

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite
esencial de la hoja y tallo de *Tagetes filifolia* "anís del
campo", Ayacucho 2014.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

PRESENTADO POR:

Bach. HUAILLA QUISPE, Ina Félida

AYACUCHO – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS


ACTA DE SUSTENTACIÓN TESIS
RD N° 106-2015-UNSCH-FCB-D
Bach: HUAILLA QUISPE, Ina Félida

En la ciudad de Ayacucho, siendo las seis de la tarde con cinco minutos, del día veintidos de Mayo del año dos mil quince y en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se reunió el jurado evaluador integrado por los profesores Dr. Carlos Edwin Enciso Roca en calidad de presidente encargado mediante Memorando N° 228-2015-UNSCH-FCB y los profesores Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo (miembro), Mg José Alarcón Guerrero, no asiste el Dr. Emilio Ramirez Roca y como secretario docente el Blgo. Elbert Hermoza Valdivia con la finalidad de recepcionar la tesis titulada: Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de la hoja y tallo de Tagetes filifolia "anís de campo" Ayacucho 2014, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica Huaila Quispe, Ina Félida; quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

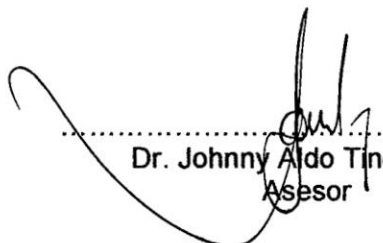
Se constató el expediente presentado con motivo de la sustentación, la que está en orden al cumplir todo lo solicitado, motivo este para que el presidente del jurado evaluador Dr. Edwin Enciso Roca, de la autorización a la Srta. Sustentante para que inicie con su exposición, por lo mismo que dé inicio a su exposición en forma inmediata. Concluida con la exposición el Sr. Presidente encargado del jurado evaluador invita a los profesores del jurado para que puedan efectuar sus preguntas o solicitar las aclaraciones que crean convenientes, las mismas que son respondidas por la sustentante. Concluida esta parte de las preguntas, el Sr. Decano invita a la sustentante y público para que puedan hacer abandono momentáneo del Auditorio con la finalidad de discutir la exposición y efectuar la calificación respectiva del mismo que se obtiene:


Miembro Jurado	Exposición	Rpta a pregunta	Promedio
Dr. Carlos Edwin Enciso Roca (Pdte)	16	16	16
Mg. José Alarcón Guerrero (Miembro)	17	16	17
Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo (Asesor)	17	17	17

Del mismo que se ha obtenido la nota de Diecisiete (17) que resulta siendo APROBATORIA, invitándose a la Srta. Sustentante y público asistente para que puedan hacer ingreso al Auditorio con la finalidad de dar el resultado en forma pública, procediéndose a la colocación de la medalla de la Universidad en reconocimiento a la nueva profesional Químico Farmacéutica, y procediendo a tomar el juramento farmacéutico de Ley. Termina la sustentación siendo las ocho y treinta de la noche. Firmando los miembros del jurado evaluador al pie del presente en reconocimiento y conformidad del mismo.


.....
Dr. Carlos Edwin Enciso Roca
Miembro - Presidente


.....
Mg. José Alarcón Guerrero
Miembro


.....
Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo
Asesor


.....
Blgo. Elbert Hermoza Valdivia
Secretario Docente

A Dios por haberme permitido nacer en el seno del hogar más hermoso, fundamentado en los valores, el amor, la unión y quien en momentos difíciles dio luz a mi camino y sabiduría para elegir la senda del triunfo.

A mi padre Félix A. Huaila Guillén† por haber sido mi maestro y mi motor para la realización de mis sueños, porque todo lo que soy en la vida se lo debo a él; a mi mami Magda S. Quispe porque al lado de todo gran hombre hay una gran mujer...por sus enseñanzas, su paciencia y especialmente por los sabios consejos que me han ayudado en cada etapa de mi vida.

A mis hermanas Rina y Armida por su apoyo, amor, compañía y por regalarme cada día comprensión. A mi hermano Ives, por ser como es y especialmente por confiar en mí siempre, los quiero muchísimo.

Con mucho cariño y amor a mis hijas Hannah y Alexa por ser mi motor y motivo en el cada día de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A los distinguidos miembros del jurado por sus sugerencias y aportes al trabajo de investigación realizado: Mg. Emilio German Ramírez Roca, Mg. José Alarcón Guerrero y Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo

Al Dr. Mario Carhuapoma Yance y Dr. Homero Ango Aguilar por su valioso asesoramiento y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación, demostrando ser modelos éticos, morales y sociales para seguir. Dios los bendiga y otorgue mucha felicidad en su vida.

