología muy elevada.²⁸⁻³⁰

El desarrollo de la enfermedad por *Candida albicans* depende de la interacción de ciertos factores en los enfermos: factores predisponentes para la infección, patogenicidad intrínseca del microorganismo, mecanismo de defensa del huésped inmunocomprometidos son la superficial o mucocutánea y la sistémica. La primera es la más común, y se limita a la superficie de la piel, orofaringe, tracto gastrointestinal y tracto respiratorio superior e inferior. La candidiasis sistémica o invasiva puede afectar a cualquier órgano, entre ellos el corazón, riñones, hígado, bazo, pulmón y cerebro. En las formas más graves de infección por *Candida albicans*, el microorganismo se disemina por vía hematógena y forma microabscesos y macroabscesos por órganos vitales. Los enfermos suelen tener en su mayoría alguno de los siguientes factores de riesgo.²⁸⁻³⁰

- a.** Neoplasias hematológicas.
- b.** Neoplasias sólidas u otras enfermedades que requieran de tratamiento inmunosupresor, como los trasplantes de órganos.
- c.** Infección por el VIH.
- d.** Intervenciones quirúrgicas recientes (postoperatorio).²⁸⁻³⁰

3.2.7.4 Epidemiología

Las especies del género *Candida albicans* colonizan el ser humano y otros animales de sangre caliente, por lo que se encuentran tanto en las personas como en los medios ambientes naturales. El lugar primario de colonización es el aparato digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto. También se desarrollan como comensales en la vagina y la uretra, la piel y bajo las uñas del pie y la mano. Se ha detectado la presencia de *Candida albicans*, el principal agente etiológico de enfermedad en el ser humano y los animales.²⁹⁻³²

Se estima que entre un 25% y un 50% de las personas sanas porta microorganismos del género *Candida* en la microflora normal de la cavidad bucal. *Candida albicans* representaría entre un 70% y un 80% de las cepas. Las tasas de portadores orales son significativamente mayores en la población pediátrica, los pacientes ingresados, los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las personas con dentaduras postizas, los diabéticos, los individuos sometidos a quimioterapia antineoplásica o antibioterapia y los niños.²⁹⁻³²

Prácticamente, todos los seres humanos pueden albergar una o más especies de *Candida* en su aparato digestivo, y los niveles del estado de portador sano puede aumentar hasta niveles de enfermedad detectable u otras situaciones de alteraciones de los mecanismos de defensa del hospedador.²⁸⁻³⁰

La principal fuente de infección causada por las especies de *Candida* (desde la enfermedad mucosa y cutánea superficial hasta la diseminación homogénea) es el propio paciente. Es

decir, la mayoría de los tipos de candidiasis representan una infección endógena en la microflora comensal y aprovecha la oportunidad para producir una infección.²⁸⁻³⁰

Para ello, debe existir alguna deficiencia en las barreras del huésped frente a *Candida*. En el caso de Infecciones sistémicas por *Candida*, la transferencia del microorganismo desde la mucosa digestiva hasta el torrente circulatorio exige la proliferación excesiva de las levaduras en su nicho comensal junto con un fallo de la integridad de la mucosa digestiva.²⁸⁻³⁰

La transmisión exógena de *Candida* también ocasiona una proporción de ciertos tipos de candidiasis. Como ejemplos de tal transmisión, se encuentra el uso de soluciones de irrigación, líquidos de nutrición parenteral, transductores de presión vascular, válvulas cardíacas y córneas contaminadas. Se ha comprobado la transmisión de estas levaduras desde profesionales sanitarios a los pacientes y entre pacientes, en especial en el contexto de los cuidados intensivos. Las manos de los profesionales sanitarios actúan como posibles reservorios en la transmisión nosocomial de este género.²⁸⁻³⁰

En las distintas especies de *Candida* con capacidad de infectar al ser humano, *Candida albicans* prevalece en casi todos los tipos de infección. Esta especie suele estar implicada en casi todas las infecciones en localizaciones genitales, cutáneas y bucales. El abanico de especies capaces de producir Infecciones Septicémicas es más amplio y, aunque *Candida albicans* suele ser la especie preponderante, la frecuencia de aislamiento de cada especie de *Candida* varía considerablemente en función al servicio clínico, la edad del paciente y la situación local, regional o global. Mientras que

Candida albicans y *Candida parapsilosis* son especies imperantes en la etiología de Infecciones Septicémicas en lactantes y niños. En las personas de mayor edad se observa una disminución de las infecciones por ambas especies y un notable incremento de las debidas a *Candida glabrata*.²⁸⁻³⁰

De igual modo, aunque *Candida albicans* es la especie dominante en Norteamérica, su frecuencia es menor en la zona Latinoamericana, en la que *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* son más frecuentes. El número y los tipos de especies del género que producen infecciones pueden verse influidos por numerosos factores, como la edad del paciente, el aumento de la inmunodepresión, la exposición a fármacos antifúngicos o las diferentes existentes en los procedimientos del control de las infecciones.²⁸⁻³⁰

Cada uno de estos factores, tanto independiente como combinada, puede incidir en la prevalencia de las distintas especies de *Candida* en cada centro hospitalario. Por ejemplo, la utilización de azoles como profilaxis antifúngica en pacientes con neoplasias hematológicas y en receptores de un trasplante de células madre puede elevar la probabilidad de infecciones causadas por *Candida glabrata* y *Candida krusei*, que presentan una menor sensibilidad a esta clase de antifúngicos. Asimismo, las precauciones insuficientes de control de infecciones y manipulación inadecuada de catéteres vasculares pueden originar infecciones.^{27,29,30}

3.2.8 Candidiasis

3.2.8.1 Generalidades

La candidiasis es la micosis causada por el hongo dimórfico *Candida albicans* o *Candida glabrata*. Forman parte de la microbiota normal del aparato digestivo, el aparato respiratorio, la zona vaginal y la boca. En los individuos sanos, no causan enfermedad, ya que su crecimiento está reprimido por otros microorganismos y por los mecanismos de resistencia del huésped. Sin embargo, si se produce alteración de la microbiota normal o del estado inmunitario en los pacientes con trastornos del sistema inmunitario y en los enfermos internados con patologías graves, las infecciones por hongos son una causa importante de morbilidad y mortalidad.²⁸⁻³⁰

Las distintas especies de *Candida*, ampliamente distribuidas, son los hongos más comunes causantes de micosis. Integran la flora microbiológica normal, pero solo 10 especies son causa de enfermedad en los seres humanos. La patología asociada con estos hongos incluye un amplio espectro, desde trastornos leves de la piel y mucosa hasta infecciones potencialmente fatales, candidemia, peritonitis, endocarditis, infecciones de catéteres intravasculares y meningitis.²⁸⁻³⁰

La candidiasis es una infección por hongos que también se conoce por los nombres de moniliasis, “infecciones por levaduras.” Son causadas por un hongo del género *Candida*, el más frecuente de todos es *Candida albicans*, que causa alrededor del 90 % de las infecciones por hongos. Otros miembros de la familia que pueden ocasionar infección son *Candida tropicalis*, *krusei*, *glabrata* y *parapsilosis*.²⁸⁻³⁰

Las principales manifestaciones clínicas de *Candida albicans* son de tres tipos: mucocutánea, cutánea y sistémica.²⁸⁻²⁹

3.2.8.2. Tipos de candidiasis

a. La candidiasis bucal o muguet

Es una enfermedad frecuente en los recién nacidos. Aparece en forma de numerosas manchas blancas pequeñas que cubren la lengua y la boca. Los recién nacidos no poseen una microbiota normal. El muguet se produce debido a que la microbiota normal no es capaz de inhibir el crecimiento de *Candida*. Una vez el recién nacido ha desarrollado su propia microbiota orofaríngea normal, el muguet es más bien poco frecuente.³⁰⁻³³

