



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS
DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

TESIS:

**“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ACEITE
ESENCIAL DE LAS HOJAS DEL *Tagetes minuta*
(huacatay) SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA”**

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

**PRESENTADO POR LA BACHILLER:
NORMA PURE MALMOREJON**

**ASESOR:
MG. JUANA CALDERON SÁNCHEZ**

LIMA - PERÚ, JUNIO 2018

DEDICATORIA

A Dios por protegerme durante todo mi camino y darme salud y fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de mi vida. A mis padres Daniel y Eugenia por su apoyo incondicional en cada momento. A mis hermanos y amigos por su apoyo, tiempo y motivación durante esta investigación.

AGRADECIMIENTO

A la asesora Mg. Calderón Sánchez Juana por su esfuerzo, dedicación y tiempo durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la asesora Mg. Cecilia Ignacio Punin por su apoyo en la estructura metodológica de este documento.

A todas las demás personas que colaboraron en la realización de mi trabajo.

ÍNDICE

CARÁTULA	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	xii
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	14
1.2 Problemas de la investigación	15
1.2.1 Problema General	15
1.2.2 Problemas Específicos	15
1.3 Objetivos de la investigación	16
1.3.1 Objetivo General.....	16
1.3.2 Objetivos Específicos	16
1.4 Justificación, importancia y limitaciones de la investigación	17
1.4.1 Justificación.....	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	20
2.1 Hipótesis de la investigación	20
2.1.1 Hipótesis General	20
2.1.2 Hipótesis Específicas	20
2.2 Variables de la investigación	21
2.2.1 Identificación y clasificación de variables	21
2.2.2 Operacionalización de variables	22
CAPÍTULO III MARCO TEÓRICO	23
3.1 Antecedentes de la investigación	23
3.2 Bases Teóricas	27
3.2.1 Medicina Tradicional y natural	27
3.2.1.1 Fitomedicina y Fitoterapia	28
3.2.1.2 Fitofármacos y Fitomedicamentos	29
3.2.2 Género <i>Tagetes</i>	29
3.2.2.1 <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay)	30
3.2.3 Aceite esenciales	34
3.2.3.1 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales	35
3.2.3.2 Distribución en la naturaleza	36
3.2.3.3 Propiedades fisicoquímicas	36
3.2.3.4 Composición química	37
3.2.3.5 Aplicaciones de los aceites esenciales	38
3.2.3.6 Toxicidad de los aceites esenciales	38

3.2.3.7 Métodos para la obtención del aceite esencial	39
3.2.4 Las Bacterias.....	42
3. 2.4.1 Clasificación de las bacterias	44
3. 2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	47
3.2.4.3 <i>Escherichia coli</i>	50
3.2.5 Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial	55
3.2.5.1 Método difusión en agar (Kirby Bauer)	55
3.2.5.2 Métodos de dilución	56
3.3 Definición De Término Básicos	57
CAPÍTULO IV METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	59
4.1 Tipo y Nivel de la Investigación.....	59
4.1.1 Tipo de Investigación.....	59
4.1.2 Nivel de Investigación.....	59
4.2 Métodos y Diseño de la investigación	60
4.2.1 Método de investigación	60
4.2.2 Diseño de investigación.....	60
4.3 Población y Muestra de la investigación	60
4.3.1 Población.....	60
4.3.2 Muestra	60
4.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	60
4.4.1 Técnicas	60
4.4.2 Instrumentos	61
4.5 Procedimiento de recolección de datos	61

CAPÍTULO V : PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	63
5.1 Análisis de cuadros.....	63
5.2 Discusión de los resultados	68
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	81

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 01	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay) al 100% frente a cepas ATCC.....	64
CUADRO N° 02	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay) al 75% frente a cepas ATCC.....	65
CUADRO N° 03	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay) al 50% frente a cepas ATCC.....	66
CUADRO N° 04	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay) al 25% frente a cepas ATCC.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 01	Extracción con arrastre de vapor.....	40
FIGURA N° 02	Extracción por fluido supercrítico	41
FIGURA N° 03	Diferencia estructural entre bacterias gram positivas y gramnegativas.....	47
FIGURA N° 04	Constancia de identificación taxonómica de <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay)	84
FIGURA N° 05	Constancia de extracción del aceite esencial	85
FIGURA N° 06	Constancia de análisis microbiológico.....	86
FIGURA N° 07	Extracción del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay)	87
FIGURA N° 08	Prueba de Solubilidad dimetilsulfoxido y metanol.	88
FIGURA N° 09	Cepas patógenas ATCC.....	89
FIGURA N° 10	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	90
FIGURA N° 11	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	91

RESUMEN

Nuestro país presenta gran diversidad de especies vegetales con propiedades medicinales, por este motivo es importante el presente trabajo, que se realizó con un recurso vegetal procedente de Andahuaylas – Apurímac. *Tagetes minuta* L. conocida como huacatay, a la que se le atribuye propiedades farmacológicas como actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antifúngica y antioxidante. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC. Para la obtención del aceite esencial se utilizó la destilación por arrastre de vapor, y luego se determinó su actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones mediante el método de difusión en agar según Kirby Bauer. El resultado de la investigación reveló que el aceite esencial en concentraciones al 100%, 75%, 50% y 25% presentaron actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 mostrando halos de inhibición con un promedio de 19.22mm, 17.14mm, 16.49mm y 12.44mm y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con promedios de 27.29mm, 24.82mm, 22.18mm y 14.73mm, respectivamente. Concluyendo que el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. presenta actividad antimicrobiana frente a las bacterias estudiadas; lo cual podría deberse a los metabolitos secundarios que contiene.

Palabra clave: *Tagetes minuta* L., aceite esencial, actividad antimicrobiana.

ABSTRAC

Our country presents a great diversity of plant species with medicinal properties, for this reason, this work is important, which was carried out with a vegetable resource from Andahuaylas - Apurímac. *Tagetes minuta* L. known as huacatay, to which pharmacological properties are attributed as an activity antimicrobial, anti-inflammatory, antifungal and antioxidant. The objective of the present investigation was to determine the effect of the concentration of the essential oil of the leaves of *Tagetes minuta* L. (huacatay) on its antimicrobial activity against ATCC strains. steam distillation was used to obtain the essential oil, and then its antimicrobial activity was determined at different concentrations using the agar diffusion method according to Kirby Bauer. The result of the investigation revealed that the essential oil at concentrations in 100%, 75%, 50% and 25% presented antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 8739 showing halos of inhibition with an average of 19.22mm, 17.14mm, 16.49mm and 12.44mm and against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 with averages of 27.29mm, 24.82mm, 22.18mm and 14.73mm, respectively. Concluding that the essential oil of *Tagetes minuta* L. presents antimicrobial activity against the bacteria studied; which could be due to the secondary metabolites it contains.

Keyword: *Tagetes minuta* L., essential oil, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre hizo su aparición sobre la tierra su afán primordial ha sido poseer conocimiento, pero el camino para llegar a éste cada vez se ha hecho más exigente. La información científica hoy en día, esta creciendo y el incremento del número de especies estudiadas hace que el investigador se vea obligado a adquirir un conocimiento serio y objetivo sobre la utilidad real de éstos recursos naturales.

La medicina tradicional, es una de las expresiones más importantes de la memoria ancestral de los pueblos, hace uso de un gran número de especies vegetales para el tratamiento de ciertas enfermedades. El conocimiento de las propiedades medicinales de estas especies está basado en la observación y experiencia, transmitido a través de generaciones y enriquecido por la integración cultural de la población nativa y migrante, este saber ha devenido en la medicina popular y la herboristería actual. Estos conocimientos, debidamente sistematizados, deben contribuir a resolver en parte los problemas de salud de la población menos favorecida y más alejada de la modernidad, cuyas posibilidades de curarse son limitadas por el alto costo de los fármacos modernos.

En el Perú, como en otros países en vías de desarrollo, las plantas medicinales representan aún la principal herramienta terapéutica en medicina tradicional. La flora peruana ofrece grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, considerando que ciertos microorganismos como las bacterias han evolucionado a un ritmo tan acelerado, la industria farmacéutica se ha visto obligada a realizar estudios científicos para vencer el reto que plantea ante la adquisición de resistencia antimicrobiana, lo cual es debido a muchos factores, entre ellos el uso incorrecto o indiscriminado de los fármacos convencionales.

Nuestro país presenta una amplia diversidad de especies vegetales, muchas de ellas conocidas por poseer propiedades medicinales que se caracterizan por tener principios activos, metabolitos secundarios y aceites esenciales, sin embargo existe otro gran grupo de estos recursos, de los cuales se tienen poca información sobre su actividad farmacológica y uso medicinal. Teniendo en cuenta esto, cada día se está impulsando la investigación de estos recursos, como es el caso de *Tagetes minuta* L. conocida como huacatay, quien presenta compuestos químicos como taninos, flavonoides, alcaloides, ocimeno y limoneno, a los cuales se les atribuye propiedades terapéuticas tales como actividad antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria y antioxidante.

Por tal razón el presente trabajo de investigación pretende determinar el efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana enfrentando in vitro cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

La historia del hombre está, estrechamente relacionada con especies vegetales medicinales, a las que siempre ha recurrido para el tratamiento de sus dolencias y enfermedades. Estos recursos empleados actualmente son la base para el desarrollo de nuevas terapias, entre ellos tratamientos antimicrobianos de origen natural, que en algunas zonas rurales e indígenas, se considera el único recurso del que disponen, por la falta de economía para la adquisición de fármacos modernos.^(1,2)

Así mismo, la práctica errónea de la automedicación da como resultado la posibilidad de que las bacterias desarrollen una modalidad de mutación denominada resistencia bacteriana, esto ha puesto en estado de alarma a la comunidad científica que ha vuelto la mirada a la medicina tradicional con el propósito de validar científicamente los recursos vegetales y sus aceites esenciales como

alternativa terapéutica por sus propiedades medicinales y antimicrobianas principalmente.

El Perú es uno de los 12 países privilegiados con mayor biodiversidad, se calcula que existen alrededor de 250 000 especies vegetales que requieren ser estudiadas, en el marco del rigor científico. La tendencia actual en la investigación es la búsqueda de propiedades medicinales de los aceites esenciales con fines terapéuticos, fundamentados con base científica.^(1,3)

Sin embargo, en varias especies se ha visto empíricamente y determinado metodológicamente principios activos de naturaleza antimicrobiana, siendo una de ellas *Tagetes minuta* L. muy conocida en nuestra región andina como huacatay, motivo por el cual será el punto de partida para este estudio científico.

1.2 Problema de la investigación

1.2.1 Problema General

¿Cuál es el efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana ?

1.2.2 Problemas Específicos

- ❖ ¿Cuál es el efecto de la concentración al 100% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?
- ❖ ¿Cuál es el efecto de la concentración al 75% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?

- ❖ ¿Cuál es el efecto de la concentración al 50% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?

- ❖ ¿Cuál es el efecto de la concentración al 25% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana.

1.3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Evaluar el efecto de la concentración al 100% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

- ❖ Evaluar el efecto de la concentración al 75% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

- ❖ Evaluar el efecto de la concentración al 50% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

- ❖ Evaluar el efecto de la concentración al 25% del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

1. 4 Justificación, importancia y limitaciones de la investigación

1.4.1 Justificación

En nuestro país no se cuenta con suficientes estudios científicos sobre las propiedades medicinales de *Tagetes minuta* L., aunque se tiene como referencia que posee acción antibacteriana y otras propiedades medicinales de importancia. Distintas investigaciones han reportado que estas acciones se deben a diversos compuestos químicos o metabolitos que se encuentran presentes en dicho recurso vegetal. La justificación teórica del presente estudio ya que se requiere verificar sus propiedades medicinales y determinar la concentración adecuada que presente actividad antimicrobiana.