A todas las personas que me brindaron su apoyo, sugerencias y consejos en la ejecución del presente trabajo

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Tagetes filifolia</i> . "anís del campo"	5
2.2.1. Aspectos botánicos	5
2.3. Aceites esenciales	7
2.3.1. Extracción de los aceites esenciales	7
2.3.2. Características de los aceites esenciales	8
2.3.3. Composición química de los aceites esenciales	8
2.4. Actividad antibacteriana	12
2.5. Actividad antioxidante	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Ubicación	19
3.2. Muestra	19
3.3. Diseño experimental	20
3.4. Procedimiento	20
3.5. Actividad antimicrobiana	20
3.6. Actividad antioxidante	23
3.7. Análisis de datos	24
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	38
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	45

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	Propiedades físico químicas del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i>	26
TABLA 2	Actividad antioxidante encontrada en las muestras del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> mediante espectrofotometría por el método de DPPH.	27
TABLA 3	Halos de Inhibición de tres antibióticos frente a bacterias indicadoras. Ayacucho 2014	29
TABLA 4	Diámetro promedio de los halos de inhibición de ocho concentraciones crecientes de aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo", Ayacucho 2014	31

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Actividad antioxidante encontrada en las muestras del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> mediante espectrofotometría por el método de DPPH.	28
FIGURA 2	Grafico comparativo de los halos de inhibicion del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" (160ug/ml) frente a antibioticos (Ceftriaxona 30 ug, Ciprofloxacina 5 ug, Cloranfenicol 30 ug), Ayacucho 2014	30
FIGURA 3	Representación de la actividad antibacteriana frente a bacterias indicadoras en ocho concentraciones crecientes de aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo", Ayacucho 2014	32
FIGURA 4	Fotos de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo"	46
FIGURA 5	Constancia de verificación del insumo utilizado para el proyecto de tesis	47
FIGURA 6	Protocolo de análisis de la actividad antioxidante de <i>Tagetes filifolia</i>	48
FIGURA 7	Imágenes del procesamiento de la actividad antimicrobiana del <i>Tagetes filifolia</i>	49

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	Fotos de <i>Tagetes filifolia</i> "anís del campo"	46
ANEXO 2	Constancia de verificación del insumo utilizado para el proyecto de tesis	47
ANEXO 3	Protocolo de análisis de la actividad antioxidante de <i>Tagetes filifolia</i>	48
ANEXO 4	Imágenes del procesamiento de la actividad antimicrobiana de <i>Tagetes filifolia</i>	49
ANEXO 5	Matriz de consistencia	50

RESUMEN

El Perú posee una rica variedad en especies vegetales, debido a las condiciones geográficas favorables, muchas de ellas de naturaleza medicinal, por la presencia de metabolitos que pueden ser obtenidos para su uso en humanos. El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad determinar algunos parámetros fisicoquímico cualitativamente, así como la actividad antibacteriana y antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Tagetes filifolia* "anís del campo" obtenido de la Provincia de Huaraz, Región Ancash. La parte experimental de la actividad antioxidante fue realizada en el Centro de Control Analítico CENPROFARMA de la Facultad de Farmacia de la UNMSM, y la actividad antimicrobiana en el Centro de Investigaciones Científicas BIOCIENTIFICA -- BIOLAB. Respecto a la actividad antioxidante, se realizaron pruebas de captación de radicales libres por el método del difenilpicrilhidrazilo (DPPH); obteniéndose una actividad antioxidante de 80.89% para una concentración del 50%, frente al 78% de actividad antioxidante de la Vitamina C (utilizada como control).

La actividad antibacteriana se realizó frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933), con un halo de inhibición de 16 mm; para *Escherichia coli* (ATCC 25922) con un halo de inhibición de 12 mm y para *Pseudomonas aeruginosa* con un halo de inhibición de 9 mm.

Palabras Clave: *Tagetes filifolia*, aceite esencial, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú posee una rica variedad en especies vegetales, debido a las condiciones geográficas favorables, por ejemplo la presencia de la Cordillera de los Andes, la existencia de tres regiones geográficas y la diversidad de pisos ecológicos; conjugando una variada representación vegetal por cada departamento.¹

Con respecto a la región Ancash, entre la flora más representativa tenemos a la Puya Raimondi, y a otras plantas propias de la región como son el ichu, los árboles de quisuar, queñoa, etc; igualmente, se han identificado más de 850 especies de flora, que conforman diferentes asociaciones de humedales, pastizales, matorrales y bosques; destacando entre ellas las especies arbóreas del género *Polylepis*, *Gynoxys*, *Buddleja* y *Alnus*. Destaca también la variedad de orquídeas además, de especies de importancia como recurso genético, entre las que tenemos a *Oxalis sp.* (oca silvestre), *Solanum sp.* (papa silvestre) *Lupinus sp.* (chocho silvestre) etc.² También destaca la flora medicinal, como la Puca maca, la Wila wila, el Anís del campo, etc. Con respecto al anís del campo, es una planta medicinal que se usa como antipirético, antiparasitario, antifúngico y para trastornos digestivos, en forma de polvo, infusión, tintura y jarabe.