La paroniquia y la onicomicosis se asocian a las infecciones de los tejidos subcutáneos de los dedos y las uñas causadas por *Candida*, respectivamente. Estas infecciones suelen producirse a causa de la inmersión continua de los dedos en agua.³⁰⁻³³

b. Candidiasis mucocutánea

La candidiasis buco faríngea se caracteriza por placas blanquecinas, adherentes, indoloras, aisladas o confluyentes que se encuentran en la boca, lengua esófago y que en ocasiones producen fisuras en los ángulos de la boca. Las lesiones de la candidiasis bucofaríngea en jóvenes aparentemente sanos son indicaciones para investigar una infección subyacente por VHI. Con mayor frecuencia, se observa como manifestación inesperada de una enfermedad grave, la candidiasis vulvovaginal se acompaña de prurito, dolor y

secreción vaginal, poco viscoso y puede contener “grumos” en los casos graves.³⁰⁻³³

Otras infecciones dérmicas por *Candida* incluyen paroniquia, un edema doloroso del pliegue ungueal. La onicomicosis es la infección ungueal micótica que rara vez es causada por este género; el intertrigo consiste en la irritación eritematosa con eritema y pústulas en los pliegues cutáneos. La balanitis es una infección eritematosa postular del glande; la erosión interdigital se desarrolla en las manos o de los pies. Las foliculitis con pústulas se desarrollan con mayor frecuencia en el área de la barba; la candidiasis perianal es una infección pustulosa, eritematosa y pruriginosa alrededor del ano. El eritema del pañal es una infección perineal pustulosa, eritematosa frecuente en lactantes.³⁰⁻³³

La candidiasis cutánea diseminada generalizada es otra forma de infección que ocurre en lactantes y que se caracteriza por erupción diseminada en el tronco, tórax y extremidades. Las lesiones macronodulares de la candidiasis diseminada por la vía hematógena indican una alta probabilidad de diseminación a múltiples órganos y a la piel. Las lesiones se observan en forma predominante en individuos con inmunodepresión tratados con fármacos citotóxicos; pero también pueden desarrollarse en pacientes sin neutropenia.³⁰⁻³³

c. Candidiasis mucocutánea crónica

En la mayoría de los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica, es evidente que la inmunidad mediada por los leucocitos T es defectuosa. Otros pacientes tienen una marcada

endocrinopatía, un timoma, predisposición genética u otros problemas constitucionales.³⁰⁻³³

Esta afección se define como la infección, invariablemente por *Candida albicans*, de cualquiera o todas las superficies epiteliales del cuerpo: la piel, la mucosa oral y el epitelio de las vías urinarias y el tracto genital. La invasión del torrente circulatorio o de los tejidos más profundos es poco habitual. En apariencia, la *Candida albicans* se adhiere a la membrana plasmática de las células epiteliales viables y la atraviesa; causa una considerable distorsión de estas células y se instala como un parasito intracelular. La CMC comienza a una edad temprana y a menudo persiste durante toda la vida del paciente. El grado de compromiso del epitelio y las mucosas varía entre los diferentes pacientes.³²⁻³⁴

d. Candidiasis sistémica:

Los trastornos sanguíneos predisponen a los pacientes a una candidiasis sistémica, como lo hacen las inmunodeficiencias celulares o, con menor frecuencia, los humorales. La reducción del número o la capacidad funcional de los neutrófilos disminuye la resistencia a la *Candida*, lo que da como resultado infecciones sistémicas recurrentes. Aunque resulte irónico, muchos procedimientos médicos ideados para prolongar la vida también incrementan la probabilidad de que el paciente desarrolle infecciones oportunistas potencialmente letales.³²⁻³⁴

El riesgo de que se desarrolle candidiasis sistémica posquirúrgica se relacione con la duración de la operación y la infección es causada no solo por la contaminación con levaduras durante la cirugía sino también por el uso de catéteres y sondas

o el empleo de antibióticos antibacterianos profilácticos, muchos pacientes que desarrollan candidiasis sistémica, tienen antecedentes de haber recibido corticosteroides antes de la infección. Entre los efectos producidos de los corticosteroides se halla la depresión de la actividad fagocítica y la inmunidad mediada por células.³²⁻³⁴

3.2.9 Método para Evaluar la Actividad Antimicótica

A medida que la industria farmacéutica fue incrementando en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con la finalidad de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias, motivo por el cual el Instituto de estándares clínicos y de laboratorios “Clinical Laboratory Standard Institute” en un intento de facilitar y agilizar creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos frente a levaduras del género *Candida* y en *Cryptococcus neoformans*. Dicho subcomité estandarizó el método de difusión en disco en el año 2003 y fue aprobado definitivamente en el 2004.³⁵

3.2.9.1 Método de Kirby – Bauer (método de difusión en agar)

El principio de este método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicótico en un reservorio (disco de papel) en contacto con la superficie de agar, sobre la cual se ha distribuido previamente el microorganismo en cuestión. Se formará así, por difusión, un gradiente de concentración antimicótica alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada, por el tamaño de la zona de

inhibición del crecimiento micótico. El diámetro obtenido (entre el disco y el crecimiento) dependerá, no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del grosor de la capa del medio de Muller – Hinton, su pH y composición, de la capacidad de difusión del antimicótico en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación micótica, del tamaño del inóculo y la fase de crecimiento del hongo. Todas estas, son las variables más importantes que afectan el resultado.^{36, 37}

3.3 Definición de términos básicos

- **Antimicótico:** Sustancia que tiene la capacidad de ocasionar alteración de la estructura celular fúngica, la cual consigue inhibir su desarrollo, provocando su muerte.
- **Plantas medicinales:** Especie vegetal que contiene en toda o en alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades.
- **Fitocomponentes:** son sustancias químicas presentes y sintetizados en los vegetales, que cumplen funciones no esenciales en ellas, pero que ayudan a prevenir numerosas enfermedades.
- **Medicina Tradicional:** Conjunto heterogéneo de medidas terapéuticas que constituyen el contenido de medicinas conocidas también como “autóctonas” o “populares”.
- **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.

- **Medio de cultivo:** son soluciones estériles que tienen micro y macronutrientes, sustancias que permiten el desarrollo de microorganismos.
- **Cultivo:** es el producto del crecimiento del organismo o grupos de organismos, establecido con fines experimentales.
- **Difusión en Agar:** Es cuando disco impregnado de antibiótico que se difunde desde el disco al medio de cultivo, produciendo una zona de inhibición en la cual la concentración crítica de antibiótico inhibe el crecimiento de los microorganismos.
- **Principio activo:** Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y de uso terapéutica de una droga.
- **Agente patógeno:** Es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedades o daños a la biología de un huésped.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Tipo y nivel de investigación:

4.1.1 Tipo de investigación

Transversal: Porque la variable será medida en una sola ocasión y luego analizada.

Prospectiva: Porque la investigación se desarrolló desde la fecha de aprobación en adelante.

4.1.2 Nivel de Investigación

Comparativo: Porque se procedió a observar y describir los resultados obtenidos.

4.2 Método y diseño de la investigación:

4.2.1 Método de la investigación

Deductivo: Porque el estudio parte de lo general a lo específico.

4.2.2 Diseño de la investigación

No experimental: Porque la variable no fue manipulada.

4.3 Población y muestra de la investigación

4.3.1 Población:

15 kg del recurso vegetal de *Tagetes filifolia* (anisillo) proveniente de la provincia de Concepción del departamento de Junín a 3 443 m.s.n.m.

4.3.2 Muestra:

- Aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) y
- Extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo).

4.4 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos:

4.4.1 Técnicas

a. Maceración: Es la técnica que se empleó para la obtención del extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo).

b. Método de destilación por arrastre de vapor de agua: Es la técnica para la extracción del aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo).

- c. Método de difusión en agar según Kirby -Bauer:** Se utilizó para la determinación de la actividad antimicótica. La técnica utilizada se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia con la formación de halos alrededor de las colonias según el método estandarizado y recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (Clinical Laboratory Standard Institute).³⁵
- d. Marcha fitoquímica:** Se utilizó la técnica estandarizada que permitió determinar cualitativamente los metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo), mediante cambios de color o formación de precipitados.

4.4.2 Instrumentos de recolección de datos

Ficha de recolección de los datos, obtenidos en la determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial y extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo), (anexo 17).