La justificación social radica en el hecho de incentivar el uso de los recursos vegetales como una nueva alternativa terapéutica con información validada científicamente, ya que permitiría reducir el empleo inadecuado de los antibióticos, previniendo así la aparición de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana.

1.4.2 Importancia de la investigación.

Es de interés actual la búsqueda de nuevas propiedades farmacológicas en base a los recursos naturales ya que aproximadamente el 80% de la población principalmente de los países en vías de desarrollo usa la medicina tradicional⁽³⁾

La fitoterapia ha resultado ser más útil que la medicina moderna para el tratamiento de ciertas enfermedades. La importancia de realizar el presente estudio radica en buscar una nueva alternativa terapéutica para el hombre, que sea eficaz, natural, con menos reacciones adversas y de mayor acceso a la población económicamente menos favorecida. Así mismo otorgar importancia a recursos vegetales nativos de nuestro país muchos de las cuales tienen escasa información científica que avalen sus propiedades medicinales, siendo una de ellas, *Tagetes minuta L.*

Por otro lado este estudio brindará a la comunidad científica un aporte inicial para seguir investigando con más detalle con la finalidad de demostrar más actividades farmacológicas, permitiendo desarrollar en base a este recurso vegetal nuevos medicamentos en diferentes formas de presentación ya sea en jarabes, tabletas, cremas, entre otros.

1.4.3 Limitaciones de la investigación

La presente investigación se encontró con muchas limitaciones pudiéndolas resumir en:

- ❖ Escasez bibliográfica de investigaciones científicas en nuestro país, referentes al beneficio de las propiedades del aceite esencial de *Tagetes minuta L.* (huacatay) en el campo de la microbiología.

- ❖ El trabajo exige una investigación más minuciosa orientada a determinar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana, para lo cual se necesita buscar subvención económica.
- ❖ Las condiciones propias del estudio ya que por tratarse de un experimento in vitro simula las condiciones para el crecimiento de los microorganismos, lo cual difiere en cierta medida de la naturaleza de un estudio in vivo.

CAPITULO II

HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Hipótesis de la investigación

2.1.1 Hipótesis General

La concentración del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) modifica su actividad antimicrobiana.

2.1.2 Hipótesis Específicas.

- ❖ La concentración al 100% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- ❖ La concentración al 75% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

- ❖ La concentración al 50% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 .
- ❖ La concentración al 25% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

2.2 Variables de la investigación

2.2.1 Identificación y clasificación de los variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	Concentración del aceite esencial.
VARIABLE DEPENDIENTE	Actividad antimicrobiana.

Fuente: Elaboracion propia

2.2.2 Operacionalización de variables

Variable Independiente	Conceptualización	Indicadores	Categoría
Concentración del Aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (huacatay) al 100%, 75%, 50% y 25%.	Soluciones que contiene en gr del aceite esencial en ml del solvente.	Efecto de la concentración del aceite esencial.	Independiente Cuantitativa.
Variable Dependente	Conceptualización	Indicadores	Categoría
Actividad antimicrobiana.	Capacidad de inhibir crecimiento de bacterias por acción del aceite esencial.	Halos de inhibición (mm).	Dependente Cuali- Cuantitativa.

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes de la investigación

Pese a que se ha hecho una búsqueda exhaustiva no se ha encontrado suficiente información del recurso vegetal en estudio, por lo que se considerara datos de otra especie del mismo género que posee similar composición química.

❖ Antecedentes Nacionales

La investigación realizada por Alejo Mendoza Roger (2015) **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL de las hojas de *Tagetes elliptica* (chincho)** para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la Universidad Alas Peruanas. Realizó la investigación con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana de *Tagetes elliptica* (chincho). Para la obtención del aceite esencial utilizó la destilación por arrastre de vapor y luego analizó por marcha fitoquímica, así mismo, evaluó la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones del

aceite esencial. Los resultados mostraron que al 75% de la concentración del aceite esencial se encontró el máximo halo de inhibición de 22,06mm, al 50% fue de 21,23mm y al 25% de 18.82mm; en cuanto al análisis de composición química encontraron los compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, glicósidos, aminoácidos. Concluyendo que el aceite esencial de *Tagetes elliptica* (chincho) presentó actividad antibacteriana significativa frente a *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 22,06mm al 75% de concentración.⁽⁴⁾

La investigación realizada por Aracel Vargas Huaman (2013) **EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes minuta* L. SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Bacillus cereus*** para optar el título profesional de Biólogo-Microbiólogo en la Universidad Nacional de Trujillo. Realizó la investigación con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana de *Tagetes minuta* L. (huacatay). Para la obtención del aceite esencial utilizó la destilación por arrastre de vapor y evaluó la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar. Los resultados mostraron que frente a *Staphylococcus aureus* la concentración del aceite esencial al 5% presentó un halo de inhibición de 17.72mm y al 10% de 22.97mm; para *Bacillus cereus* al 5% fue de 28.55mm y al 10% de 39.62mm; *Salmonella typhi* al 5% fue de 17.78mm y al 10% de 24.28mm. Concluyendo que el aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay); tiene actividad antibacteriana frente a los microorganismos estudiados.⁽⁵⁾

Las investigaciones realizadas por Ingrid Karin Segovia Barrientos, Lucybel Suárez De la Cruz Lesly (2010) **COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes elliptica* Smith (Chincho) Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE,**

ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Realizaron la investigación con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante de *Tagetes elliptica* (chincho). Para la obtención del aceite esencial utilizaron la destilación por arrastre de vapor, en cuanto al análisis de los componentes químicos emplearon Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas. Así mismo, evaluaron la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar, respecto a la actividad antioxidante lo realizaron mediante la captación del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) y captación del radical libre superóxido producido por pirogalol. Los resultados mostraron que frente a *Staphylococcus aureus* se forma un halo de inhibición de 65 ± 5.56 mm; para *Staphylococcus epidermidis* fue de 56 mm, para *Bacillus subtilis* fue de 33.67 ± 0.58 mm; para *Escherichia coli* de 25 ± 1.41 mm; y para *Pseudomonas aeruginosa* fue de 32 ± 6.93 mm. Así mismo, presentó actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans* con un halo de inhibición de 47.5 ± 0.71 mm. Con respecto a las propiedades antioxidantes estas no fueron significativas; en cuanto al análisis de composición química se determinó metabolitos como α - pineno, Isocariofileno, verbenona, α - cadinol, forbol y ambrosina. Concluyendo que el aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith* presentó actividad antibacteriana y antifúngica significativa frente a los microorganismos seleccionados, ello podría deberse a la presencia de los compuestos isocariofileno, verbenona y α - pineno.⁽⁶⁾

❖ Antecedentes Internacionales

Carolina Lambrecht Gonçalves, Diane Bender Almeida Schiavon, Fernanda Voigt Mota, Angela Faccin, Ryan Noremberg Schubert, Gustavo Schiedeck, Luis Filipe Damé Schuch (2013) **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Cymbopogon citratus*, *Elionurus sp.* y *Tagetes minuta L.* CONTRA BACTERIAS QUE CAUSAN MASTITIS** Universidad Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, Brasil. Realizaron la investigación con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus sp.* y *Tagetes minuta L.* (huacatay). Para la obtención de aceites esenciales utilizaron el método de hidrodestilación y para extractos hidroalcohólicos por el método de maceración, así mismo evaluaron la actividad antimicrobiana y la concentración inhibitoria mínima mediante la técnica de microdilución en placa. Los resultados mostraron que el aceite esencial de *Tagetes minuta L.* al 5% presenta actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y al 1.25% frente a *Staphylococcus aureus*; su extracto hidroalcohólico no mostró actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, sin embargo frente a *Staphylococcus aureus* mostró actividad al 50%. Concluyendo que el aceite esencial de *Tagetes minuta L.* presentó mayor actividad antibacteriana que sus extractos hidroalcohólicos ⁽⁷⁾.

La investigación realizada por Rosa Ana Uvidia Ortiz (2012) **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE *Duranta triacanta Juss*, *Callistemon speciosus*, y *Tagetes minuta L.*** para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Escuela Superior Politécnica de Ecuador. Realizó la investigación con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de tres recursos vegetales entre

ellos *Tagetes minuta* L. Para la obtención de los extractos etanólicos utilizaron maceración de vegetales frescos y los subextractos etéreo y clorofórmico se extrajeron por inmiscibilidad utilizando embudos de separación con solventes como éter y cloroformo; así mismo los extractos se analizaron por marcha fitoquímica y la actividad antimicrobiana se evaluó por el método de Mitscher, utilizando concentraciones de 100, 1000, 10.000µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de *Tagetes minuta* L., únicamente a la concentración de 10.000µg/mL fue parcialmente activo frente a *Staphylococcus aureus*, al igual que el subextracto etéreo que mostró actividad frente a este microorganismo; frente a *Escherichia coli* ningún extracto mostró actividad. En cuanto al análisis de los componentes químicos encontraron metabolitos como flavonoides y taninos. Concluyendo que el extracto etanólico y subextracto etéreo presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, debido a sus metabolitos que tiene.⁽⁸⁾

3.2 Bases Teóricas

3.2.1 Medicina tradicional y natural

Es el conjunto de todos los conocimientos teóricos y prácticos basados exclusivamente en el empleo de los recursos vegetales para la alimentación del hombre y la curación de diferentes enfermedades, basados en la experiencia, la observación y transmitidos verbalmente o por escrito de una generación a otra, con fuertes raíces, culturales y espirituales.^(9,10)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional y natural forma parte esencial de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos el único medio para resolver las principales necesidades de salud en la sociedad. A pesar de los grandes esfuerzos en la investigación de las plantas medicinales

desde un punto de vista, farmacológico, fitoquímico y clínico, gran parte de ella permanece desconocida debido a múltiples factores, entre ellos la falta de recursos económicos, escasa información difundida sobre las especies estudiadas, y las diversas barreras geográficas que posee el Perú lo cual dificulta su recolección.⁽⁹⁾

3.2.1.1 Fitomedicina y Fitoterapia

Fitomedicina se define como aquella disciplina que emplea las plantas medicinales desde un contexto científico, es decir, donde la droga vegetal ha sido analizada bajo criterios de investigación inherentes a las diferentes fases de la metodología científica, fases preclínicas, clínicas, ensayos farmacológicos, toxicológicos, mutagénicos, etc. Asimismo su empleo deja tácito el conocimiento de su mecanismo de acción, receptores, interacciones medicamentosas, efectos adversos y contraindicaciones.^(10,11)

Fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar, o curar un estado patológico, a su vez interviene para mejorar la salud mediante el empleo de recursos vegetales con propiedades medicinales y sus derivados⁽¹¹⁾.