Por otro lado la medicina tradicional, en los últimos años ha cobrado importancia como una terapia alternativa al uso de medicamentos sintéticos producidos en la industria farmacéutica, y cabe destacar el uso de variadas plantas medicinales, de cuyas hojas, frutos, tallos y raíz se obtienen metabolitos activos por medio de extractos alcohólicos, acuosos; por destilación o decocción.³

Uno de los componentes activos de dichas plantas medicinales son los aceites esenciales, una compleja mezcla natural de metabolitos secundarios volátiles, aislados de las plantas mediante métodos como: destilación, extracción con solventes, etc. Los principales constituyentes de los aceites esenciales son compuestos químicos conocidos como mono y sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos, éteres, aldehídos y cetonas, los que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de estas plantas medicinales. Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades farmacológicas, demostrando propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. Otras cumplen actividad biocida contra una gran variedad de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas. Además durante mucho tiempo han sido utilizados en el campo de la cosmética, en la elaboración de perfumes, la conservación de alimentos y aromaterapia.^{3, 4, 5, 6, 7}

Gran parte de su uso proviene de su contenido de aceites esenciales, que le brindan el aroma característico. El presente estudio pretende determinar la composición química, la actividad antioxidante y antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes filifolia*; apoyado en hipótesis e investigaciones anteriores realizadas sobre aceites esenciales y su potencial efecto antioxidante y antibacteriano; asimismo brindar información para futuros estudios y aplicaciones de la mencionada especie; y aprovechar así nuestros recursos naturales como alternativa de salud frente a los antibióticos convencionales y a los antioxidantes artificiales, cuyos efectos secundarios han producido diversos problemas en pacientes y consumidores, como resistencia bacteriana, reacciones adversas y predisposición a enfermedades oncológicas.^{8, 9}

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La especie botánica en estudio en el presente trabajo comprende cerca de 60 especies comprendiendo entre ellas a: *Tagetes filifolia*, además de *Tagetes elliptica* Smith, *Tagetes erecta*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pusilla*, *Tagetes lucida*, *Tagetes patula*, y *Tagetes tenuiflora*, entre las más destacables debido a sus usos como alimentos, condimentos, como materia prima en la extracción de pigmentos, en la medicina tradicional y como antagonista de nemátodos fitoparásitos.^{8,9}

La especie *Tagetes filifolia*, conocida como “anís del campo” o “anisillo” es utilizado como condimento y en la elaboración de licores, y como planta medicinal se emplea en diversos usos, tales como antipirético, antiparasitario, antifúngico y para trastornos digestivos, en diversas formas farmacéuticas por ejemplo en forma de polvo, infusión, tintura y jarabe.

En diversos estudios realizados usando extractos metanólicos y acuosos de esta planta se encontró una actividad potente frente a bacterias patógenas y se sugiere considerar su uso como una alternativa para sustituir o complementar antibióticos, especialmente en la alimentación animal. Según referencias el aceite esencial del fruto tiene efectos anticonvulsivos y relajantes, se emplea en el tratamiento de algunas enfermedades como la epilepsia y es utilizado como antiparasitario en veterinaria. Además esta esencia también mostró actividad insecticida y acaricida y presentó efecto antibiótico frente a bacterias y hongos patógenos que afectan al hombre y los animales; sin embargo, su actividad

frente a microorganismos fitopatógenos es una actividad menos estudiada, lo que justifica el presente estudio.^{10,11,12,13}

Respecto a su potencial actividad biológica referida en cuanto a los estudios realizados en torno a este género botánico destacan:

En el año 2004 Felices, Senatore y col demostraron la existencia de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) contra las bacterias evaluadas, con valores de CMI de 6.25 – 25µg/ml para bacterias Gram positivas y de 25- 50 µg/ml para bacterias Gram negativas. Así mismo, se reportó que los niveles de dihidrotagetonas, tagetonas, y ocimenonas encontrados en dicha planta podrían tener relación en la actividad antimicrobiana observada. Otros reportes muestran que el extracto de hojas de *Tagetes lucida* presenta actividad contra bacterias Gram positivas.¹⁴

Pineda Castillo y colaboradores mostraron que el extracto etanólico de hojas de *Tagetes elliptica* L. (chincho) mostró actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, con valores de CMI de 3.125 µg/ml.¹⁵

En un estudio realizado por Tereschuk (2005), los flavonoides mayoritarios del género *Tagetes* extraídos de hojas y flores de *T. minuta*, *T. pusilla* y *T. tenuiflora* fueron agliconas como patuletina, quercetina, quercetagetina, isoramnetina.

Se trató de esclarecer el mecanismo de acción, como antimicrobiano, del flavonol quercetagetina, que es una de las agliconas más ampliamente distribuida en el género *Tagetes*, al que se le atribuye una potente actividad inhibitoria frente a todas las enzimas eucarióticas ADN polimerasas α , β y ADN polimerasa I de *E. coli*, así como frente a la enzima ARN polimerasa eucarióticas¹⁶

Se reportaron resultados que permiten validar el uso popular de *Tagetes pusilla* (anís serrano) en el tratamiento de afecciones intestinales como salmonelosis y el cólera. Respecto a la levadura oportunista *Candida albicans*, se reportó que dicho aceite esencial ejerció un efecto similar al del Micostatin (único antimicótico al que fue sensible)¹⁰

A partir de dichos antecedentes, el presente proyecto va enmarcado al estudio de este aceite esencial con actividad antioxidante y antimicrobiana para mejorar este proceso, creando una alternativa medicinal, el cual además de poseer propiedades antifúngicas, también goza de excelentes propiedades antibacterianas y antioxidantes.