4.5 Procedimiento:

4.5.1 Identificación Taxonómica

La identificación y clasificación taxonómica del recurso vegetal se llevó a cabo en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se evaluó la planta completa que fue identificada como *Tagetes filifolia* (anisillo) según el sistema de clasificación de Cronquist (1988).

4.5.2 Preparación del extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Este proceso se realizó en la facultad de Farmacia y Bioquímica en el Centro de Control Analítico CENPROFARMA, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, lugar en el cual se realizaron los siguientes pasos:

a. Recolección: Mediante la recolección se ha procedido a reunir determinada cantidad de la especie vegetal de *Tagetes filifolia* Lag (anisillo). Ello fue realizado en la provincia de Concepción en el departamento de Junín ubicado en el centro-oeste del país, en la región andina, lugar en el cual se encuentra dicha especie.

b. Selección: Una vez recolectada la especie vegetal libre de contaminante y en buen estado, se procedió a limpiar y lavar con abundante agua, para luego retirar la raíz, quedarse únicamente con las hojas y tallos tiernos.

c. Desecación: En esta etapa se dejó secar el recurso vegetal durante dos días a temperatura ambiente.

d. Molienda: Una vez que se tiene nuestro recurso vegetal seco se procedió con la molienda de *Tagetes filifolia* Lag (anisillo), que básicamente viene a ser el hecho de pulverizar, triturar, picar antes de poner en contacto con el solvente.

e. Maceración: La maceración de *Tagetes filifolia* (anisillo) se realiza en un frasco color ámbar, en el cual se colocó el recurso vegetal finamente pulverizado en etanol al 70%, por un periodo

de catorce días, agitándose periódicamente todos los días para favorecer la extracción de los principios activos.

f. Extracción: Una vez transcurrido los catorce días de maceración en etanol al 70%, se procedió con el filtrado utilizando papel de filtro, para obtener el extracto de *Tagetes filifolia* (anisillo).

g. Evaporación: Después del filtrado se procedió a la concentración del extracto etanólico, llevándolo a la estufa a una temperatura no mayor de 40° C, para obtener un extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo).

4.5.3 Extracción del aceite esencial de *Tagetes filifolia* lag (anisillo)

Este proceso se realizó en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, facultad de Ingeniería Química. Es así que para realizar la extracción del aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) se utilizó el método de arrastre con vapor de agua, para lo cual se procedió a realizar los siguientes pasos:

a. Recepción de la materia prima: Primeramente, la materia prima utilizada para la extracción del aceite esencial, fueron las hojas y tallos de *Tagetes filifolia* (anisillo) frescas.

b. Selección y limpieza: Posteriormente se seleccionó el recurso vegetal de acuerdo a sus características físicas separando material con signos de degradación, seguidamente se eliminó cuidadosamente las raíces.

c. Pesado: Una vez que se obtuvo el recurso vegetal, se procedió con el pesado de *Tagetes filifolia* (anisillo) en su estado fresco.

d. Destilado: Luego de haber realizado el pesado del recurso vegetal, se procedió a destilar 5 kg del recurso vegetal, sobre un fondo perforado o criba ubicado a cierta distancia del fondo de un tanque (destilador por arrastre de vapor). La parte más baja de esta contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. Se acopló al tanque con serpentín donde recircula agua fría como refrigerante para facilitar la condensación del vapor. El calentamiento se produce con vapor saturado que se provee de una fuente de calor que compone el equipo; fluye mojado y a presión baja, penetrando al material vegetal. Los componentes se volatilizan y condensan en un refrigerante, formando una mezcla de aceite esencial y agua; siendo recogidos para luego proceder al decantado.

e. Decantado: El decantado es el proceso mediante el cual se elimina el agua, se colocó esta mezcla en una pera de separación, cubriéndola con papel aluminio de modo que no tenga contacto el aceite esencial con la luz. En una pera de decantación es posible separar la mayor parte del agua, eso gracias a la diferencia de densidades que existe entre el agua y el aceite esencial.

f. Envasado: Se envasó en frascos de vidrio oscuros, para evitar el contacto con la luz solar y, también, alejado del oxígeno del aire para evitar alteraciones del aceite esencial, hasta el momento de estudio.

4.5.4 Marcha fitoquímica

Este proceso se realizó en la Universidad Alas Peruanas, laboratorio de la facultad de Farmacia y Bioquímica para lo cual se realizaron las siguientes reacciones químicas con el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo):

- a. **Reacción de Molish:** Permite comprobar la presencia de carbohidratos mediante la formación de un anillo de color rojo violeta en la interface.
- b. **Reacción de Fehling:** La formación de un precipitado de color rojo ladrillo, indica la presencia de carbohidratos reductores.
- c. **Reacción de Borntrager (NaOH al 5%):** La formación de una coloración rojo cereza identifica la presencia de antraquinonas.
- d. **Reacción de gelatina-sal:** La formación de un precipitado translúcido permite identificar la presencia de taninos.
- e. **Reacción de cloruro férrico:** La formación de color azul o verdoso permite identificar la presencia de compuestos fenólicos.
- f. **Reacción de Shinoda:** El cambio de color del extracto a tonalidades rosadas, amarillentas, naranja, permite identificar la presencia de flavonoides.
- g. **Reacción de Dragendorff:** La formación de un precipitado rojo anaranjado permite identificar la presencia de alcaloides.

h. Reacción de Mayer: La formación de un precipitado blanquecino o turbidez, indica presencia de alcaloides.

4.5.5 Determinación de la actividad antimicótica por el método de difusión en agar según Kirby –Bauer

Este proceso se realizó en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, facultad de Farmacia y Bioquímica CENPROFARMA centro de control analítico para lo cual se procedió a realizar los siguientes pasos:

Cepas bacterianas: En el estudio realizado se empleó cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

a. Preparación del inóculo: A partir de colonias puras del microorganismo *Candida albicans* (ATCC 10231) y diluidas en un tubo de ensayo que contiene 10 ml de suero fisiológico estéril (cloruro de sodio 0.9%) de tal manera que cumpla con 0.5 la escala Mac Farland el cual corresponde a una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml.

A partir de esta última solución, realizar una dilución de 1 en 3, para ello, de esta solución preparada, tomar 3ml y diluir a un volumen total de 9ml con suero fisiológico estéril lo que equivale a una concentración de 1×10^8 UFC/ml.

b. Preparación del medio: Se utilizó como medio nutritivo agar Mueller - Hinton suplementado con 2% de glucosa que se preparó según instrucciones del fabricante y se controló el pH (7.2 – 7.4). Luego, se vertió el preparado en placas Petri de vidrio estéril de 90 mm, hasta obtener un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm.

c. Sembrado de cepas: Los inóculos de *Candida albicans* (ATCC 10231) utilizados fueron 1×10^8 UFC/ml. Se colocaron 100µl sobre el medio de cultivo ya solidificado, con ayuda de un hisopo estéril y siguiendo tres direcciones de siembra se consiguió una buena dispersión del inóculo, se dejó reposar por 15 minutos.

d. Aplicación de discos: Se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (disco de sensibilidad sin antibióticos), con una cantidad determinada del aceite esencial y el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo).

Control positivo: Fluconazol 25µg, los discos empleados fueron de la marca OXOID.

Control negativo: Se empleó etanol 96% y dimetilsulfoxido (DMSO sin actividad antimicótica). Las pruebas se realizaron por triplicado.

Estas son colocadas con la ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente, para que queden adheridos al medio. Deben de mantener una distancia de 15mm del borde de la placa para evitar la superposición de los halos de inhibición. Cada muestra se trabajó por triplicado.

Las placas se incubaron entre 18 - 24 horas a 35°C: Estas son colocadas invertidas; transcurrido este tiempo se procedió a la observación y medición de las zonas de inhibición de crecimiento (diámetro), expresado en milímetros.

El aceite esencial y extracto etanólico fueron colocados de la misma manera, tres discos por cada placa, estos también fueron incubados a 35°C durante 18 – 24 horas.

e. Lectura de los halos: La lectura se realizó después de 18 – 24 horas de la incubación. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento con vernier digital. De los valores obtenidos, se calculó el diámetro promedio, que fue considerado para estimar la actividad antimicótica.