Los medicamentos fitoterápicos están constituidos por principios activos del recurso vegetal mediante formulación farmacéutica para su administración. La utilización de Fitoterapia con sustento científico, exige acciones multisectoriales que involucren desde la producción primaria hasta establecer los procesos de control de calidad de las materias primas.^(10,11)

3.2.1.2 Fitofármacos y Fitomedicamentos

Fitofármacos son productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa o para fines de diagnóstico. Se caracterizan por el conocimiento de su eficacia tanto por sus riesgos de uso así como para la producción y la constancia de su calidad.⁽¹²⁾

Fitomedicamento es un extracto vegetal estandarizado, normalizado y estabilizado del que se conoce una acción farmacológica definida y cuantificada, fabricada con tecnología farmacéutica moderna, basada en resultados obtenidos de estudios clínicos diseñados y desarrollados de acuerdo con criterios internacionales. Los fitomedicamentos se producen en variadas formas tales como, tabletas, grageas, comprimidos, cápsulas, gotas entre otros.⁽¹³⁾

3.2.2 Género *Tagetes*

El género *Tagetes* comprende aproximadamente 55 especies ampliamente distribuidas en el territorio nacional, considerado como el centro de origen y diversidad del género varios de ellos se emplean como recursos terapéuticos herbolarios o como recursos vegetales ceremoniales, entre otros.⁽¹⁴⁾

Las especies *Tagetes elliptica* Smith, *Tagetes filifolia*, *Tagetes minuta*, *Tagetes patula*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida*, *Tagetes terniflora*, son las más destacables debido a sus usos como alimento, condimento, extracción de pigmentos, y uso en la medicina tradicional.^(13,15)

3.2.2.1 *Tagetes minuta* L. (huacatay)

❖ Taxonomía

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Sub familia	:	Asteroideae
Género	:	<i>Tagetes</i>
Especie	:	<i>Tagetes minuta</i> L. ^(15,16)

Sinonimia científica: *Tagetes bonariensis* pers, *Tagetes glandulifera* schr, *Tagetes glandulosa* link, *Tagetes poropbyllum* vell.⁽¹⁵⁾

Nombres comunes:

Huacatay, guacatay, chilche, chinchilla, suico, wacatay.
^(15,16)

❖ Descripción botánica

Es una hierba anual, erecta, de 50-180 cm de altura, glabra, ramosa con hojas distribuidas hasta la inflorescencia.⁽¹⁴⁾ Los tallos son erectos, robustos, con hojas abundantes hasta el ápice, las inferiores opuestas mientras que las superiores son alternas, pinnatisectas. Tiene hojas opuestas de contorno elíptico, profundamente pinatisectas, con 4 - 8 pares de segmentos lanceoladas, agudos, serrados en el margen, con glándulas alíferas elípticas, con aceites esenciales aromáticos.^(15,17)

Las flores, amarillas se disponen en cimas corimbiformes compactas conteniendo bolsas oleíferas, escotadas o triboladas en el ápice. El nectario es de tipo estilar.

Inflorescencia compuesta formada por capítulos subsésiles, angostos y agrupados en corimbos terminales densos. Cada capítulo tiene 4 a 8 flores. Se propaga muy bien por semilla. ^(15,16)

❖ **Distribución geográfica**

La distribución altitudinal es de 0- 3200 metros sobre el nivel del mar. Es originaria de Sudamérica (Argentina, Chile, Bolivia, Perú y Paraguay). Fue introducida en Australia, África y Asia en 1993, y en Estados Unidos en 2006. Las características climáticas son clima cálido templado y hasta fríos. Temperatura es de 8-28°C. Precipitación (mm) de 50-2000. Humedad atmosférica 60-95% .⁽¹⁵⁾

❖ **Condiciones de cultivo**

Es cultivada en la Costa, Sierra y en la Amazonía del Perú, en los suelos arcillosos, requiere de suelos bien preparados, de profundidad baja (de 20-30 cm.) y mezclada con buena cantidad de abonos por lo menos 1kg de compost, humus de lombriz y entre otros.^(15,18)

Las mejores condiciones ambientales para su crecimiento se desarrollan en climas cálidos (primavera y verano), sin embargo, en la costa, pisos bajos de la sierra y valles altos de la selva peruana, se puede cultivar durante todo el año sin ningún problema. La época de floración es entre Abril y Junio y la de fructificación de Junio a Setiembre; su forma de propagación es mediante las semillas.⁽¹⁸⁾

Requiere de abundante cantidad de agua durante todo su cultivo, en especial durante el crecimiento y desarrollo de

tallos y hojas, debido a la escasez de este elemento puede producir una reducción del tamaño y sabor amargo en las hojas. Es una especie rústica que se puede adaptar a diversas condiciones de cultivo, pues crece como mala hierba en parques, jardines y bordes de carreteras.^(16,18)

❖ Cosecha

La cosecha se realiza al mes y medio desde la siembra en climas cálidos, aunque en invierno puede demorar hasta dos semanas más; luego de la primera cosecha las siguientes se realizarán cada mes aproximadamente, duplicando e incluso triplicando el rendimiento de los tallos. La cosecha se realiza manualmente cortando los tallos con una tijera de podar o con un cuchillo con dientes (aserrado) a una altura de 10 cm de la base con cuidado de no dañar los tallos.^(15,18)

Los tallos cosechados se agrupan en cantidades de 4 - 6 según su tamaño y se amarran en atados que posteriormente son comercializados o consumidos. Las partes comestibles del recurso vegetal son las hojas las cuales se utilizan como aromatizante para las comidas.⁽¹⁸⁾

❖ Composición química

Los componentes más abundantes en el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. son la dihidrotagetona (monoterpeno cetona acíclica insaturada), el ocimeno (hidrocarburo monoterpénico acíclico insaturado), la tagetona (monoterpeno cetona acíclica insaturada), flavonoides taninos, alcaloides y limoneno (hidrocarburo monoterpénico monocíclico insaturado).^(13,16,17)

Ocimeno: Son monoterpenos que se encuentran dentro de una variedad de recursos vegetales, frutas. Posee actividad antifúngica.⁽¹⁵⁾

Flavonoides: Tienen actividad antioxidante eliminadora de radicales libres, antiinflamatorios, antibacterianas, antivirales, antiulcerosa, antiespasmódico, anticoagulante y protector frente a enfermedades cardiovasculares.⁽¹⁹⁾

Limoneno: Tiene efectos anticancerígenos. Incrementa los niveles de enzimas hepáticas implicadas en la detoxificación de carcinógenos.^(15,20)

Taninos: Astringentes por lo tanto antidiarreicos y vasoconstrictores, ya que se unen y precipitan las proteínas existentes en las secreciones. Presentan actividad cicatrizante, antioxidante, antiinflamatorio.^(19,20)

Alcaloides: Ejercen una función estimulante del sistema nervioso central, efectos sobre los vasos circulatorios por lo que se trata para la hipertensión. Se les atribuye también efectos antitrombóticos, antiinflamatorios y vasodilatadores.^(20,21)

Dihidrotagetona: Es un compuesto con dos centros quirales, monoterpeno acíclica bifuncional aislada de especies del recurso vegetal del género *Tagetes* en 5-isobutil-3-metil-4, 5-dihidro-2(3H)-furanona. Presentan actividad antimicrobiana ^(16,19)

❖ **Propiedades medicinales**

Es un excelente digestivo, carminativo, vermífuga para tratamiento sintomático de trastornos digestivos

dispépticos, gastritis, flatulencias, indigestión, náuseas y antiparasitario, y también tiene actividad antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, antiespasmódica, y antioxidante.^(13,15,16)

La infusión de sus hojas se usa para aliviar los dolores gástricos, la decocción de sus flores y hojas frescas para aliviar los catarros y bronquitis. Las flores se utilizan para ataques epilépticos, fiebre, laxante, dismenorrea, varices, hemorroides, conjuntivitis y resfrio común. En China las flores se utilizan para la tos ferina, paperas, y para mastitis, a su vez en la India se usa en perfumería.^(15,17)

Otros usos : Se usa en la Gastronomía Peruana como condimento en la preparación de ajíes, guisos y asados. Es un ingrediente indispensable en la preparación de la ocopa, una salsa de ají, cebolla, ajos y maní típica de la región de Arquipa, a servirse sobre papas cocidas.⁽¹⁷⁾

Asimismo *Tagetes minuta* L. es una hierba aromática indispensable para la pachamanca y uno de los componentes del aderezo del pollo a la brasa, donde cada establecimiento hace su propia variación, muchas veces guardada como secreto profesional y también tiene propiedades insecticidas y acaricidas estudios revelan su eficacia para eliminar las larvas de *Aedes aegypti*, el mosquito vector del dengue y la fiebre amarilla, y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*).^(16,17)

3.2.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales desde la antigüedad son productos apreciados por sus propiedades medicinales, en las últimas

décadas se han experimentado un notable incremento e interés por sus aplicaciones terapéuticas y industriales. Ya que estos se encuentran en numerosas recursos vegetales y pueden extraerse de distintas partes de ellas. ^(19,20,21)

Son productos volátiles de naturaleza compleja, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, o por expresión del pericarpio de ciertos frutos los que contienen las sustancias responsables del aroma de estos recursos.⁽¹⁹⁾

Los aceites esenciales tienen un rendimiento muy bajo, de hecho para obtener unos gramos de esencia, se necesita gran cantidad del recurso vegetal. En algunos casos la concentración supera el 1 % del peso del vegetal seco. La mayoría de las plantas medicinales contienen de 0,01 a 10% de contenido de aceite esencial, y las especies aromáticas alrededor de 0.1 a 2%, excepto el clavo (botón floral de *Eugenia caryophyllus*) con un contenido superior al 15%.^(21,22)

3.2.3.1 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales

Los distintos componentes obtenidos de los aceites esenciales muestran actividad frente a bacterias patógenas variadas e incluso frente a diferentes hongos y levaduras, presentando en conjunto un amplio espectro de actuación.^(20,21)

En general, los aceites esenciales son más activos frente a bacterias Gram positivas, probablemente debido a que las Gram negativas poseen una membrana externa en sus paredes celulares, de tipo lipofílica, que podría interaccionar con ellos. Sin embargo, el carvacrol, eugenol y el timol, son capaces de desintegrar la membrana externa de las Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.⁽²³⁾

Destacan por su actividad antimicrobiana los derivados terpénicos oxidados, representados en primer lugar 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 de la bacteria. Los derivados alcohólicos y cetónicos, tales como linalol, geraniol, citral, alcanfor y otros, poseen igualmente propiedades antibacterianas, si bien menos marcadas que las de timol y carvacrol. ⁽²¹⁾

3.2.3.2 Distribución en la naturaleza

Los aceites esenciales se encuentran distribuidos en aproximadamente 60 familias de recursos vegetales, entre las que destacan Asteráceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Magnoliáceas, Mirtáceas entre otras. ^(20,21,24)

Si bien las hojas y las flores de las especies aromáticas son los órganos que preferentemente presentan una mayor riqueza en aceites esenciales, estos pueden encontrarse almacenados en cualquiera órgano, tal como raíces, rizomas, cortezas, leños, frutos y semillas. ⁽²⁰⁾

Los aceites esenciales suelen ubicarse en formaciones secretoras especializadas tales como pelos glandulosos (Lamiáceas), canales secretores (Asteráceas), canales lisígenos o esquizógenos (Rutáceas). ^(19,20,21)

3.2.3.3 Propiedades fisicoquímicas

Pese a las diferencias de composición entre los distintos aceites esenciales, se afirma que presentan una serie de

propiedades físicas comunes, son líquidos a temperatura ambiente, son menos densos que el agua y insolubles. Se disuelven en disolventes orgánicos apolares (hexano, alcohol, éter etílico) y tiene un índice de refracción elevado y la mayoría fotosensibles. Generan diferentes aromas agradables y son volátiles y también poseen un color en la gama del amarillo hasta ser transparentes en algunos casos y presentan distintos sabores.^(20,21)

3.2.3.4 Composición química

Los aceites esenciales son mezclas complejas cuyos componentes corresponden mayoritariamente a dos grupos:

Derivados terpénicos (mono y sesquiterpenos), en la cual se encuentran la mayor parte de los aceites esenciales, las cuales pueden pertenecer a algún de los siguientes grupos, hidrocarburos monoterpénicos (aciclicos, monociclicos y biciclicos), derivados oxigenados de los mismos (alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres ésteres, Oxidos, peróxidos, fenoles) y hidrocarburos sesquiterpénicos pertenecientes a distintos tipos estructurales (aciclicos, monociclicos, biciclicos, y otros) y sus derivados oxidados.^(19,20,21)