2.2. *Tagetes filifolia* “anis del campo”

2.2.1 Aspectos botánicos

2.2.1.1 Clasificación sistemática

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA

CLASE : MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE : ASTERIDAE

ORDEN : ASTERALES

FAMILIA : ASTERACEAE

SUBFAMILIA : ASTEROIDEAE

TRIBU : TAGETEAE

GENERO : *Tagetes*

ESPECIE : *Tagetes filifolia*

NOMBRE VULGAR : “anis del campo”

Fuente: certificado expedido por el jefe del Herbarium de historia natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (anexo 2)

2.2.1.2. Descripción botánica.

El género *Tagetes*, perteneciente a la tribu Tageteae que contiene a 16 géneros, corresponde a la familia de las Asteraceae. Este mismo género comprende 56 especies netamente aromáticas, las cuales crecen cultivadas o silvestres, son nativas de América y muy pocas de ellas son adventicias en el Viejo Continente. Algunas de ellas se cultivan como ornamentales, y se les conoce como “virreinas” o como “marigold”; y otras se han adaptado bien a la horticultura, existiendo antecedentes de su cultivo y uso extendido.

Historicamente, el nombre de *Tagetes*, originalmente fue aplicado por el filósofo Apuleus (siglo II), ello en honor al bello Dios etrusco Tages, en alusión a la hermosura de las flores; nombre que posteriormente fue adoptado por Leonhartus Fuchius en su libro “Historia Stirpium” en el siglo XVI.^{16,17}

Con respecto a sus características botánicas es una hierba anual muy aromática de 10 a 50 cm de altura. Sus hojas son opuestas pinnadamente divididas en segmentos lineales a filiformes. Las flores están agrupadas en cabezuelas, son amarillas y ligeramente fusiformes, a veces la cabezuela presenta una o dos flores con lengüeta blanca. El fruto es aquenio y las semillas estriadas finamente puberulentos.

Esta planta es originaria de Centroamérica. El “anís de campo” habita en climas cálidos, semicálidos y templados, entre los 300 msnm y hasta los 2000 msnm, se desarrolla en los meses de agosto a enero y su altura varía desde 10 hasta 40 cm. ^{19,20}

Crece de manera silvestre a las orillas de caminos, preferentemente en bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorrales xerófilos, bosques de encino, etc.²¹

2.2.4. Usos medicinales tradicionales

Los nombres comunes con los que se conoce a esta especie son anisillo, hierba anís, anís del campo, flor de Santa María, curucumin, limonsillo, putsutis²²

El anís del campo es considerado ancestralmente también como una planta medicinal por la mayor parte de los pueblos tradicionales andinos. El consumo de la planta de anís del campo es muy utilizado para tratar enfermedades de los bronquios y los pulmones. Debido a sus propiedades expectorantes resulta útil en resfríos con acumulación de secreciones en los pulmones y tos. El anís de campo posee propiedades carminativas, por lo cual resulta altamente recomendado su consumo para problemas estomacales con acumulación de gases, ya que favorece la digestión y posee propiedades antiespasmódicas en caso de diarrea, tanto en niños como en adultos.

La planta de anís o anís del campo posee dentro de su composición sustancias que favorecen la producción láctea de las mujeres (propiedad galactógena), que se encuentran en período de lactancia, por lo tanto resulta aconsejable su consumo en infusión en mujeres que amamantan, no así el aceite esencial de anís que está contraindicado en dicha situación.

Esta planta posee excelentes propiedades aperitivas, por lo cual es muy recomendado su consumo previo a las comidas en aquellas personas que presenten algún grado elevado de inapetencia.

Además debido a su composición presenta propiedades sedantes, por lo cual se emplea para tratar problemas en que se necesite controlar y relajar los nervios, así como también para manejar la ansiedad ^{19,23}

Otros usos medicinales del anís de campo:

También es aconsejado para tratar la acidez estomacal y debido a sus propiedades diuréticas es utilizado para tratar infecciones urinarias y cistitis.

También se usa como forraje para ganado y como insecticida cuando se quema en fresco, por ejemplo al quemarse su humo ahuyenta a los mosquitos. ²⁴

2.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias líquidas volátiles obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático.

Dado que los aceites esenciales se encuentran en concentraciones mínimas en la planta, generalmente son difíciles de obtener, para lo cual es necesario contar con gran cantidad de material vegetal. ^{25,26}

2.3.1. Extracción de los aceites esenciales:

Los diferentes procesos de extracción utilizados en la obtención de aceites esenciales comprenden métodos como: expresión, destilación con arrastre de vapor de agua, extracción con solventes y con fluidos supercríticos como se indica:

METODO	PROCEDIMIENTO		PRODUCTOS OBTENIDOS
MÉTODOS DIRECTOS	EXPRESION	COMPRESIÓN DE CÁSCARAS	ACEITES ESENCIALES CÍTRICOS
		RASPADO DE CASCARAS	
	EXUDADO	LESIONES MECÁNICAS EN CORTEZAS	AROMAS RESINAS BÁLSAMOS
DESTILACIÓN	DIRECTA		ACEITES ESENCIALES Y AGUAS AROMÁTICAS
	POR ARRASTRE CON VAPOR (DIRECTO, INDIRECTO, A PRESIÓN, AL VACÍO)		
	DESTILACIÓN, MACERACIÓN (LIBERACIÓN ENZIMÁTICA DE AGLICONAS EN AGUA CALIENTE)		ALMENDRAS. MOSTAZA, AJO, HOJAS DE ABEDUL

Ref. Shiva RC. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales Ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (tesis doctoral).