CAPÍTULO V
PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS
RESULTADOS

5.1 Análisis de tablas y gráficos e interpretación

Cuadro N° 2 Características del aceite esencial de *Tagetes filifolia*
(anisillo)

Características del aceite esencial <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	
Aspecto	Líquido transparente y fluido
Color	Transparente, amarillo tenue.
Olor	Penetrante
Sabor	Dulce, levemente picante
Densidad	0.9842g/ml

Fuente: Elaboración propia

Se presenta las características organolépticas principales del aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) y su densidad.

Cuadro N° 3 Solubilidad del aceite esencial *Tagetes filifolia* (anisillo)

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Agua	Insoluble
Etanol 70°	Insoluble
Benceno	Soluble
Cloroformo	Soluble
Éter etílico	Soluble

Fuente: Elaboración propia

Se observa que el aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) es insoluble en agua y en etanol al 70°, soluble en benceno, cloroformo y éter etílico.

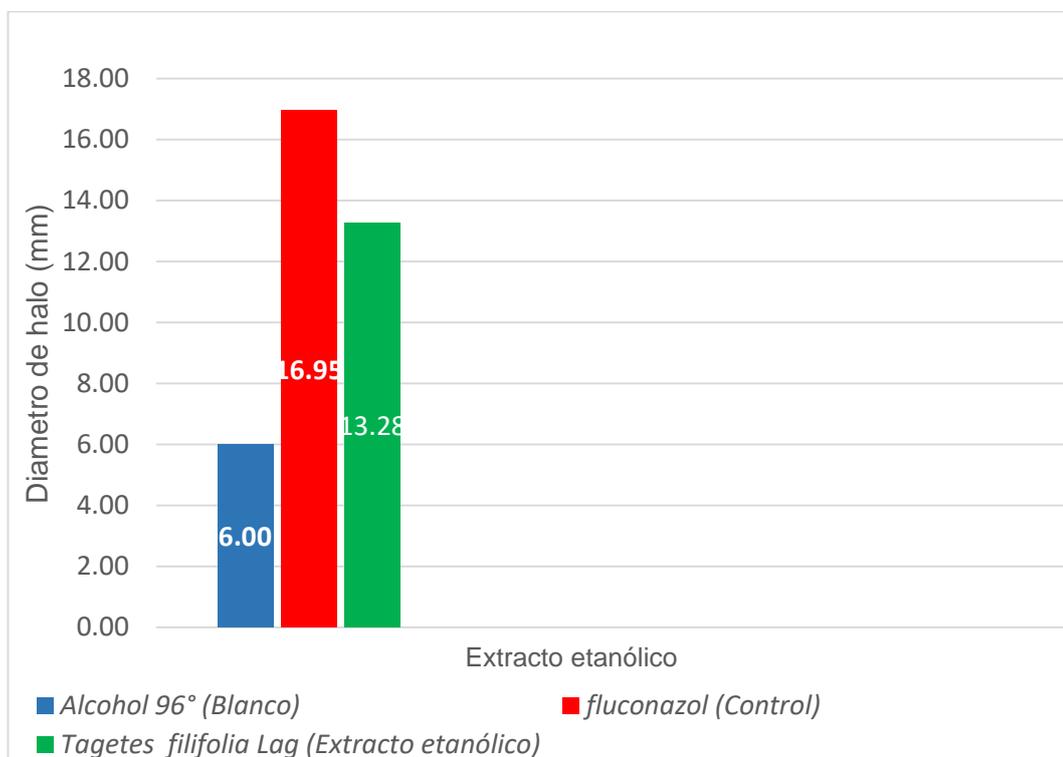
Cuadro N° 4 Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Metabolitos secundarios	Reactivos	Presencia
Carbohidratos	Molish	+
Carbohidratos reductores	Fehling	+
Taninos	Gelatina - sal	+
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico (III)	+
Flavonoides	Shinoda	+
Antraquinonas	Borntrager (NaoH al 5%)	+
Alcaloides	Dragendorff	+
Alcaloides	Mayer	+

Fuente: Elaboración propia.

Se observa los metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo): identificando presencia de carbohidratos, carbohidratos reductores, taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas y trazas de alcaloides.

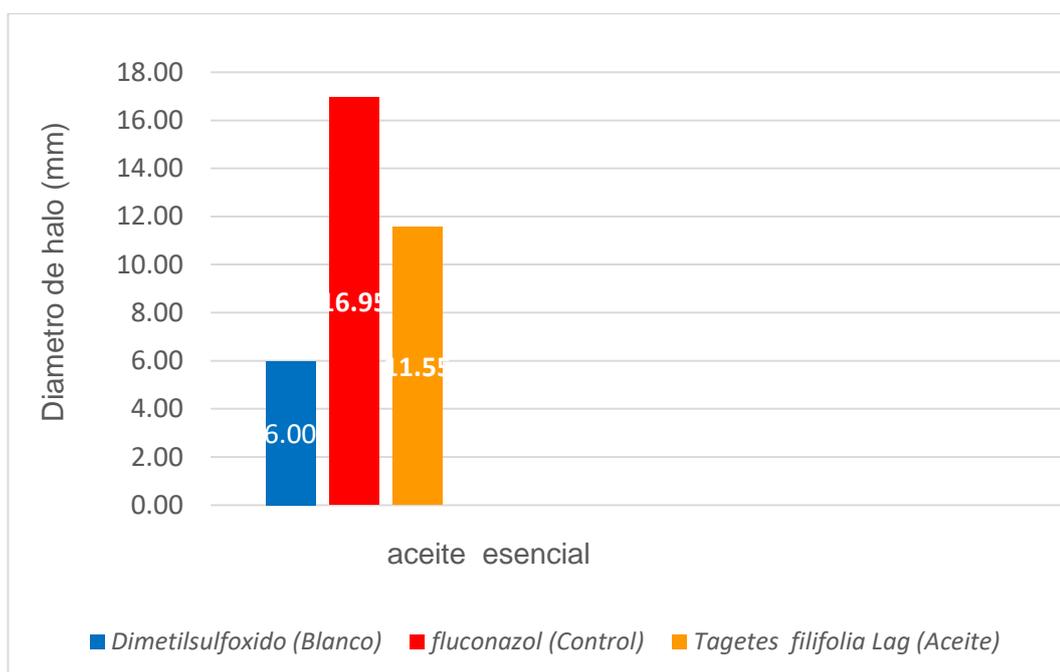
Grafico N°1 Actividad antimicótica del extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans* (ATCC 10231)



Fuente: elaboración propia.

Se observa que el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* Lag (anisillo) presentó actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) con un halo de inhibición de un diámetro de 13.28 mm.