Derivados aromáticos fenilpropanos (C6-C3) son mucho menos frecuentes que los terpenoides. Dentro de los derivados fenilpropánicos, predominan los alil y pronilfenoles, entre los que destacan el anetol, eugenol, y la asarona características de determinados aceites esenciales tales como lo de anís, clavo, y calamo aromático.^(19,20,21)

3.2.3.5 Aplicaciones de los aceites esenciales

Los aceites tienen un amplio rango de aplicación, por ser empleados como materia prima en diferentes tipos de industrias como farmacéutica, cosmética y alimentaria.⁽²¹⁾

En la industria farmacéutica se emplean con el fin de mejorar las cualidades organolépticas de distintas formas galénicas, como aromatizantes y/o saborizantes. Y también se utiliza en la elaboración de los perfumes y productos cosméticos como desodorantes, lociones, jabones líquidos y pastas dentífricas.^(19,20)

Así mismo en la industria alimentaria se emplean como aditivos para mejorar el olor y el sabor en una gran variedad de productos alimenticios, tales como distintos tipos de bebidas, confitería, panadería, conservas, preparados vegetales, productos lácteos y cárnicos.^(20,21)

3.2.3.6 Toxicidad de los aceites esenciales

En lo referente a la toxicidad crónica de los aceites esenciales, han sido valorados experimentalmente los efectos cancerígenos presentados por algunos de sus componentes, determinados derivados del fenilpropano tales como asarona, safrol y estragol, se metabolizan sufriendo un proceso de hidroxilación, siendo los 1-hidroxiderivados los metabolitos responsables de los efectos cancerígenos, por formación de enlaces cruzados en la molécula de ADN.^(19,20,21)

La toxicidad aguda de los aceites esenciales se manifiesta fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central, sistemas respiratorio y cardiovascular. Ciertos aceites esenciales a dosis elevadas, son capaces de originar una

depresión generalizada del sistema nervioso central, pudiendo incluso ocasionar la muerte. Entre ellos tenemos el aceite de eucalipto, nuez moscada, canela y clavo. (19,21)

Algunos componentes de los aceites esenciales son susceptibles de atravesar la barrera placentaria y originar efectos tóxicos en el feto, tal como ocurre con el acetato de sabinilo que proviene de la salvia española. Otros aceites esenciales son considerados abortivos, destacando los de ruda, menta poleo, enebro entre otros.(20,21)

3.2.3.7 Método para la obtención del aceite esencial

Los métodos más frecuentemente utilizados para la obtención de los aceites esenciales son: Destilación con vapor de agua y extracción con fluidos supercríticos.

❖ Destilación con arrastre de vapor

Es el proceso más común para extraer aceites esenciales de las hojas y tallos, más no es aplicable a flores. En esta técnica se aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite. La extracción se efectúa cuando el vapor de agua entra en contacto con el material vegetal y libera la esencia, para luego ser condensada.(21) 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. (25,26,27)

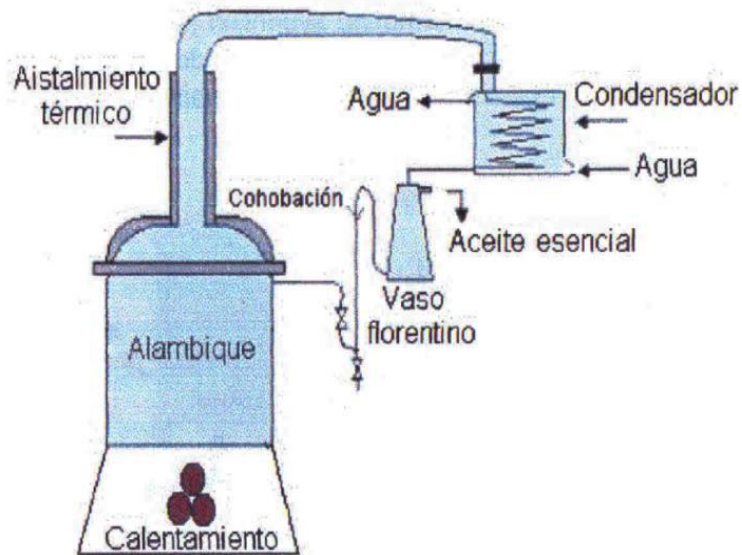


Figura Nº 1: Extracción con arrastre de vapor

Fuente: http://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/

Ventajas

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 .^(21,26)

Desventaja

Pueden ocurrir procesos colaterales como polimerización y resinificación de los terpenos; así como hidrólisis de esteres y destrucción térmica de algunos componentes.⁽²⁵⁾

❖ Extracción por fluidos supercríticos

Este método de extracción es reciente, donde el material vegetal es molido y colocado en el extractor y luego se hace circular a través de la muestra un fluido en estado

supercrítico (CO₂), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene una esencia pura. (20,26,28)

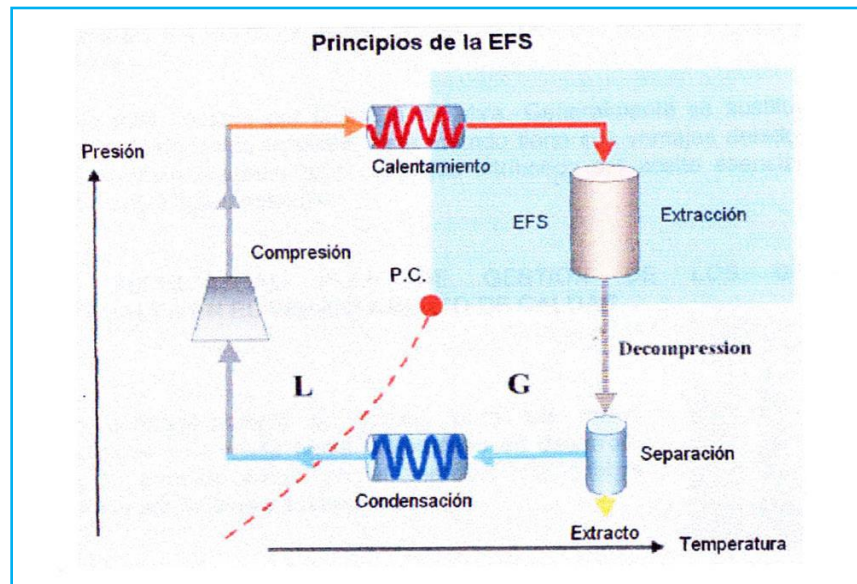


Figura Nº 2: Extracción por fluido supercrítico

Fuente: http://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/pdf/aceites%20esenciales%20extraidos%20de%20plantas%20medicinales%20y%20aromaticas.pdf

Ventajas

Alto rendimiento, ecológicamente el solvente se elimina fácilmente y se puede reutilizar.

Se utiliza para extracciones químicas a bajas temperaturas.

Reduce los requerimientos de energía de la destilación.

No se modifican los componentes de la esencia. (26,28,29)

Desventajas

Ácidos grasos, pigmentos y ceras también pueden ser extraídos junto con el aceite esencial.

El equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción que también sean resistentes a las altas presiones.⁽²⁸⁾

3.2.4 Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares, pertenecientes al reino procariota, son capaces de reproducirse mediante fisión binaria. La mayoría es de vida libre; a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como Chlamydias y Rickettsias. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento.^(30,31)

Las células bacterianas tienen una gran variedad de formas y tamaños. Por lo general, tienen 0,2 a 2 μm de diámetro y 1 a 6 μm de largo y existen cuatro formas básicas para las bacterias, células esféricas o cocos con forma de bastón de los bacilos, espiral o espirilos y célula con forma de coma llamadas vibriones. Muchos de ellos se movían mediante apéndices denominadas flagelos.^(31,32)

La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. El más usado en el laboratorio es el microscopio óptico de campo claro, pero existen otros como el microscopio óptico de campo oscuro en los que los organismos aparecen brillantes en fondo oscuro. Este microscopio permite la visualización de bacterias difíciles de colorear como el *Treponema pallidum*, agente de la sífilis.^(32,33)

Para la nutrición, la mayoría de las bacterias utilizan sustancias químicas orgánicas que pueden provenir de organismos vivos u

mueritos. Algunas de ellas producen sus propios alimentos mediante la fotosíntesis y algunas pueden nutrirse a partir de sustancias inorgánicas.⁽³⁰⁾

Las bacterias presentan una pared celular que es una estructura compleja, semirrígida y brinda una rigidez estructural, confiere la forma a la célula y crea una barrera física contra medio externo de las sustancias tóxicas químicas y biológicas presentes. Así su presencia de pared protege a la bacteria de la diferencia de presión osmótica entre el medio interno de la bacteria y el medio externo, de no existir la pared, la bacteria estallaría.^(30,34,35)

Los peptidoglicanos se encuentran en todas las especies de bacterias excepto en los ureplasma y micoplasmas, ya que carecen de pared. Está compuesto por un esqueleto de residuos de carbohidratos formados de unidades alternativas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces β -1,4.^(31,35)

Las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares, permite distinguir a las bacterias en Gram positivas o Gram negativas mediante la tinción de Gram, esta técnica se basa en las diferencias físicas fundamentales de la pared celular y emplea colorantes catiónicos (cristal violeta y safranina), que se combinan con elementos cargados negativamente.⁽³⁵⁾

3.2.4.1 Clasificación de las bacterias

a) Bacterias gram positivas

La gruesa pared celular de las bacterias grampositivas, consiste de varias capas de peptidoglucano (formado por los azúcares N-acetilglucosamina más N-acetilmurámico y un tetrapéptido) , es la determinante de que estas bacterias retengan el cristal violeta de la coloración de Gram teñiendo un color violeta. Sin embargo, estas células contienen también una gran cantidad de ácido teicoico, polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de la membrana plasmática. ^(30,35)

Además los ácidos teicoicos, tienen un rol en la virulencia de estos microorganismos, porque actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos en las células del huésped. La superficie externa del peptidoglucano de las bacterias grampositivas está generalmente cubierta de proteínas. Los diferentes grupos de bacterias grampositivas y las diferentes especies difieren en la composición de sus proteínas y de ácidos teicoicos; ésto es útil para la clasificación serológica y la identificación bacteriana. ^(33,35)

El peptidoglucano es un elemento clave para la replicación y la supervivencia de la célula en las condiciones normalmente hostiles en las que proliferan las bacterias. La célula gram positiva puede poseer también otros componentes, la proteína M de los estreptococos y proteína R de los estafilococos se asocian al peptidoglucano. ⁽³³⁾

Los ácidos teicoicos son polímeros de unidades de ribitol (5 carbonos) o de glicerol (3 carbonos) unidos por enlaces fosfodíester. Los ácidos ribitol teicoicos están asociados con la pared celular, mientras que los ácidos glicerol se encuentran asociados con la cara interior de la membrana de la célula bacteriana.^(33,35)

Los ácidos teicoicos estabilizan la pared celular, mantienen la asociación de la pared con la membrana celular, quelan pequeñas iones necesarios para el funcionamiento y la integridad y participan en la interacción celular y la adherencia a mucosas u otras superficies.⁽³¹⁾