2.3.2. Características fisicoquímicas de los aceites esenciales:

Densidad Relativa:

La densidad se define como la masa de un sistema (m) dividida por el volumen del mismo (v) a una temperatura y presión determinadas. La densidad relativa es la relación entre la densidad de un sistema y la densidad de un sistema de referencia en condiciones especificadas para ambos sistemas. La Picnometría es una técnica de referencia para la medición de la densidad en líquidos.²⁷

Índice de Refracción:

Es la relación (n) entre la velocidad de la luz en el espacio y la velocidad de la luz en un medio determinado (también expresado como los senos de los ángulos de incidencia y de refracción); y esta relación tiende a disminuir ligeramente cuando aumenta el peso molecular. Si la radiación incidente pasa de un medio menos denso, n será menor que 1. La refractometría es la técnica que mide directamente el índice de refracción.^{28,29,30}

Rotación Óptica:

La rotación óptica es la rotación de un plano de polarización de un haz de luz polarizada plana por una sustancia ópticamente activa; viene dada por un ángulo α , que forman los planos de polarización del haz incidente y el haz emergente en la sustancia, denominado ángulo de rotación óptica. Para expresar los datos de rotación óptica en una forma lógica, para establecer comparaciones, hay que escoger condiciones estándar. La polarimetría mide el ángulo de rotación del plano de vibración de la luz polarizada, cuando esta atraviesa un medio que contiene una sustancia ópticamente activa. Para ello se utiliza el polarímetro.^{28,31}

Índice de acidez:

El índice de acidez es una medida del grado de descomposición del aceite o de la grasa, por acción de las lipasas o por alguna otra causa. El índice de Acidez de un aceite o de una grasa, se define como el número de miligramos de hidróxido de sodio (o potasio) requeridos para neutralizar la acidez libre por gramo de muestra; aunque a veces también se expresa como el porcentaje de ácido oleico presente en la muestra.³²

2.3.3. Composición química de los aceites esenciales:

Desde el punto de vista químico, los aceites esenciales provenientes de las plantas están formados principalmente por mezclas de compuestos llamados terpenos (pequeñas moléculas orgánicas con una enorme diversidad de estructuras). Se conocen miles de terpenos diferentes, y muchos tienen enlaces

dobles carbono-carbono. Algunos son hidrocarburos y otros contienen oxígeno; algunos son moléculas de cadena abierta y otros contienen anillos.

Los compuestos más importantes luego de la destilación son: terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos.^{31,33}

Todos los terpenos están relacionados, sin importar sus aparentes diferencias estructurales. De acuerdo con el formalismo denominado regla del isopreno, se considera que los terpenos surgen de la unión de la cabeza a la cola de unidades de isopreno de cinco carbonos (2-metil-1,3 butadieno).³¹

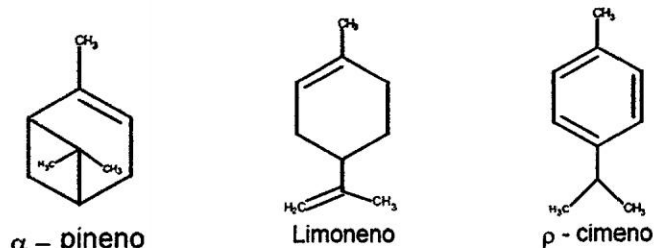
Todas las moléculas encontradas en los aceites esenciales extraídos por el método de arrastre de vapor de agua están constituidas por moléculas cuya estructura base está formada por una cadena carbonada de entre 7-20 átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Los más comunes son los de diez carbonos (monoterpenos).

Serie de los terpenos

Los grupos que más se destacan son:

Los monoterpenos

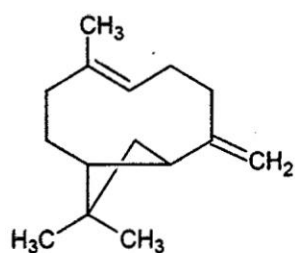
Son los más pequeños, ya que están formados como máximo por C₁₀ – H₁₅. Son hidrocarburos alicíclicos, monocíclicos, bicíclicos, o policíclicos. Van acompañados de sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y las estructuras más representativas son: p-cimeno, β-terpineol, isopulegol, s-careno-3, verbenona, tujona, limoneno, isofenchona, crisantenona, borneol, α-pineno, nerol, mentol, eucaliptol, etc.



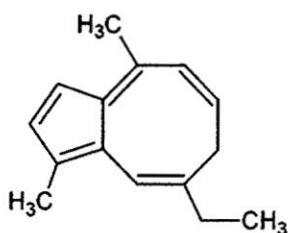
Ref. Romero MD. *Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica*

Los Sesquiterpenos

Formados por quince carbonos (C₁₅); al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones hacen que aparezcan millares de compuestos relacionados con una centena de esqueletos carbonados como el: α-zingibereno, alcohol del pachulí, α-cisbergamoteno, longifoleno, camazuleno, β-cariofileno, nerolidol, carotol, viridiferol, etc.