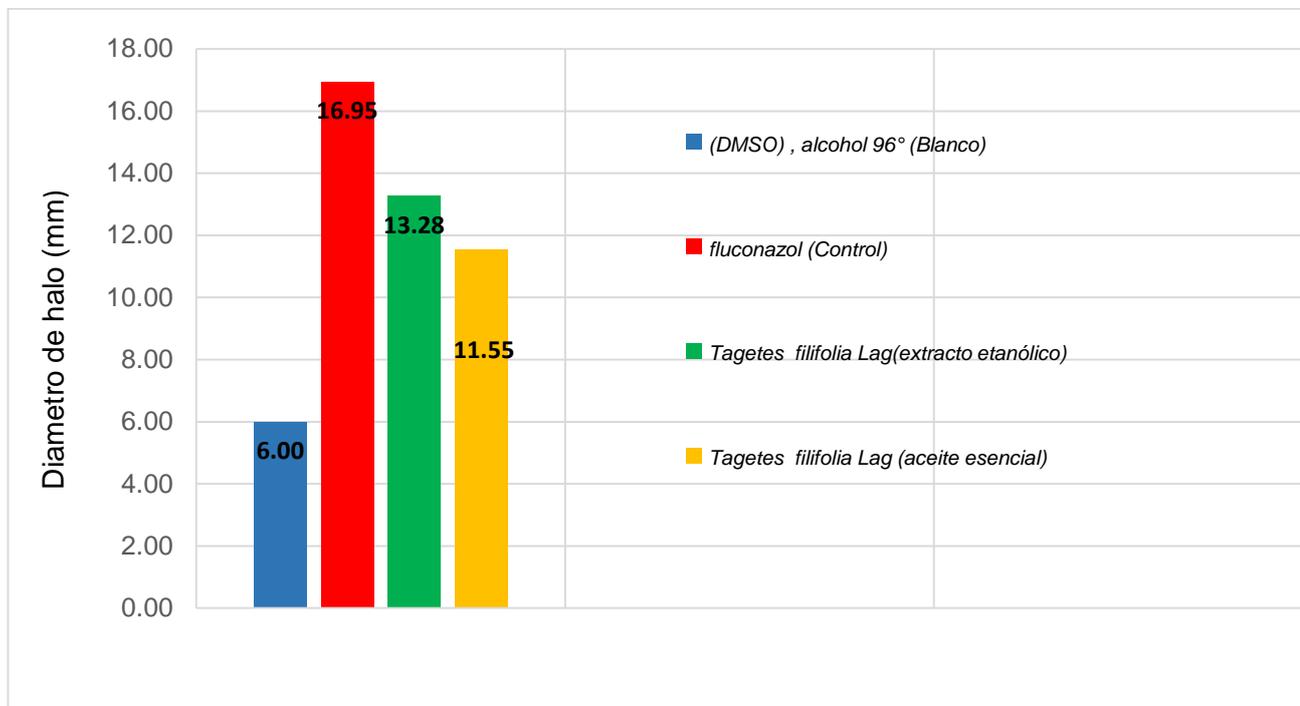
Grafico N°2 Actividad antimicótica del aceite esencial de *Tagetes filifolia* frente a *Candida albicans* (ATCC 10231)



Fuente: elaboración propia

Se observa que el aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) mostró actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) un halo de un diámetro de 11.96 mm.

Grafico N°3 Actividad antimicótica del aceite esencial y extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo) frente a *Candida albicans* (ATCC 10231)



Fuente: Elaboración propia

Se observa que el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo) muestra mayor actividad antimicótica con un halo de inhibición de 13.28 mm de diámetro, y el aceite esencial presentó un halo de 11.55 mm.

5.2 Discusión

Investigaciones que se han realizado en la búsqueda de nuevos componentes bioactivos con actividad antimicrobiana a partir de principios naturales, dentro de ellos, numerosos estudios han sido enfocados hacia el desarrollo de la actividad antimicrobiana en extractos y aceites esenciales de recursos vegetales con propiedades medicinales y aromáticas.

En el presente trabajo de investigación se comprobó la actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) de los productos obtenidos de *Tagetes filifolia* (anisillo) cuyos resultados fueron con un diámetro de halo de inhibición promedio de 13.28 mm y 11.55 mm respectivamente, concordando con la investigación realizada por Rea Martínez, Julio L. **Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextracto etéreo y clorofórmico de *Drymaria ovata* y *Tagetes filifolia* Lag.** En que en ella reportó una actividad parcial del extracto etanólico de *Tagetes filifolia* Lag a concentración de 10.000 µg/ml frente a *Candida albicans* (ATCC 10231). El subextracto etéreo de *Tagetes filifolia* Lag a concentración de 10.000 µg/ml es activo frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) y el subextracto clorofórmico a concentración de 10.000 µg/ml presenta actividad parcial frente a *Candida albicans*, datos que reafirman la actividad antimicótica de *Tagetes filifolia* Lag (anisillo) no obstante las técnicas microbiológicas empleados fueron diferentes, a pesar de trabajar con la misma especie.¹⁰

En la investigación realizada a cabo por Tapia Contero, J.A. **Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*** dichos resultados obtenidos que el extracto etanólico a 10 000, 1000 µg/ml de

Tagetes zipaquirensis tiene actividad antimicótica frente a *Candida albicans*, y que sus componentes fitoquímicos de *Tagetes zipaquirensis* son: flavonas, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenolactonas, taninos catéticos. Según este estudio la actividad se debe a los componentes representativos presentes en la familia Asteraceae y género *Tagetes* a un sea de diferente especie.⁹ Estos resultados concuerdan con la investigación realizada por Uvidia Ortiz, R.A **Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus*, y *Tagetes minuta* L.** donde los extractos de *Tagetes minuta* y sus respectivos subextractos etéreos y clorofórmicos presentan actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados ya sea de forma parcial y total. Y que *Tagetes minuta* L presentan compuestos bioactivos como flavonoides, taninos y aceite esencial.⁸

Datos respaldados por Tuyo Llipita. L. **Efecto de la actividad antimicótico in vitro del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a *Candida albicans*.** Los resultados obtenidos evidenciaron la actividad antimicótica mediante la formación de halos de inhibición de 11, 17, 24, 28, 32 y 46 mm de diámetro frente a *Candida albicans*. La composición fitoquímica del aceite esencial de *Tagetes minuta* L., revelan principalmente monoterpenos hidrocarbonados y monoterpenos oxigenados y los compuestos derivados de alcoholes.⁵ Sus resultados fueron positivos los que respalda nuestra investigación. sin embargo. Cabe recalcar, que no trabajó con la misma especie vegetal, pero si pertenece al mismo género y familia. De la misma forma, el estudio efectuado por Segovia Barrientos I.K. et al. **Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith “Chincho” y actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica** cuyos resultados obtenidos de los componentes químicos cualitativa nos indica que está conformado: 2-

metil-1-butil acetato; 2(10)- pineno,1r- α -pineno, 1-verbenona, α -cadinol. forbol, ambrosin, butanimida, isocariofileno. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*, para *Candida albicans* presento actividad antifúngica fue con un halo de inhibición de 0.71 mm. resultados inferiores al estudio realizado.⁶

Asimismo, en el presente estudio la marcha fitoquímica nos permitió identificar que *Tagetes filifolia* (anisillo) contiene compuestos fenólicos, lo que concuerda con la investigación efectuada por Jara Villareal, L **Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes filifolia* “anisillo” sobre cepas de *Escherichia coli***, donde determinó presencia de flavonoides, quinonas, taninos y alcaloides. Lo que respalda nuestra investigación con respecto a sus componentes químicos de *Tagetes filifolia* (anisillo), los cuales podrían ser responsables de su actividad antimicótica.⁴ Datos que también concuerdan con la investigación efectuada por Bonilla R, P, et al. **Efecto de la gravidez, la prolactina y hormonas sexuales en ratas del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo)** donde la identificación de sus fitocomponentes presentes en el subextracto metanólico, fueron compuestos fenólicos como flavonoides y alcaloides⁷ estudio que respalda nuestra investigación. Y en el estudio realizada por Sánchez Humala, R et. al. **Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de *Tagetes filifolia* Lag. (pacha anís)** donde señala que los principales componentes químicos presentes en *Tagetes filifolia* Lag fueron fenoles y quinonas³ responsables de las propiedades antibacterianas.

CONCLUSIONES

1. En el estudio, se evidenció que *Tagetes filifolia* (anisillo) tiene actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC 10231).
2. El extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo) presentó un halo de inhibición de 13.28 mm, evidenciándose su actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC 10231).
3. En el aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo), se observó un halo de inhibición de 11.55 mm, evidenciándose actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC 10231).
4. Se identificó que los metabolitos mayoritarios son los compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas y trazas de alcaloides.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con las investigaciones sobre *Tagetes filifolia* (anisillo). Esto permitirá conocer si presenta también actividad antifúngica frente a otros hongos causantes de afecciones micóticas en humanos.
- Continuar realizando investigaciones con el extracto etanólico y aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo) para establecer la concentración inhibitoria mínima (CMI).
- Realizar ensayos preclínicos en animales de laboratorio para descartar toxicidad, carcinogenicidad y embriotoxicidad de *Tagetes filifolia* (anisillo).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es>
2. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. [2013]: (72pp): Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
3. Sánchez H.R et al. Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de *Tagetes filifolia* Lag. “pacha anís.” Horiz. Med. [internet]. 2017 Ene [citado 2017-06-29]; 17(1): 18-24. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727.558X2017000100004&lng=es.
4. Jara VL. Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas *Tagetes filifolia* “anisillo” sobre cepas de *Escherichia coli*. Lima [Tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Alas Peruanas, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2015.
5. Tuyo Llipita. L. Efecto de la actividad antimicótico in vitro del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a *Candida albicans*. [Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2012.
6. Segovia Barrientos IK. et al. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith “Chincho” y actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica, Ciencia e investigación

[internet]. 2010 Ene [citado 2017-08-29]; 13(2): 81-86. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1619>.