Los ácidos lipoteicoicos poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplasmática. Estas moléculas son antígenos de superficie frecuentes que diferencian los serotipos bacterianos y favorecen la fijación a otras bacterias y a receptores específicos localizados en la superficie de las células de los mamíferos (adherencia).^(30,36)

b) Bacterias gramnegativas

Las paredes celulares gramnegativas son más complejas que de las grampositivas. Desde punto de vista estructural, presenta dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmica, se encuentra una capa delgada de peptidoglucano que representa tan solo entre un 5% y un 10% del peso de la pared celular. Además, la pared celular gram negativa no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos.^(30,34)

En la parte externa de la capa de peptidoglucanos se halla una membrana externa, la cual es exclusiva de bacterias gram negativas el espacio periplásmico. Este espacio es un compartimento que contiene diversas enzimas hidrolíticas importantes para la degradación y metabolización por la células de las macromoléculas de gram tamaño. En caso de especie bacterianas negativas patógenas, muchos de los factores de virulencia líticos (colagenasas, hialuronidasas, proteasasy b-lactamasas) se encuentran en este espacio.^(32,35)

La membrana citoplasmática, esta rodeada por el citoplasma de la célula y contiene proteínas y fosfolípidos sirve como una barrera de permeabilidad selectiva para las sustancias que entran o salen, también se considera el sitio donde se produce la energía de la célula. ⁽³⁶⁾

El peptidoglicano, es un polímero relativamente delgado que consiste de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina entrelazados; esta se conoce con frecuencia como la capa de mureína o pared celular, y es responsable de mantener la forma del organismo, y está localizada dentro del espacio periplásmico.^(32,37)

Los lipopolisacáridos son moléculas grandes y complejas contienen tanto los lípidos como hidratos de carbono, y están formados por tres partes lípido A, polisacárido central y cadena lateral. También sirve como una barrera de permeabilidad de la célula, ya que ayuda a retener proteínas en el espacio periplasmático.^(35,36)

Los polisacáridos; localizados en la superficie de la célula, son los componentes esenciales de las endotoxinas (estos

contribuyen a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad), y son la causa de la carga neta de las bacterias Gram negativas.^(34,36)

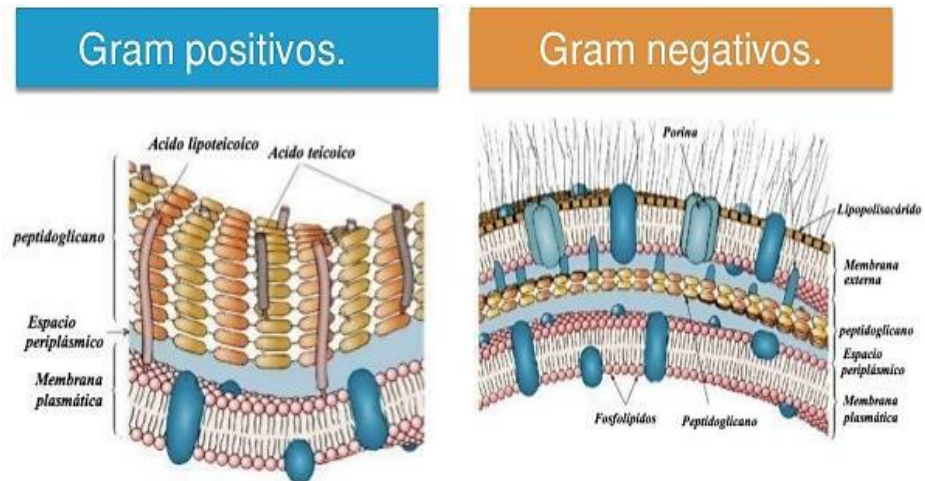


Figura N° 3 Diferencia estructural entre bacterias gram positivas y gram negativas.

Fuente: <https://www.google.com.pe/search?q=diferencia+de+bacterias+gram+negativas+y+positivas>.

3.2.4.2 *Staphylococcus aureus*

❖ Taxonomía

- Reino : Bacteria
- Filo : Firmicutes
- Clase : Bacilli
- Orden : Bacillales
- Familia : Staphylococcaceae
- Género : *Staphylococcus*
- Especie : *Staphylococcus aureus*.^(33,35)

❖ Generalidades

En la actualidad, se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Dicho género tiene una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos.⁽³⁶⁾ *Staphylococcus aureus*, se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio e intoxicaciones ocasionadas por alimentos.⁽³¹⁾ Son Gram-positivas, no móvil, no formadoras de esporas, cuyo diámetro oscila entre 0.5-1.5 μ , crece en condiciones de presión osmótica elevada y humedad reducida a temperatura de $\pm 35^{\circ}\text{C}$, se caracterizan porque forman agrupaciones que se asemejan a racimos de uva. ^(36,38)

Su estructura está compuesta por peptidoglucano, ácidos teicoicos, catalasa, proteína A, coagulasa. Se desarrolla rápidamente en todos los medios, fermentan lentamente en carbohidratos, como el manitol, pero no produce gas. La actividad proteolítica varía mucho de una cepa a otra. *Staphylococcus aureus* produce pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso y tienen un metabolismo anaerobio facultativo. ^(38,39)

❖ Patogenicidad

Staphylococcus aureus es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones cuando las defensas del huésped disminuyen pueden causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos.^(35,38)

La capacidad patógena de una cepa determinada de *Staphylococcus aureus* es el efecto combinado de los factores y las toxinas extracelulares simultáneamente con las propiedades invasoras de la cepa. En un extremo del espectro de la enfermedad está el envenenamiento de los alimentos producido por *Staphylococcus*, y se puede atribuir solamente a la ingestión de la enterotoxina preformada; en el otro extremo están bacteriemia estafilocócica y abscesos diseminados por todos los órganos.^(38,40)

❖ Epidemiología

Se ha reportado que 25 a 35% de personas sanas tienen *Staphylococcus aureus* en su piel y mucosas esto significa que cerca de dos mil millones de individuos podrían tener esta bacteria, la cual se puede propagar de persona a persona por contacto directo, a través de objetos contaminados.⁽⁴⁰⁾ La frecuencia de colonización es mayor entre los diabéticos insulino dependientes, personas infectadas con el VIH, los usuarios de drogas inyectables, los pacientes sometidos a hemodiálisis y los individuos con lesiones cutáneas.^(39,41) En los hospitales, las zonas de mayor riesgo para las infecciones graves por *Staphylococcus aureus* son las salas de recién nacidos, las unidades de cuidados intensivos, los quirófanos y las salas de quimioterapia para cáncer. El personal con lesiones activas por este microorganismo y los portadores tienen que excluirse de estas áreas.⁽³⁶⁾

Las manifestaciones de algunas enfermedades estafilocócicas se deben casi exclusivamente a la actividad de la toxina como por ejemplo el síndrome de la piel escaldada, intoxicación alimentaria y el síndrome del shock

tóxico, mientras que otras afecciones son consecuencia de la proliferación de los microorganismos, la cual da lugar a la formación de los abscesos y la destrucción tisular como las infecciones cutáneas, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis y artritis séptica.^(34,42,43)

3.2.4.3 *Escherichia coli*

❖ Taxonomía

Reino : Bacteria
Filo : Proteobacteria
Clase : Gamma proteobacteria
Orden : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Género : *Escherichia*
Especie : *Escherichia coli*.^(33,35)

❖ Generalidades

Escherichia coli es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal. Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, no forma esporas, se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es capaz de crecer a temperatura preferentemente de 37°C.^(32,34)

Las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Cada uno de estos grupos presentan características.^(34,43,44)

❖ Clasificación

a) *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Es la causa mas frecuente de diarrea acuosa en lactantes desnutridos y principal causa de diarrea del viajero con vómitos, espasmos abdominales, náuseas y fiebre de los países en vías de desarrollo. Esta infección se adquiere al ingerir alimentos o agua contaminados con heces.^(33,34)

Esta bacteria se caracteriza por la producción de enterotoxinas, las cuales inducen la secreción de agua y electrolitos dentro del lumen intestinal, de manera similar a *Vibrio cholerae*. Las enterotoxinas son del tipo termo lábil (LT) y termoestable (ST), y colonizan a nivel del intestino delgado mediante adhesinas fimbriales; por lo que esta bacteria no es invasiva.⁽³⁴⁾

b) *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Este microorganismo causa la disentería bacilar, por el consumo de agua o alimentos contaminados con heces, en los niños en países en vías de desarrollo y personas que viajan a estos lugares, con una duración de más de 14 días, con un cuadro similar al provocado por *Shigella*, la cual comparte genes de virulencia con *Escherichia coli* ECEI puede invadir y proliferar en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Clínicamente se caracteriza por la presencia de sangre y mucosidad en las heces, acompañado de calambres abdominales, vómito, fiebre y malestar general en los pacientes infectados.^(34,42)

c) *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Es una causa importante de diarrea en los lactantes especialmente en países en desarrollo. EPEC se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado. Factores mediados mediante cromosoma producen una adherencia estrecha. Hay pérdida de microvellosidades, lo que da malabsorción y diarrea acuosa no sanguinolenta con fiebre, náuseas y vómitos.^(42,44)

d) *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Causa diarrea por la ingesta de carne molida mal cocida con heces de bovino. Mediada por las toxinas que interrumpen la síntesis de proteínas, lesiones con la destrucción de la microvellosidad intestinal que da lugar a una disminución de la absorción.^(34,44)

Las características clínicas de este grupo incluyen náuseas, dolor abdominal, diarreas, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica. De los serotipos de *E. coli* que producen verotoxina, es O157:H7 la más común y el que se puede identificar en muestras clínicas.^(34,45)

e) *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Causa diarrea aguda y crónica infantil en los países subdesarrollados. Esta bacteria no secreta enterotoxinas y se caracteriza por la adherencia agregativa de los células intestinales por los bacilos mediada por un plásmido con acortamiento de las microvellosidades, infiltración mononuclear y hemorrágica; disminución de absorción de líquidos con una respuesta inflamatoria,

produciendo una estimulación de la secreción mucosa manifestada por diarrea acuosa con moco y fiebre. (33,34,42)

f) *Escherichia coli* adherente-difusa (DAEC)

Estudios recientes involucran a esta cepa como el agente causal de diarreas acuosas en niños entre 1 a 5 años de edad. Donde se adhieren a las células epiteliales en un patrón difuso y transportan un gen que codifica las fimbrias de superficie designados F1845. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. Este grupo se caracteriza clínicamente por la presencia de diarrea acuosa sin sangre o leucocitos fecales. (34,42)

❖ Patogenicidad

Existen muchas cepas de *Escherichia coli* que se pueden encontrar en patología humana, ya que son agentes responsables de gastroenteritis infantil, especialmente en países en vías de desarrollo, causando la muerte de cerca de un millón de niños cada año debido a deshidratación y a otras complicaciones. (44,46)

Presentan los factores de virulencia especializados. Estas dos categorías generales son:

Las adhesivas: Los pili o fimbrias son factores importantes en la virulencia de *Escherichia coli* por que permiten adherirse a las mucosas. Mas de 80% de las cepas de este microorganismo ocasionan pielonefritis, presenta fimbrias que se enlazan con los glucolípidos que contiene unidades de disacárido galactosa.(45)

Endotoxinas y exotoxinas: *E. coli* presenta una endotoxina ligada al lipopolisacárido, en especial al lípido A, responsable de la acción pirógena y probablemente de las alteraciones vasculares que se producen en las infecciones generalizadas. Algunas cepas pueden producir exotoxinas responsables de la producción de diarreas, cuya síntesis está codificada por la presencia de plásmidos que a su vez pueden contener genes asociados con la capacidad de adherencia y otras propiedades como la resistencia a los antibióticos. Se conoce la existencia de una enterotoxina termolábil, que actúa activando la adenilciclase, la cual a su vez transforma el ATP en AMP cíclico produciendo un aumento de la secreción de agua y electrolitos. También puede presentar una toxina termoestable de bajo peso molecular y no antigénica, que también produce acumulación de líquidos en el intestino por un mecanismo distinto y poco conocido, probablemente por la vía de la guanilciclase.^(42,45,46)

❖ Epidemiología

En el tubo digestivo existen grandes cantidades de *Escherichia coli*. Esta bacteria puede comportarse como patógenos oportunistas cuando los intestinos se perforan y las bacterias acceden a la cavidad peritoneal, la mayor parte de *Escherichia coli* que causan enfermedades digestiva y extraintestinal lo hacen porque han adquirido factores de virulencia específicos codificados en plásmidos o en ADN de bacteriófagos. Los bacilos gram negativos que con más frecuencia se aíslan de pacientes con sepsis, son responsables de más del 80% de las infecciones de tracto urinario adquiridas en la comunidad y del mismo número de las infecciones hospitalarias, y una causa destacada de

gastroentiritis en los países en desarrollo. La mayoría de las infecciones (con la excepción de la meningitis neonatal y de la gastroentiritis) son endógenas, es decir que *Escherichia coli* que forma parte de la flora bacteriana normal del paciente es capaz de producir infecciones cuando sus defensas se alteran a través de un traumatismo o supresión de la inmunidad.^(35,44,45)

3.2.5 Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial

La evaluación antimicrobiana de los aceites esenciales resulta laborioso, debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y a su complejidad. Estas características pueden reducir la capacidad de dilución y distribución en el medio a ensayar, por lo tanto, se debe añadir un agente solubilizante o disgregante.