β - cariofileno

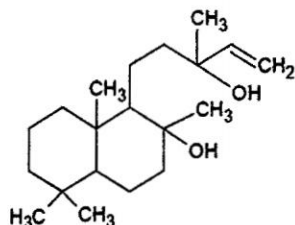


Camazuleno

Ref. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica

Los diterpenos

Son los que contienen más de 20 carbonos (C20). El más abundante es el esclareol. Los terpenos de 30 – 40 carbonos existen en plantas, pero no en los aceites esenciales.³³

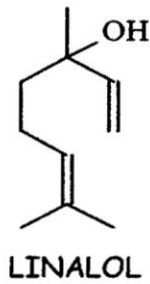


Esclareol

Ref. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica

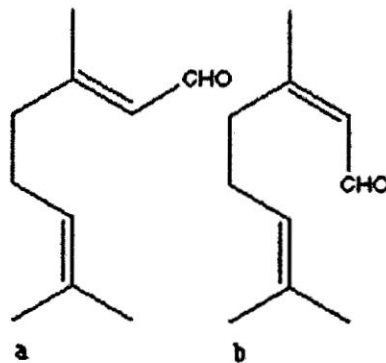
Alcoholes

Los alcoholes llevan el grupo hidroxilo (- OH) unido al esqueleto C10. Se denominan terminados en (- ol). Son muy apreciados por su aroma. Por ejemplo, el linalol, que tiene dos formas, el R-linalol se encuentra en la rosa y la lavanda y es el componente mayoritario de la *Mentha arvensis*. La forma S-linalol en el aceite de lavanda con un contenido > 5% indica adulteración. El linalol le da el sabor a las hojas de té, el tomillo y el cardamomo. Otro compuesto de este grupo, el mentol, es uno de los responsables del sabor y el olor de la menta, cuya esencia puede tener hasta un 50% de este componente. También el geraniol, del geranio de olor (*Pelargonium* spp), el citronelol de la rosa (*Rosa gallica*), en borneol del romero, y el santalol del sándalo (*Santalum album*, F. Santalaceae).³⁴



Aldehídos

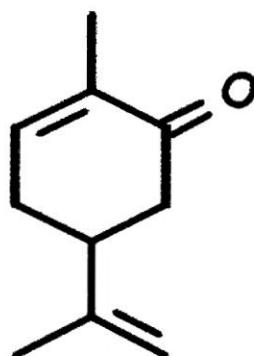
Los aldehídos son compuestos muy reactivos. Se nombran acabados en (-al). Muchos de ellos, por ejemplo los encontrados en los cítricos, se corresponden con su respectivo alcohol, por ejemplo, geraniol – geranial o citronelol – citronelal. Son abundantes en los cítricos, responsables del olor característico, principalmente los isómeros geranial (α citral) y neral (β citral) juntos conocidos como citral (en la figura). Este compuesto, además de su aroma característico, tiene propiedades antivirales, antimicrobianas y sedantes. Pero muchos de ellos, incluido el citral, son irritantes para la piel por lo que no se puede hacer uso tópico de ellos. Otro grupo importante son los aldehídos aromáticos, como el benzaldehído, componente principal del aceite de almendras amargas y responsable de su aroma característico.³⁴



Cetonas

Se producen por la oxidación de alcoholes y son moléculas bastante estables. Terminan en -ona. La carvona está presente en la *Mentha spicata*. La tuyona (aislada por primera vez en la Tuya, *Thuja occidentalis*, F. Cupressaceae) y pulegona son bastante tóxicas y nunca deben usarse en el embarazo. La tuyona se encuentra en plantas como el género *Artemisia* (*Artemisia absinthium*, con la

cual se hace el vermouth y la absenta), y en la salvia (*S. officinalis*). La pulegona se aisló por primera vez en el poleo (*Mentha pulegium*).³⁴



carvona

2.4. Actividad Antibacteriana:

A pesar del desarrollo de antibióticos, las infecciones bacterianas aun constituyen un mayor problema en medicina, y la presencia de numerosas cepas resistentes suponen un nuevo reto. La medicina natural ha sido utilizada en este campo de manera extensa durante siglos; y recientemente un creciente interés en los productos naturales se ha estado dando y ello debido a su disponibilidad, menores efectos adversos o toxicidad así como una mejor biodegradabilidad en comparación con la disponibilidad de antibióticos y preservantes. De esta manera, los aceites esenciales de algunas plantas ofrecen un gran potencial y esperanza terapéutica.³⁵

Generalmente los aceites esenciales poseen evidentes propiedades antimicrobianas, sin embargo, su mecanismo de acción aún no está definido, esto debido a su complejidad, aunque se reconoce que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales depende de su carácter hidrofílico o lipofílico. Los terpenoides sirven como un ejemplo de agentes liposolubles que afectan la actividad de las enzimas catalizadoras de membrana, por ejemplo su acción en la respiración microbiana. Teniendo en cuenta la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos en distintas zonas de la célula.