7. Bonilla P, Lozano N, Arroyo J, Beltrán H. Efecto sobre la gravidez, la prolactina y hormonas sexuales en ratas del sub extracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* "Anisillo". Ciencia e Investigación. 2008; 11(1):7-14.
8. Uvidia Ortiz, R.A. Titulada Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus*, Y *Tagetes minuta* L. [Tesis para optar el Título de Bioquímico Farmacéutico]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba – Ecuador; 2012.
9. Tapia Contero, J.A. Titulada Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*. [Tesis para optar el Título de Bioquímico Farmacéutico]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Riobamba;2012.
10. Rea Martínez, J. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de (*Drymaria ovata*), (*Senna macrophylla*) Y (*Tagetes filifolia* Lag). [Tesis para optar el Título de Bioquímico Farmacéutico].: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador; 2012.
11. Kuklinski, KC. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 2003.

12. Martínez M. aceites esenciales. Medellín: universidad de Antioquia Facultad de Química farmacéutica; 2003.
13. Flores M. Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso: análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo [Internet]. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2010 [citado: 2017, septiembre]. Disponible en: <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/105352>
14. Villar del Fresno, Ángel. M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis, S.A. España - Madrid 1999.
15. Háuad M L. Manuel de fitoterapia. Editorial Trillas S.A. México; 2010.
16. Bandoni, LA. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As; 2002.
17. Muñoz LF. Plantas Medicinales y Aromáticas estudio cultivo y proceso. Mundi – Prensa Madrid Barcelona; 2002.
18. Bruneton, J. Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S.A; 2001.
19. Mostacero LJ. Taxonomía de los fanerógamos útiles del Perú 1a Ed Perú: Normas Legales; 2002.
20. Sharapin, N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 1ª Ed, Colombia: Quebecor Impreandes; 2000.
21. Thompson W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1ª Ed, Barcelona: Blume; 1981.

22. Carrión AJ, García GC. "Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica" [Tesis para optar el título de Bioquímica y Farmacéutica]. Ecuador: Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Química; 2010.
23. Mostacero, L.J, Castillo, P.F, Freddy, M.C, Gamarra, T.O.A, Charcape, R.J, Ramírez, V.R.A. Plantas Medicinales del Perú. 1a Ed, Perú: Instituto Pacifico S.A.C; 2011.
24. Carhuapoma YM. Plantas aromáticas nativas del Perú. Biocomercio de fragancias, sabores y fitocosméticos. Editorial CONCYTEC. Lima, 2011. 238 p.
25. Barajas JS, Serrato MÁ. Poblaciones silvestres de tagetes filifolia Lag. En el centro-sur de México. Revista Fitotecnia Mexicana. 2006.
26. Villarreal Quintanilla JÁ. Familia compositae: tribu tageteae. 2003.
27. Lansing M.P, Harley P.J, Klein A.D. Microbiología 5a Ed Madrid: McGraw- Hill –Interamericana de España, S.A.U; 2004.
28. Brooks, G.F, Carroll, C.K, Butel, S.S, Morse, A.S, Mietzne, A.T. Microbiología Médica. 25a Ed Mexico: McGraw- Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V; 2010.
29. Murray P, Rosenthal K, Kobayaski G, Pfaller M. Microbiología Médica. 7a Ed Madrid, España: Mosby; 2002.
30. konerman W Elmer, Allen D, Janda M. Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas color. 5ª Ed Medica Panamericana, Madrid - España; 1999.

31. Biasoli M. Candidiasis, pp. 1-31 [Internet] 2013. Centro de Referencia Micológica (COREMIC), [citado 2017 julio 25] disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf.
32. Vargas-Blanco D, Lynn A, Rosch J, Noreldin R, Salerni A, Lambert C, Rao RP. A pre-therapeutic coating for medical devices that prevents the attachment of *Candida albicans*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 2017; 16(1): 41.
33. Elmer. W Koneman. MD. Diagnostico Microbiológico: texto y atlas color. 6ª Ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2004.bb.
34. Robbins, Conan. Patología Estructural y Funcional: 7ª Ed. España: elservier España S.A 2006.
35. Farreras. Rozman Medicina Interna. 16ª Ed Madrid Barcelona elservier España. 2000.
36. Cantón. EL, Mazuelos. EM, Ingrff. AE. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27 – A3, M38- A y M44-A): [internet].2007 17(1) 24 <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>.
37. INS – M Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas Medicina & Laboratorio, Volumen 16, Números 7-8, 2010.
38. INS _ M Manual Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión 2007.

ANEXOS

Anexo 1

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	NIVEL Y MÉTODO	VARIABLES	POBLACIÓN Y MUESTRA
<p>¿Presenta actividad antimicótica el <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC1023)?</p> <p>Problemas específicos</p> <p>P.E.1: ¿Presenta actividad antimicótica el extracto etanólico al de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)?</p> <p>P.E.2: ¿Presenta actividad antimicótica el aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)?</p> <p>P.E.3: ¿Cuáles son los metabolitos contenidos en los productos obtenidos de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)?</p>	<p>Determinar si <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC10231).</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>O.E.1: Determinar si el extracto etanólico de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC10231).</p> <p>O.E.2: Determinar si el aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC10231).</p> <p>O.E.3: Identificar los metabolitos contenidos en los productos de <i>Tagetes filifolia</i> Lag (anisillo).</p>	<p><i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC10231).</p> <p>Hipótesis Especificas</p> <p>H.E.1: El extracto etanólico de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC10231).</p> <p>H.E.2: El aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) presenta actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i>. (ATCC10231).</p> <p>H.E.3: Los metabolitos mayoritarios presentes en los productos obtenidos de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) son los compuestos fenólicos</p>	<p>Tipo de Investigación</p> <p>Transversal: Porque la variable serán medida en una sola ocasión y luego analizada.</p> <p>Prospectiva: Porque la investigación se desarrolló desde la fecha de aprobación en adelante.</p> <p>Nivel de investigación</p> <p>Comparativo: Porque se procedió a observar y describir los resultados obtenidos.</p>	<p>Método de investigación</p> <p>Deductivo: Porque el estudio parte de lo general a lo específico.</p> <p>Diseño de la investigación:</p> <p>No experimental</p>	<p>Variable: Univariado</p> <p>Actividad antimicótica de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)</p> <p>Indicador:</p> <p>Diámetro de halo de inhibición.</p>	<p>Población:</p> <p>15 kg de la muestra vegetal de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) proveniente de la provincia Concepción del departamento de Junín.</p> <p>Muestra:</p> <p>Aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo) y Extracto etanólico de <i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)</p>

Título: ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE *Tagetes filifolia* (anisillo) FRENTE A *Candida albicans*