Los métodos más empleados son: Difusión en agar (pozo o disco de papel) que permita obtener datos cualitativos y el método de dilución (agar o caldo de cultivo) que permite obtener datos cuantitativos.^(30,34,44)

3.2.5.1 Método de difusión en agar (Kirby Bauer)

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa). El antibiograma por difusión en disco basado en el trabajo de Kirby Bauer y colaboradores, es uno de los métodos que el National Commitee for Clinical

Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.^(47,48)

Es un método para evaluar la actividad antimicrobiana, consiste en inocular al microorganismo sobre la superficie de una placa Petri conteniendo agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco.^(47,49)

Ventajas

Es un método sencillo, barato y de fácil control y estandarización.

Se pueden realizar algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo el antibiograma con microorganismos exigentes o muy exigentes que necesitan más nutrientes que los que este medio les puede ofrecer.^(48,50)

3.2.5.2 Métodos de dilución

Se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).^(49,50)

En la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo,

fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados. Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos.^(48,50)

Ventajas

Manejo sencillo, menor consumo de recursos humanos, alta reproducibilidad, análisis de resultados mediante sistemas expertos y su rapidez.

Tienen una lectura automatizada y los resultados se dan en 4 horas.^(43,50)

Desventajas

Alto costo, sólo garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y sin requerimientos especiales.^(50,51)

3.3. Definición de Términos Básicos

- ❖ **Etnobotánica:** Disciplina que estudia las relaciones entre el hombre y las plantas.
- ❖ **Carminativo:** Sustancia que facilita la evacuación de los gases intestinales y calma el dolor producido por éstos.
- ❖ **Inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferido a un medio de cultivo.
- ❖ **Metabolito:** Son compuestos, generalmente orgánicos, que participan en las reacciones químicas que tienen lugar a nivel celular.

- ❖ **Vermífuga:** Cuando tiene la propiedad de favorecer la expulsión de lombrices intestinales, que sobre todo afectan a los niños o durante la infancia.
- ❖ **Patogénesis:** Describe el origen y evolución de una enfermedad con todos los factores que están involucrados en ella.
- ❖ **Asteraceae:** Es una de las familias más numerosas del reino vegetal, con alrededor de 20.000 especies, entre las que se encuentran desde árboles, pasando por arbustos y subarbustos, hasta herbáceas, con una amplia distribución mundial.
- ❖ **Terpenos :** Son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. En las plantas los terpenos ejercen distintas funciones, las dos principales son la protección frente a los insectos y animales herbívoros y la protección contra las temperaturas elevadas.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Tipo y Nivel de la Investigación

4.1.1 Tipo de Investigación

- ❖ **Analítico:** Porque trata de demostrar la relación que existe entre las variables.
- ❖ **Prospectiva:** Porque recolecta los datos correspondientes a los hechos que ocurren después de iniciada la investigación.
- ❖ **Transversal:** Porque las variables serán medidas en una sola ocasión y luego analizadas.

4.1.2 Nivel de Investigación

- ❖ **Explicativo:** Porque varía la concentración del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay), realiza una

acción sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

4.2. Método y Diseño de la investigación:

4.2.1. Método de investigación

❖ **Deductivo**

Porque el estudio va de lo general a lo específico.

4.2.2 Diseño de investigación

- ❖ **Experimental:** Porque se manipulara la variable concentración del aceite esencial.

4.3. Población y Muestra de la investigación

4.3.1. Población

Las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) procedente de la provincia de Andahuaylas (Apurímac).

4.3.2. Muestra

Aceite esencial extraído de las hojas del *Tagetes minuta* L. (huacatay)

4.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

4.4.1. Técnicas

- ✓ La destilación por arrastre de vapor la cual se utilizo para la extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay).
- ✓ El Método de difusión en agar (Kirby Bauer) fue utilizado para determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

4.4.2 Instrumentos

Se realizó una ficha para poder realizar la recolección de los datos obtenidos en el presente estudio. (ver anexo N° 2)

4.5 Procedimiento de recolección de datos

❖ **Recolección de la muestra vegetal:** Se recolectó 10kg de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay) en la provincia de Andahuaylas (Apurímac). La muestra recolectada fue envuelta en papel kraft y embalada en cajas de cartón con sus respectivos rótulos.

❖ **Identificación taxonómica**

La muestra fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) para su identificación. (ver anexo 3)

❖ **Selección del recurso vegetal:**

Se seleccionó las hojas frescas y no dañadas, limpias de fragmentos oscuros o atacados por insectos; y luego fueron secadas a temperatura ambiente. Una vez secas se las conservó en bolsas de papel cerradas en un ambiente fresco y oscuro.

❖ **Extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay)**

Se realizó en el Laboratorio de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

10kg de hojas fueron sometidos a destilación por el método de arrastre de vapor de agua en equipo de destilación de acero inoxidable. El destilado se separó en un vaso florentino tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, y luego se deshidrató las impurezas de agua del aceite esencial con Na₂SO₄ anhidro, se filtró,

guardó en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4°C.

❖ **Método de difusión en agar (Kirby Bauer)**

Se realizó en el Laboratorio del Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

En el trabajo realizado se utilizó las cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Preparación del medio: El método fue descrito por Bauer y col, modificado. Se utilizó como medio de cultivo Mueller Hinton, aproximadamente 25ml de agar fueron vertidos sobre placas Petri dejando solidificar a temperatura ambiente.

Sembrado de cepa bacteriana : Los inóculos bacterianos utilizados fueron 1×10^8 UFC/ml, se colocaron 100 μ sobre el medio de cultivo con ayuda de una espátula y consiguió una dispersión homogénea del inóculo, se dejó reposar por 15 minutos.

Incubación: Las placas se incubaron 24 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en aerobiosis, transcurrido el tiempo se procedió a la observación y medición de las zonas de inhibición de crecimiento (diámetro), expresado en milímetros. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Lectura de los halos: Los valores obtenidos se promediaron hallándose el diámetro promedio que fue considerado para evaluar la actividad antimicrobiana.

CAPÍTULO V

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.1 Análisis de cuadros

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) se realizó por el método de difusión en agar para lo cual se utilizó discos impregnados con aceite, la medida de cada disco es de 6mm, por lo tanto las muestras que tienen esta medición no evidencian efecto antimicrobiano.

CUADRO Nº 1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 100% FRENTE A CEPAS ATCC

Microorganismos patógenos	Díámetro del halo promedio (mm)	Resultados
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	19.22 mm	Positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	27.29 mm	Positivo

FUENTE: Elaboración propia.

En el Cuadro Nº 1 se observa que el aceite esencial a la concentración de 100% frente a las bacterias en estudio presentó actividad antimicrobiana con un promedio de 19.22 mm de halo de inhibición para *Escherichia coli* ATCC 8739 y 27.29 mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

CUADRO N° 2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 75% FRENTE A CEPAS ATCC

Microorganismos patógenos	Díametro del halo promedio (mm)	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	17.14 mm	positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	24.82 mm	positivo

FUENTE: Elaboración propia.

En el Cuadro N° 2 se observa que el aceite esencial a la concentración de 75% frente a las bacterias en estudio presentó actividad antimicrobiana con un promedio de 17.14mm de halo de inhibición para *Escherichia coli* ATCC 8739 y 24.82mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

CUADRO N° 3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 50 % FRENTE A CEPAS ATCC.

Microorganismos patógenos	Díametro del halo promedio (mm)	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	16.49 mm	Positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	22.18 mm	Positivo

FUENTE: Elaboración propia.

En el Cuadro N° 3 se observa que el aceite esencial a la concentración de 50% frente a las bacterias en estudio presentó actividad antimicrobiana con un promedio de 16.49 mm de halo de inhibición para *Escherichia coli* ATCC 8739 y 22.18mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

CUADRO N° 4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 25 % FRENTE A CEPAS ATCC

Microorganismos patógenos	Díametro del halo promedio (mm)	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	12.44mm	Positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	14.73mm	Positivo

FUENTE: Elaboración propia.

En el Cuadro N° 4 se observa que el aceite esencial a la concentración de 25 % frente a las bacterias en estudio presentó actividad antimicrobiana con un promedio de 12.44mm de halo de inhibición para *Escherichia coli* ATCC 8739 y 14.73mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

5.2 Discusión de los resultados

Según la bibliografía consultada respecto a los estudios realizados para determinar la actividad antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a cepas patógenas, existen pocas referencias en nuestro país con la misma especie vegetal, por lo cual se consideró datos de otra especie pero del mismo género.

En la presente investigación el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) en las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% mostraron similar actividad antimicrobiana, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con promedios de halos de inhibición de 27.29mm, 24.82mm, 22.18mm y 14.73mm y para *Escherichia coli* ATCC 8739 promedios de 19.22mm, 17.14mm, 16.49mm y 12.44mm, respectivamente. Datos que pueden ser comparados con los reportados por Roger Alejo Mendoza en la tesis titulada **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL de las hojas de *Tagetes elliptica* (chincho)**, donde refiere que el aceite esencial de su recurso estudiado perteneciente al mismo género, presentó actividad antimicrobiana a las concentraciones de 75%, 50% y 25% frente a *S. aureus* con halos de inhibición de 22,06mm, 21,23mm y 18.82mm, respectivamente. Aracel Vargas Huaman en la tesis titulada **EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes minuta* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Bacillus cereus***, mostró que el aceite esencial de *T. minuta* igualmente presentó actividad antimicrobiana en las concentraciones de 10% y 5% frente a *S. aureus*, con halos de inhibición de 22.97mm y 17.72mm, respectivamente, así también reportó actividad frente a una gram negativa como *Salmonella typhi*. Ingrid Karin Segovia Barrientos, Lucybel Suárez De la Cruz Lesly en la tesis titulada **COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes elliptica smith* (Chincho) Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA,**

refiere que el aceite esencial de *T. elliptica* presentó actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con un halo de inhibición de 65+5.56 mm , y para *E. coli* de 25 + 1.41 mm, reportando que podría deberse a la presencia de los compuestos isocariofileno, verbenona y α - Pineno.