Ciertos componentes de los aceites esenciales pueden actuar como "desacopladores", que interfieren con la translocación del protón sobre la

membrana de una vesícula y subsecuentemente interrumpen la fosforilación del ADP (metabolismo de energía primario). Los terpenoides específicos con grupos funcionales, como alcoholes fenólicos o aldehídos, también interfieren en las proteínas enzimáticas integradas a la membrana o asociadas a ella, deteniendo su producción o actividad.^{35,36}

Los aceites esenciales son en general ligeramente más activos frente a bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas. Esto puede deberse a la estructura de la pared celular y la composición de la membrana externa de las bacterias y su interacción con los aceites esenciales, de naturaleza lipofílica. En el caso de las bacterias Gram negativas sensibles, así como de las Gram positivas, los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables, y como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular bacteriana.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre, así como en aquellos presentes en los alimentos, bien por su implicación en infecciones alimentarias tóxicas, o por su capacidad para alterar las propiedades de los alimentos.³⁶

Se ha reportado que la estructura de la pared celular y la membrana externa de los microorganismos determinan el modo de acción de los agente antimicrobianos; por ejemplo las bacterias Gram negativas, como la *P. aeruginosa*, muestran una resistencia intrínseca a una amplia variedad de aceites esenciales, lo cual está asociado con la superficie hidrofílica de su membrana externa, rica en moléculas de lipopolisacáridos. Pequeñas moléculas hidrofílicas no son prevenidas de pasar a través de la membrana externa debido a una acción de las proteínas llamadas porinas. Sin embargo, las macromoléculas hidrofóbicas, como los constituyentes de los aceites esenciales, son incapaces de penetrar la barrera. Se reportó que la efectividad de los agentes antibacterianos aumenta generalmente con sus propiedades lipofílicas como resultado de la acción en las membranas bacterianas. Por otro lado, los aceites esenciales usualmente expresan una menor solubilidad acuosa, lo cual previene a las bacterias de alcanzar niveles tóxicos en las citomembranas. Algunos componentes de los aceites que son de naturaleza fenólica, como el

carvacrol y el timol, provocan una interrupción de la capa externa de lipopolisacáridos seguida de una desintegración parcial de la membrana externa. Algunos aceites, como el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* usado contra *E. coli*, actúan como desinfectantes activos provocando la desnaturalización de las proteínas de la membrana bacteriana, produciendo una interrupción en la membrana externa, con consecuente pérdida de iones potasio (K⁺), inhibición de la respiración y lisis celular. El efecto de la acción del aceite puede ser observado en el microscopio como una coagulación en el citoplasma y ruptura de la pared celular.³⁵

En resumen los componentes del aceite esencial destruyen la pared celular y la membrana citoplasmática de las bacterias y hongos, produciendo un escape de citoplasma y su coagulación. Los signos visibles de la acción del aceite contra los hongos puede observarse por los cambios morfológicos en sus colonias tanto microscópicamente como a simple vista. Por ejemplo, eugenol y carvacrol causan cambios morfológicos en los mohos como el *Cladosporium herbarum* que al ser tratados con los componentes mencionados, daña y vuelve frágil al micelio del hongo: se observan un aumento en la ruptura de hifas, variación en su diámetro y disminución del número de conidias. Las deformaciones morfológicas podrían estar relacionadas a la acción del eugenol y carvacrol sobre algunas enzimas de la pared celular tales como las quitinasas y las glucanasas.

La velocidad de crecimiento de las bacterias Gram positivas como *S. aureus* disminuye aun a concentraciones bajas del sesquiterpeno τ -cadinol, probablemente debido a una interacción con el metabolismo de energía primaria. A una alta concentración (50ug/mL) provoca la desintegración de la envoltura celular del *S. aureus* y una pérdida del citoplasma. En algunos hongos y otras bacterias Gram positivas, que son sensibles al Imidazol y cuyas membranas celulares son ricas en ácidos grasos insaturados, un reordenamiento de los constituyentes de la membrana provoca una pérdida de la viabilidad celular y eventualmente lisis. Por otra parte los aceites esenciales también inhiben la síntesis de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos en las células bacterianas y fúngicas.³⁵

Generalmente, los aceites esenciales que poseen notables propiedades antimicrobianas, contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el carvacrol, el timol y el eugenol. Así mismo se ha reportado que derivados

fenólicos tales como carvacrol y eugenol provenientes del clavo de olor y tomillo causan la desintegración de la membrana de *E. coli* y *S. typhimurium*. El eugenol, (componente mayoritario del aceite de clavo de olor), y el cinamaldehído (componente de la canela) actúan inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular. En otros estudios se demostró la actividad de aceites esenciales contra Salmonella, con lo que luego se dedujo que los aceites esenciales con actividad fueron los de canela, clavo de olor, orégano y tomillo.³⁶ Así tenemos:

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	PARTE	COMPONENTE
<i>Cinammon</i>	CANELA	HOJAS	CINAMALDEHIDO
<i>Origanum vulgare</i>	OREGANO	HOJAS	CARVACROL
<i>Syzygium aromaticum</i>	CLAVO	CORTEZA/HOJA	EUGENOL
<i>Thymus vulgaris</i>	TOMILLO	FLOR/ HOJA	TIMOL
<i>Eucalyptus globulus</i>	EUCALIPTO	HOJA	CINEOL

2.5. Actividad antioxidante:

2.5.1. Radicales Libres (RL):

Se consideran Radicales Libres a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química desapareada a diferencia de la normal tendencia de los electrones localizados en los átomos y moléculas que forman pares. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos con una gran diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos.³⁷