Anexo 2

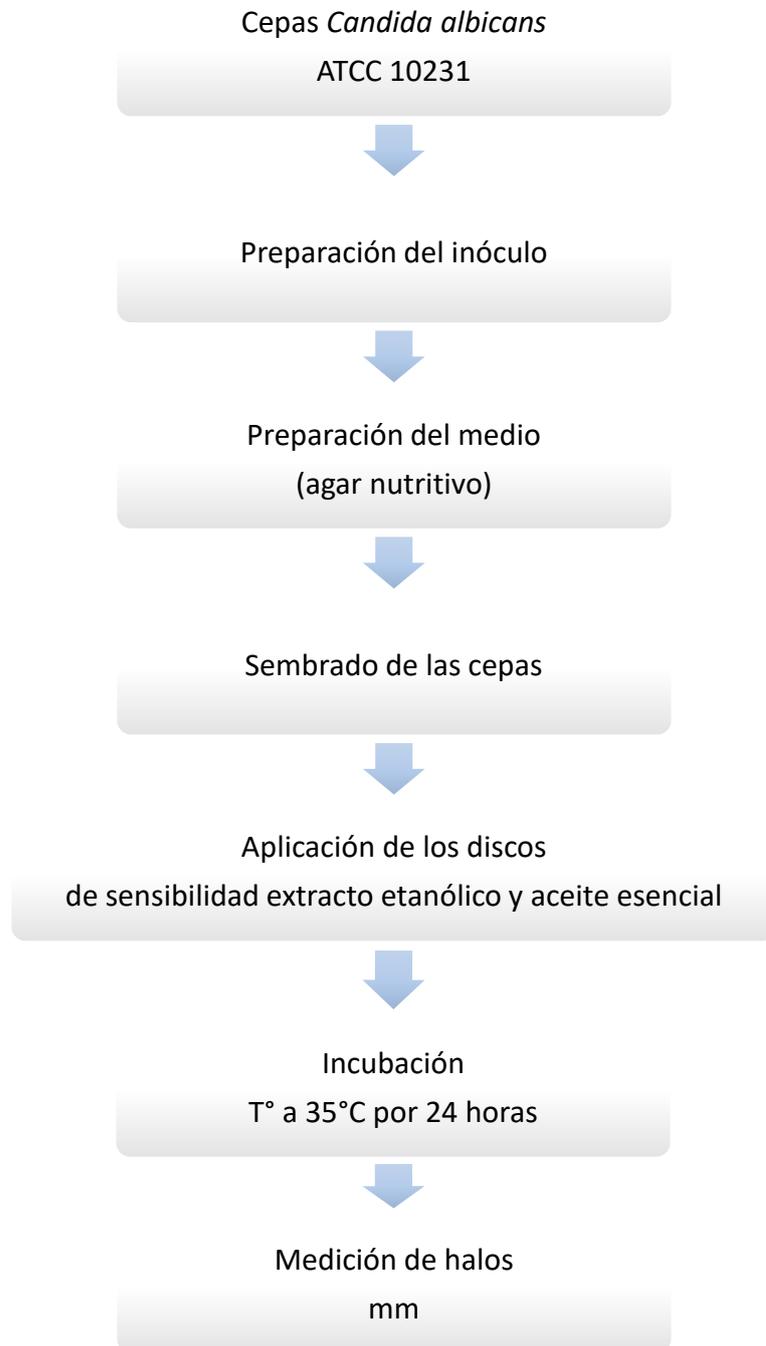


Diagrama de flujo: método de Kirby - Bauer

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3

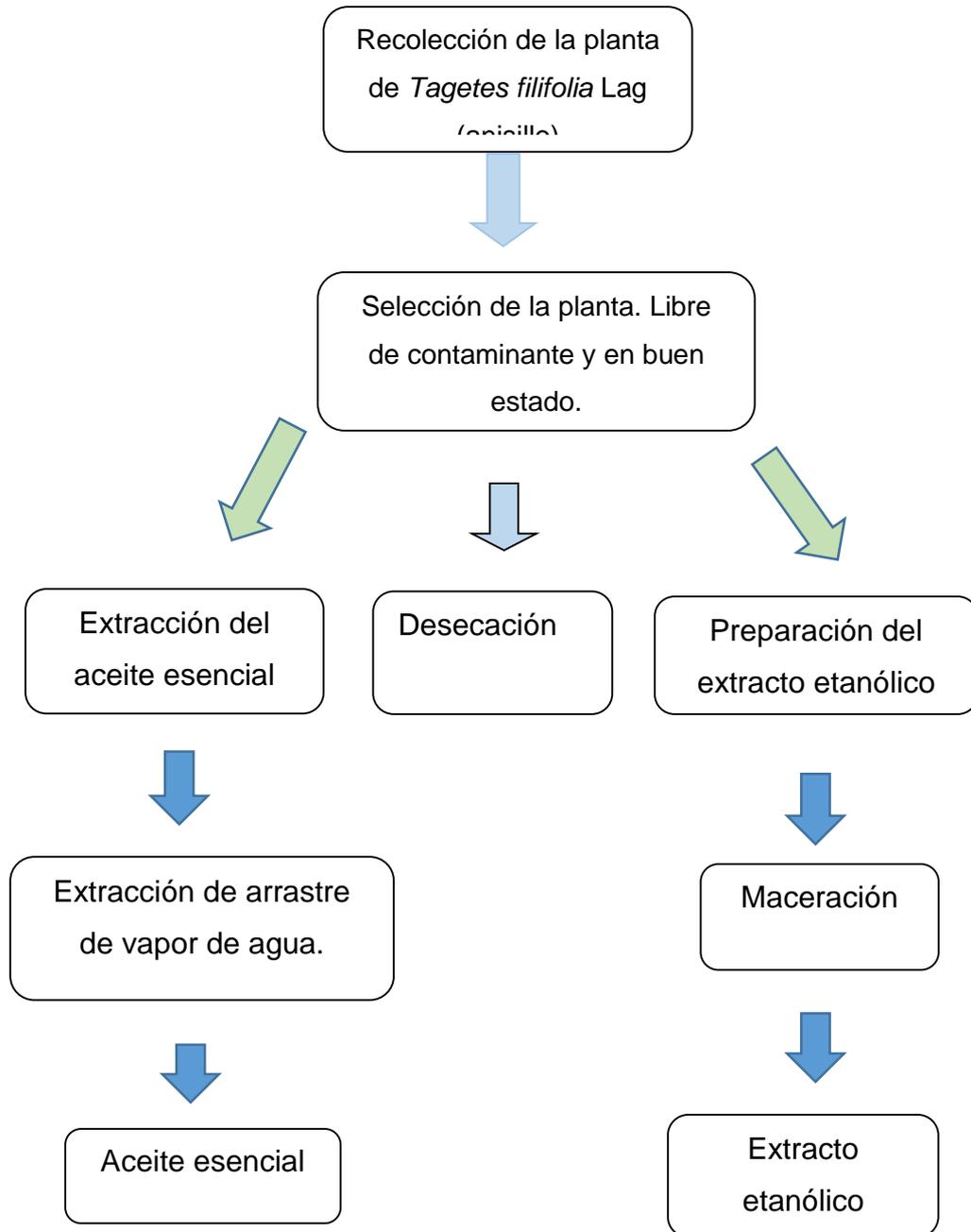
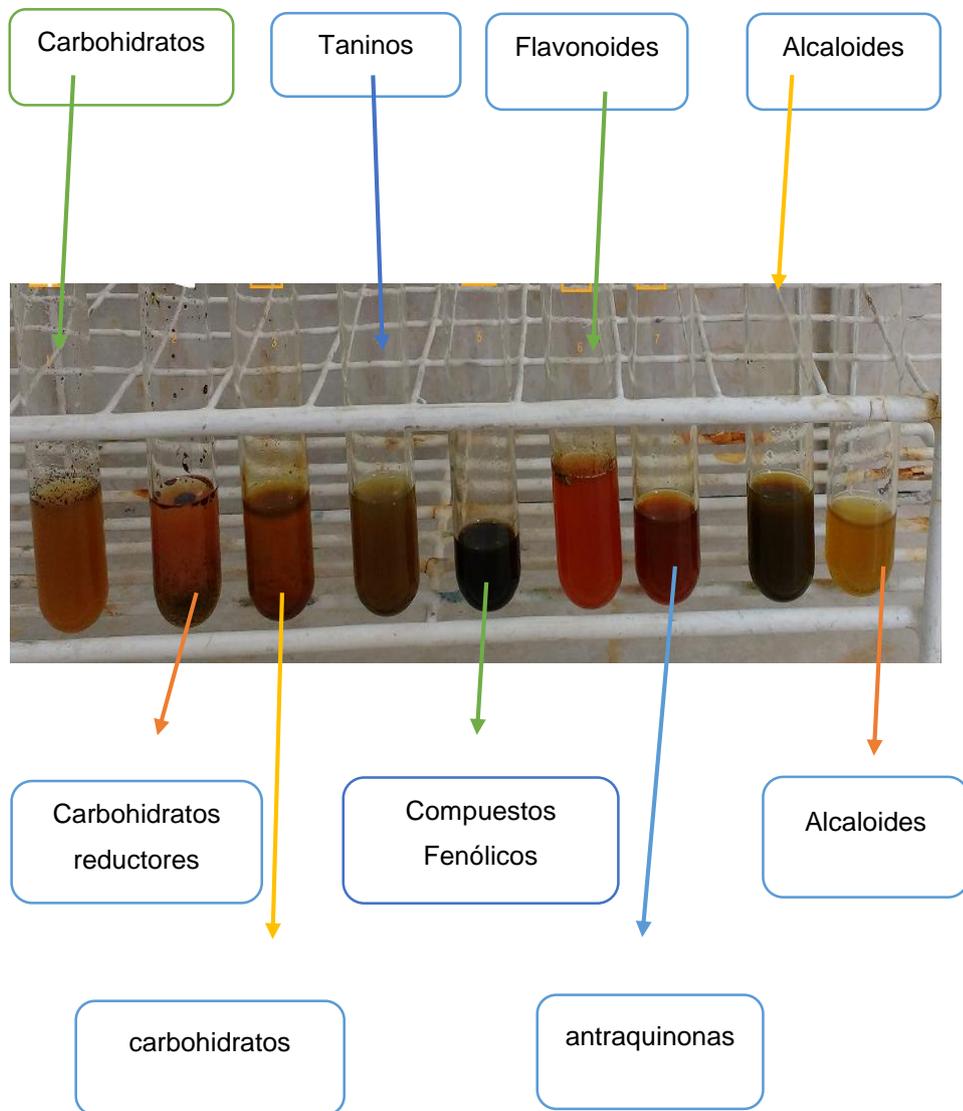