Nuestro estudio puede ser también confrontado con los de: Carolina Lambrecht Gonçalves, Diane Bender Almeida Schiavon, Fernanda Voigt Mota, Angela Faccin, Ryan Noremberg Schubert, Gustavo Schiedeck, Luis Filipe Damé Schuch en la tesis titulada **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Cymbopogon citratus*, *Elionurus sp.* y *Tagetes minuta L.* CONTRA BACTERIAS QUE CAUSAN MASTITIS**, donde refiere que el aceite esencial de *T. minuta L.* al 5% presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y al 1.25% frente a *Staphylococcus aureus*; así también trabajó con el extracto hidroalcohólico, el cual no reportó actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, sin embargo frente a *Staphylococcus aureus* si mostró actividad al 50%. Rosa Ana Uvidia Ortiz en la tesis titulada **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE *Duranta triacanta Juss*, *Callistemon speciosus*, y *Tagetes minuta L.*** manifiesta que tanto el extracto etanólico y subextracto etéreo presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*; pero ninguno de ellos frente a *Escherichia coli.*; a pesar que trabajó con distintos tipos de extracciones de *T. minuta L.*, sus resultados avalan la presente investigación porque se demuestra el efecto antimicrobiano que presentó la muestra.

Los resultados del presente estudio aportan información con base científica que puede ser tomado mas adelante como base para otras investigaciones. No obstante hay que considerar que los resultados pueden variar de acuerdo al origen, el procesamiento de la muestra,

el tipo de extracción, entre otros y que es muy necesario profundizar con nuevos estudios sobre los componentes químicos responsables de la actividad antimicrobiana de *T. minuta* L., para impulsar su utilización y posterior desarrollo de nuevos fitofármacos.

CONCLUSIONES

En la presente investigación del efecto de la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay), los resultados mostraron que tiene actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

El aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 100% presentó actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 con una zona de inhibición promedio de 19.22mm y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con un halo de inhibición promedio de 27.29 mm.

El aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 75% presentó actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 con una zona de inhibición promedio de 17.14mm y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con un halo de inhibición promedio de 24.82 mm.

El aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 50% presentó actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 con una zona de inhibición promedio de 16.49mm y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con un halo de inhibición promedio de 22.18 mm.

El aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) al 25% presentó actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 con una zona de inhibición promedio de 12.44mm y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con un halo de inhibición promedio de 14.73 mm.

RECOMENDACIONES

Continuar el trabajo de investigación del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) para determinar otras propiedades biológicas.

Continuar la investigación del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a otras cepas bacterianas y fúngicas.

Realizar estudios toxicológicos que validen su uso en base a su inocuidad y su actividad farmacológica en el tratamiento de diversas enfermedades.

Realizar estudios de comparación sobre la actividad antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. (huacatay) tomando muestras de diferentes lugares de zonas de cultivos y estación del año.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mejía K, Rengifo E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana [libro electrónico]. 2ª Ed. Perú: Uldemolins; 2000 [Citado:2017 Julio15].
Disponible en: www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/L017.pdf.
2. Quizhpe PA. Uso Apropiado de Antibióticos y Resistencia Bacteriana. [libro electrónico]. Ecuador: Afeme; 2014 [Citado: 2017 Julio 22].
Disponible en: <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/10/Uso-Apropiado-de-Antibioticos-y-Resistencia-Bacteriana.pdf>
3. Ortega M CH. Presión y Resiliencia Socio-Ambiental Fronteras de la naturaleza [sede web]. [consultado 02 de setiembre 2017].

Disponible en:
<http://www.osinergmin.gob.pe/newweb/pages/GFH/ForoUMAL/tema9.pdf>
4. Alejo MR. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de las hojas de *Tagetes elliptica* (chincho). [tesis para optar el Título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad a las Peruanas, facultad de medicina y ciencias de la salud, Escuela académico profesional de Farmacia y Bioquímica; 2015.
5. Vargas HA. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tagetes minuta* L., sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Bacillus cereus*. [tesis para optar el Título Profesional de Biólogo-Microbiólogo]. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela académico profesional de microbiología y parasitología; 2013.
6. Segovia BK, Suárez DCLL. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith (Chincho) y determinación de su actividad

antioxidante, antibacteriana y antifúngica. [tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010.

7. Lambrecht GC, Almeida SD, Voigt MF, Faccin A, Noremborg SR, Schiedeck G, et al. Actividad antibacteriana de los extractos de *cymbopogon citratus*, *elionuru* sp. y *tagetes minuta* L. contra bacterias que causan mastitis. [publicación periódica en línea]. 2013 [citado:2017 Julio 20]; 18(3): [aproximadamente 7pp.]
Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n3/pla15313.pdf>
8. Uvidia OR. 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 profesional de bioquímico farmacéutico]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2012.
9. Prieto GS, Garrido GG, González LJ, Molina TJ. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. [publicación periódica en línea] 2004 [citado:2017 Julio 20] ;35(1): [aproximadamente 17pp.]
Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181226086004.pdf>
10. Morales SM, Morales MJ. Plantas medicinales y Medicina natural, Sociedad Chilena de Fitoterapia [libro electrónico]. 2ª Ed. Chile: ocho libros; 2014. [Citado:2017 Julio 25]. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/281747269_Plantas_medicinales_fitofarmacos_y_fitomedicamentos_hacia_una_fitomedicina_basada_en_la_evidencia_cientifica.
11. Torres CV, Castro CA. Fitoterapia. Revista de Actualización Clínica de Bolivia. [publicación periódica en línea], 2014[Citado: 2017 Agosto 2]; 42: [aproximadamente 5 PP.]

Disponible en:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000300001&script=sci_arttext&tIng=es.

12. Hernández RA. Fitoterapia, Bases científicas y legales para su aplicación [publicación periódica en línea] 2005 Mayo [Citado: 2017 Agosto 10]; 4(4): [aproximadamente 4 PP.] Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/blacpma_v4_n4._fitoterapia._bases_legales._pdf.pdf.
13. Agapito FT, Sung I. Fitomedicina 1100 Plantas Medicinales. Lima: Isabel; 2003.
14. García S F-, López V E, Aguilar RS, Aguilar C A. Botánica estructural [publicación periódica en línea] 2012 [Citado: 2017 octubre 12]; 90(3)

Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-42982012000300001
15. Mostacero LJ, Castillo PF, Mejía CF, Gamarra TO, Charcape RJ, Ramírez RA. Plantas medicinales del Perú. Perú: Instituto Pacifico S.A.C; 2011.
16. Carhuapoma YM. Plantas aromáticas nativas del Perú. Biocomercio de fragancias, sabores y fitocosméticos. Lima: Concytec; 2011.
17. Iannacone J, Alvariano L, Guabloche A, Ventura K, La Torre MI, Carhuapoma M, et al. Acute and Chronic Toxic Effect of *Tagetes minuta* L. " Black Mint" (*Asteraceae*) and Carbaril on six Important Entomophages in Biological Control. [publicación periódica en línea] 2017 [Citado: 2017 Agosto 15]; 15(1): [aproximadamente 12 PP.]
Disponible en: unfv.edu.pe/index.php/rtb/article/download/145/137

18. Jorge A. alternativa ecologica [sede web].Lima ; 2011 [consultado 10 de octubre 2017].
Disponibile en : [http://ecosiembra.blogspot.pe/2011/08/cultivo de-huacatay.html](http://ecosiembra.blogspot.pe/2011/08/cultivo-de-huacatay.html)
19. Kuklinski,k C. Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Barcelona: Omega; 2003.
20. Brunenton J. Farmacognosia fitoquimica de plantas medicinales. 2ª Ed. Madrid: Acribia; 2001.
21. Villar del Fresco AM. farmacognosia general. Madrid : síntesis, 1999
22. Montoya CG, aceites esenciales plantas medicinales y aromáticas [libro electrónico] Colombia : 2010[Citado: 2017 octubre 18].
Disponibile en :
<http://www.bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>
23. Alemany UJ, Palá PJ, Díaz S. Aceites esenciales conceptos básicos y actividad antibacteriana. [publicación periódica en línea] 2014[Citado: 2017 sitembre 28] , 7 (2) [aproximadamente 10PP.]
Disponibile en :
<http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553/1747>
24. Martínez M A, aceites esenciales, [sede web]. [consultado 10 de octubre 2017].
Disponibile en:
[http://www.medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/Aceites s EsencialesUdeA_esencias2001b.pdf](http://www.medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/Aceites%20EsencialesUdeA_esencias2001b.pdf)
25. Destilación por arrastre con vapor. [sede web]. [consultado 17 de octubre 2017].
Disponibile en : <http://organica1.org/1311/1311pdf10.pdf>

26. Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales extraídos de Plantas Medicinales y Aromáticas. [sede web]. [consultado 09 de octubre 2017]. Disponible en :
http://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/pdf/aceites%20esenciales%20extraidos%20de%20plantas%20medicinales%20y%20aromaticas.pdf.

27. Peredo LH, Palou GE, Lopez MA. Aceites esenciales: métodos de extracción. [publicación periódica en línea] 2009 [Citado: 2017 Julio 28];3(1): [aproximadamente 8PP.]
 Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

28. Stashenko EE. aceites esenciales [libro electrónico]. Bucaramanga : cenivam ; 2009 [citado :2017 octubre 05]. Disponible en: <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf>

29. Cerutti M, Neumayer F. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. [publicación periódica en línea]. 2004 junio[citada: 2017 agosto 28] ; 7(12): [aproximadamente 6pp.].Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7009/1/UPS-CT003676.pdf>

30. Tortora JG, funke RB, case LC. Introducción ala microbiología. 9ª ED. buenos aires : panamericana; 2013.

31. Pírez MM. Morfología y estructura bacteriana [sede web]. [consultado 12 de octubre 2017]. Disponible en :
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana>.

32. Cranados pr, Villaverde pC. microbiologia.2ªED ESPAÑA:Paraninfo; 2014.

33. Lansing MP, Harley PJ, Klein AD. Microbiología. 5ª Ed. Madrid: Mcgraw-hill-interamericana ; 2004.
34. WINN CW, Allen DS, Janda MW, Koneman WE, Schreckenberger CP, Woods IG. Diagnóstico microbiológico. 6ª ED México- Madrid : panamericana ; 2013.
35. Murray RP, Rosenthal SK, Pfaller AM. microbiología médica 7ª ED España :Elsevier ;2013.
36. Jawetz ,Melnick y Adelberg. Microbiología Medica. 15ª Ed. Perú; 2009.
37. Mollinedo PM, González V C. Bacterias Gram Negativas. [publicación periódica en línea] 2014[Citado: 2017 octubre 18],49.Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000005&script=sci_arttext
38. Zendejas GM, Avalos FH, Soto PM. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. [publicación periódica en línea] 2014[Citado: 2017 Agosto 18]; 25(3): [aproximadamente 15PP.] Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>.
39. Cervantes García Estrella, García González Rafael, Salazar Schettino Paz María. Características generales del *Staphylococcus aureus*. [publicación periódica en línea] 2014[Citado: 2017 Agosto 18] ; 61 (1): [aproximadamente 12PP.]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>.
40. Bustos MJ, Hamdan PA, Gutierrez CM, *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. [publicación periódica

en línea] 2006 [Citado: 2017 Julio 20]; 17: [aproximadamente 18PP.]
Disponibile en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf>.

41. Silva G M, *Staphylococcus aureus*. [sede web]. [consultado 15 de octubre 2017].

Disponibile en:

http://7staphylococcusaureus.blogspot.pe/2007/11/epidemiologa_2543.html

42. Joklik kw, Willett PH, Amos DB, Wilfert MC. microbiologia 20ª ED
Madrid : Panamericana ;1994.

43. Guadalupe RA. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. [publicación periódica en línea] 2002[Citado: 2017 Julio 30]; 44(5): [aproximadamente 11PP.]Disponibile en: http://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf.

44. Stuart WT. microbiologia. Mexico :mcgraw-hill interamericana; 2001.

45. Murray RP, Rosenthal SK, Pfaller AM, Kobayashi GS. microbiología médica 4ª ED España :Elsevier ;2002.

46. Canet JJ, *Escherichia Coli* características, patogenicidad y prevención[sede web]. [consultado 10 de octubre 2017].

Disponibile en :

<http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>

47. Sacsquispe CR. Velásquez PJ. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión por disco. Ministerio de Salud, instituto Nacional de Salud. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud, Serie de Normas Técnicas N° 30[internet]. Lima: 2002.Disponibile en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>.

48. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica [sede web]. [consultado 10 de octubre 2017]. Disponibilidad en : <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
49. Malbrán GC. método de determinacion de sensibilidad antimicrobiana por dilucion. [publicación periódica en línea], 2012 [Citado: 2017 octubre 11]; 32(2): [aproximadamente 48 PP.] Disponible en : <http://antimicrobianos.com.ar/atb/wp-content/uploads/2012/11/04-determinacion-de-la-sensibilidad-metodo-de-dilucion-2012.pdf>
50. Picazo JJ. Procedimientos en Microbiología Clínica [sede web]. [consultado 09 de octubre 2017]. Disponible en : http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntib%C3%B3ticos.pdf
51. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. [sede web]. [consultado 15 de octubre 2017]. Disponible en : <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/tema-12.pdf>

ANEXOS

ANEXO Nº 1

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Tagetes minuta* L. (*huacatay*) SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
<p>¿Cuál es el efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su Actividad antimicrobiana ?</p> <p>Problemas Especificos</p> <p>P.E.1: ¿Cuál es el efecto de la concentración al 100 % del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538?</p> <p>P.E.2. ¿Cuál es el efecto de la concentración al 75% del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538?</p> <p>P.E.3: ¿Cuál es el efecto de la concentración al 50% del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538?</p> <p>P.E.4: ¿Cuál es el efecto de la concentración al 25% del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ?</p>	<p>Determinar el efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su Actividad antimicrobiana.</p> <p>Objetivos Especificos</p> <p>O.E.1: Evaluar el efecto de la concentración al 100% del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 .</p> <p>O.E.2: Evaluar el efecto de la concentración al 75% del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 .</p> <p>O.E.3: Evaluar el efecto de la concentración al 50% del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 .</p> <p>O.E.4: Evaluar el efecto de la concentración al 25% del aceite esencial de las Hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p>	<p>La concentración del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) modifica su actividad antimicrobiana.</p> <p>Hipótesis Especificas</p> <p>H.E.1: La concentración al 100% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 .</p> <p>H.E.2: La concentración al 75% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p> <p>H.E.3: La concentración al 50% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p> <p>H.E.3: La concentración al 25% modifica la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p>	<p>Tipo de Investigación:</p> <p>Analítico: Porque trata de demostrar la relación que existe entre las variables</p> <p>Prospectiva: Porque recolecta los datos correspondientes a los hechos que ocurren después de iniciada la investigación</p> <p>Transversal : porque las variables serán medidas en una sola ocasión y luego analizadas.</p> <p>Nivel de Investigación:</p> <p>Explicativo: Porque varia la concentración del aceite esencial de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) que realiza una acción sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p>	<p>Método de Investigación:</p> <p>Deductivo Porque el estudio va de lo general a lo específico</p> <p>Diseño de investigación:</p> <p>Experimental: Porque se manipulara la variable concentración del aceite esencial.</p>	<p>Variable Independiente(x) Concentración del Aceite esencial</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> - Efecto de la Concentración del aceite esencial al 100% - Efecto de la Concentración del aceite esencial al 75% - Efecto de la Concentración del aceite esencial al 50% - Efecto de la Concentración del aceite esencial al 25% <p>Variable Dependiente</p> <p>Actividad antimicrobiana</p> <p>Indicadores</p> <p>Tamaño del Halo de inhibición</p>	<p>Población :</p> <p>Las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>) procedentes de la provincia de Andahuaylas (Apurímac)</p> <p>Muestra:</p> <p>Aceite esencial extraído de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L. (<i>huacatay</i>)</p>

ANEXO Nº 2

EVALUACION MICROBIOLOGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Tagetes minuta* L. (huacatay) VS. DOS CEPAS BACTERIANAS.

CEPAS	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538				<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
	Halos de inhibición (mm)				Halos de inhibición (mm)			
	n			X	n			X
Concentración del aceite esencial (%)	1	2	3		1	2	3	
100%								
75%								
50%								
25%								

Fuente: Elaboración Propia

n : número de ensayos microbiológicos

X : Promedio

ANEXO Nº 3

FIGURA Nº 04 : Constancia de identificación taxonómica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA Nº162-USM-2017

LA JEFE (E) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas y raíz) recibida de **Norma PURE MALMOREJÓN**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas, ha sido estudiada y clasificada como: **Tagetes minuta** L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: Tagetes

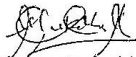
ESPECIE: Tagetes minuta L

Nombre vulgar: "huacatay"
Determinado por Blgo. Mario Benavente

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 04 de agosto de 2017




Dra. Mónica Arakaki Makishi
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

MAM/ddb

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Telfs. (511)471-0117, 470-4471
265-6819, 619-7000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
http://museohn.unmsm.edu.pe

FIGURA Nº 06 : Constancia de análisis microbiológico



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



LA DIRECTORA DEL CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA:

CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN PROCESO DE ANÁLISIS

A la Srta. NORMA PURE MALMOREJON, quien fue partícipe de la realización de los análisis Microbiológicos de Escherichia coli y Staphylococcus aureus de su muestra "TAGETES MINUTA (HUACATAY), para la implementación de su tesis, en nuestro Laboratorio del Centro de Control Analítico – CENPROFARMA

Se expide el presente documento a solicitud de la interesada, para los fines que estimen por conveniente.

Lima, 06 de Noviembre del 2017.

Dra. María Elena Salzar Salazar
Directora (e) del Centro de Control Analítico



"FARMACIAS, LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno Nº 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
✉ E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification
Nº BR233265



ANEXO Nº 4

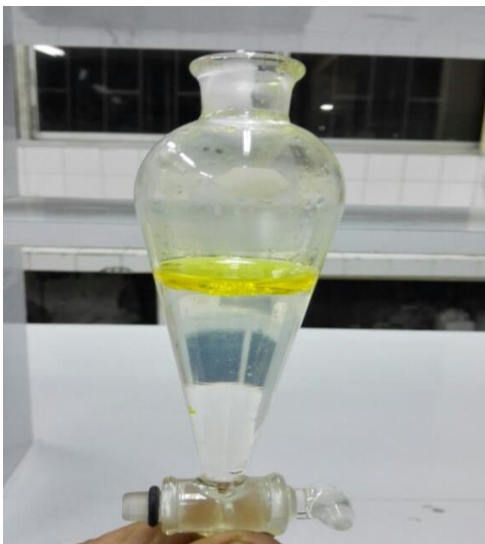
FIGURA Nº 07 : Extracción del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (huacatay)



a)



b)



c)



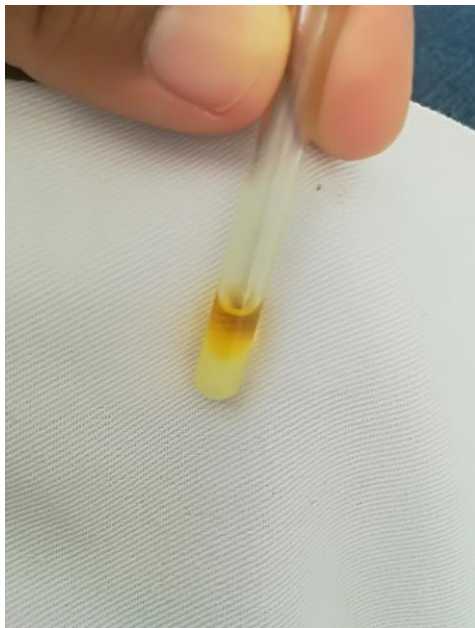
d)

- a) Proceso de extracción b) Extracción de aceite esencial c) Decantación
d) Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay)

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO Nº 5

FIGURA Nº 08 : Prueba de Solubilidad dimetilsulfoxido y metanol



a)

a) Dimetilsulfoxido



b)

b) Metanol

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO Nº 6

FIGURA Nº 09 : Cepas patógenas de ATCC



a)



b)

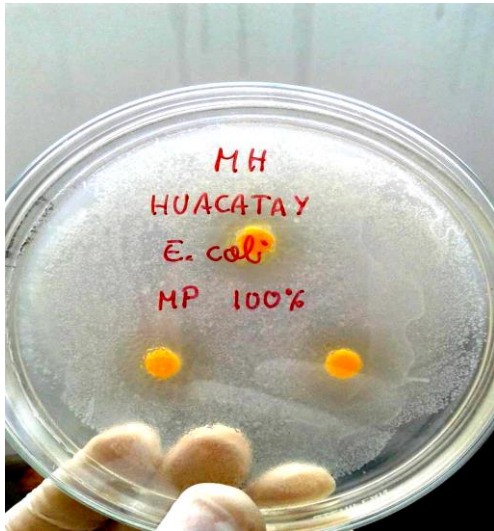
a) Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

b) Cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739

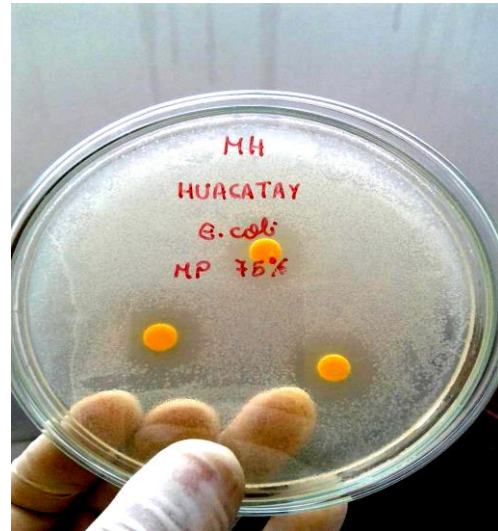
FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO N° 7

FIGURA N° 10 : Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a *Escherichia coli* ATCC 8739.



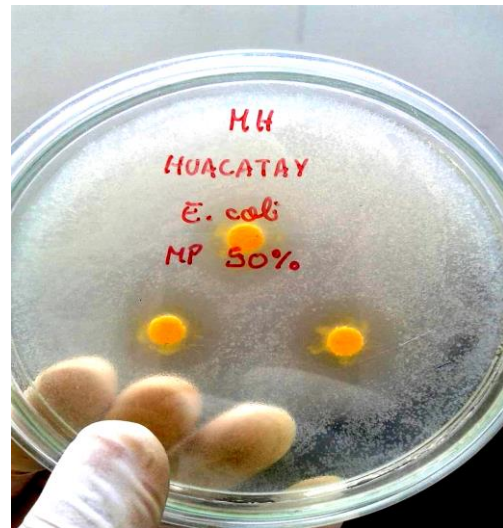
a)



b)



c)



d)

a) Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 100% **b)** Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 75% **c)** Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 50% **d)** Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 25%

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO N° 8

FIGURA N° 11 : Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (huacatay) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.



a)



b)



c)



d)

a) Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 100% **b)** Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 75% **c)** Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 50% **d)** Aceite esencial de *Tagetes minuta* L. al 25%.

FUENTE: Elaboración propia.