Diagrama de la obtención de los productos de *Tagetes filifolia* (anisillo) para el estudio antimicótico

Fuente: Elaboración propia

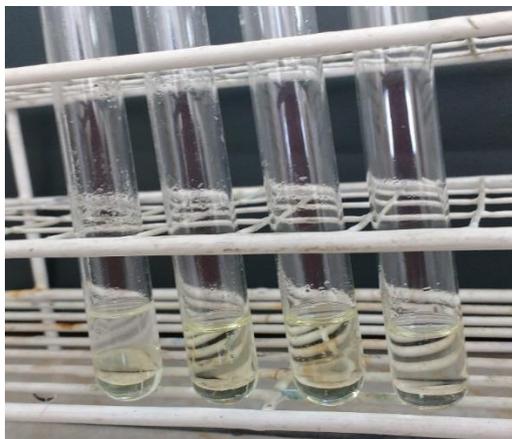
Anexo N°4



Ensayo de la marcha fitoquímica

Fuente: Elaboración propia

Anexo N° 5



Ensayo de solubilidad del aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Fuente: Elaboración propia



Ensayo de solubilidad del aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Fuente: Elaboración propia

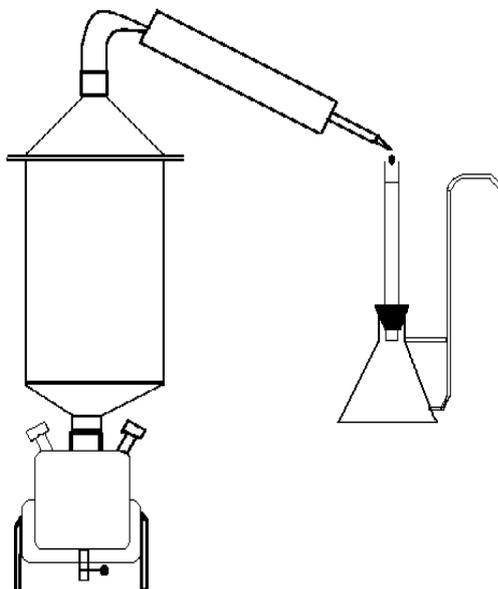
Anexo N° 6



Proceso de extracción del aceite esencial

Fuente: Elaboración propia

Anexo N°7



Equipo de Arrastre con Vapor para el proceso de extracción del aceite esencial

Fuente: Elaboración propia

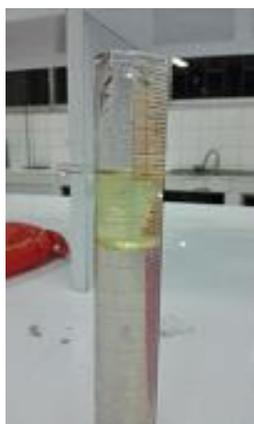
Anexo N°8



Decantación del aceite esencial

Fuente: Elaboración propia

Anexo N°9



Volumen obtenido del aceite esencial

Fuente: Elaboración propia

Anexo N°10



Extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Fuente: Elaboración propia

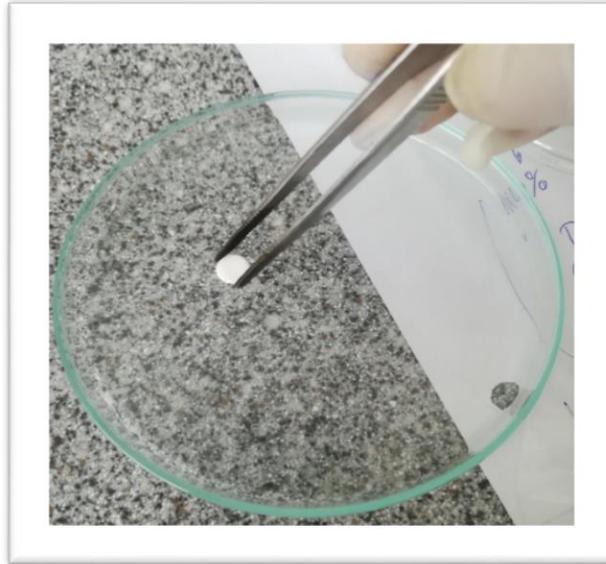
Anexo N°11



Placas previas a ser plaqueadas con el agar Miller Hinton

Fuente: Elaboración propia

Anexo N°12



Aplicación de los discos

Fuente: Elaboración propia

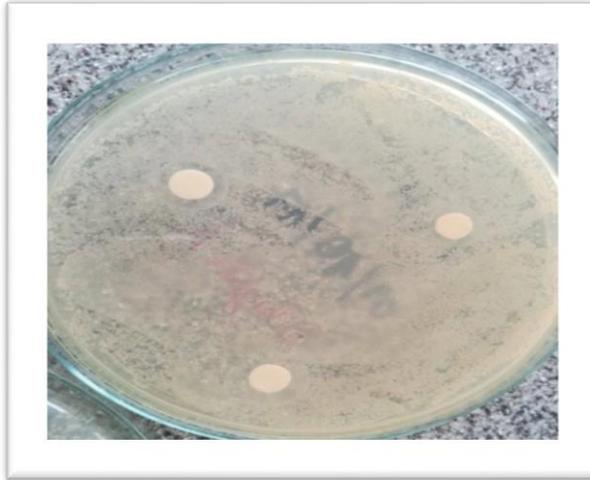
Anexo N° 13



Sembrado de las placas con la muestra

Fuente: Elaboración propia

Anexo N°14



Sembrado

Fuente: Elaboración propia

Anexo N° 15



Halos de inhibición extracto etanólico de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Fuente: Elaboración propia

Anexo N°16



Halo de inhibición del aceite esencial de *Tagetes filifolia* (anisillo)

Fuente: Elaboración propia

Anexo 17

CEPAS	PLACAS PETRI	PREPARADO				DISCO DE ATM
		Aceite esencial	Extracto etanólico	Control negativo	Control positivo	
<i>Candida albicans</i>						

Ficha de recolección de datos

Fuente: Elaboración propia