El oxígeno molecular, vital para la existencia de los organismos aerobios, es inherentemente tóxico. Esta paradoja deriva de la misma naturaleza química del oxígeno. El lado perjudicial del oxígeno se relaciona directamente con el hecho de que cada átomo de oxígeno posee un electrón desapareado en su orbital externo y la molécula de oxígeno posee dos electrones desapareados en dos orbitales distintos, de manera que el átomo de oxígeno es un radical libre y la molécula de oxígeno un doble radical libre. La reducción tetravalente concertada

del oxígeno por la cadena de transporte electrónica mitocondrial para producir agua, se considera un proceso relativamente seguro; sin embargo, el ambiente reducido del medio intracelular proporciona amplias oportunidades para que el oxígeno sufra la reducción univalente que es la causante de la generación de los intermediarios reactivos. El radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son los subproductos de esta reducción univalente, denominados especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) y responsables de la toxicidad del oxígeno.³⁸

En el año 2000 el investigador Bello, establece que el peligro más importante que acecha a una célula proviene de las moléculas oxidantes, entre las que destacan los radicales libres, los cuales son generados por diversos factores intrínsecos, como las actividades de algunas enzimas (oxidasas, deshidrogenadas y peroxidasas) o la autooxidación de los lípidos; y por fuentes externas, tales como los disolventes orgánicos, el humo del tabaco, los pesticidas, algunos polucionantes (ozono), radiaciones, etc. Como resultante de todo ello, aparecen radicales de diversa naturaleza (alcoil, hidroxil, hipoclorito, oxígeno singlete, peroxil, superóxido y peróxido de hidrógeno). Los radicales libres suelen ser extraordinariamente dañinos para los sistemas biológicos y, desde luego, significan un peligro para una gran variedad de moléculas: ácidos nucleicos, enzimas que contienen iones metálicos de transición, proteínas que incluyen grupos SH, lípidos de membranas, etc. Se sospecha que los radicales libres y otras moléculas oxidativas están implicadas en la patología de numerosas situaciones clínicas: aterosclerosis, cáncer, cataratas, diabetes, etc. Incluso mucho de los desórdenes degenerativos se relacionan con el desequilibrio entre las fuerzas oxidantes y reductoras que pueden desembocar en modificaciones oxidativas de las proteínas y otros compuestos esenciales.³⁹

2.5.2. Antioxidante:

El investigador Halliwell define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al colisionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que

a su vez reaccionan con los RL. Los antioxidantes se clasifican en: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria, y endógenos que son sintetizados por la célula; además de los antioxidantes artificiales. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios.

ANTIOXIDANTES	RADICALES LIBRES
EXOGENOS	VITAMINA E, VITAMINA C, BETACAROTENO Y FLAVONOIDES
ENDOGENOS	GLUTATION, COENZIMA Q, ACIDO TIOCTICO
ARTIFICIALES	DERIVADOS DEL AC. GALICO Y FENOLICO: BUTILHIDROXI-ANISOL Y BUTIL-HIDROXI-TOLUENO

Ref. Hernandez RM, Sastre GA. *Tratado de nutrición*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1999

Según el científico Hernández, los antioxidantes son sustancias que aisladamente o mezcladas entre sí, son utilizadas en alimentos y bebidas con el objetivo de retardar o evitar las oxidaciones catalíticas; enranciamientos naturales producidos por la acción del aire, luz y trazas metálicas; también utilizados para conservar el alimento retrasando el deterioro, el cual produce decoloración y rancidez, esto debido a la oxidación.⁴⁰

Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- Deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas.
- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto.
- Eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre y el hierro, que facilitan la oxidación.⁴¹

El valor de la actividad antioxidante se expresa en IC50 que representa la media concentración inhibitoria máxima. Es decir la concentración necesaria del antioxidante que se requiere para inhibir el 50% del radical libre.⁴²

2.5.3. Actividad antioxidante de los aceites esenciales

Los aceites esenciales presentan actividad antioxidante probablemente debido a la presencia de compuestos fenólicos como el carvacrol y el timol, esto en plantas aromáticas como *Origanum syriacum L.* y *Origanum vulgare L.* cuya actividad ya fue comprobada.^{43,44}

En algunos frutos cítricos, la actividad antioxidante puede atribuirse a la presencia de β -pineno, α -pineno, limoneno, α -terpineno y α -terpinoleno. ⁴⁵

Las flores de algunas plantas ornamentales procedentes de la tribu Anthemidae (perteneciente a la familia Asteraceae) poseen aceites esenciales con actividad antioxidante como *Dendranthema grandiflora*, *Chrysanthemum morifolium* y *Tanacetum spp*; atribuido a la presencia de sesquiterpenos y monoterpenos, de compuestos como camfor, pinocamfona, tuyona, 1,8-cineol y pulegona. ⁴⁶

La captación de radicales DPPH y OH por el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Blume* es atribuida a la capacidad de donar hidrógeno del Eugenol (compuesto de naturaleza fenólica), presente en concentraciones significativas; demostrando una mayor actividad el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Blume* que el Eugenol, ya que presenta un nivel de IC50 más bajo que el anterior. ⁴⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del estudio

La extracción por el método de destilación por arrastre con vapor de agua del aceite esencial de "*Tagetes filifolia*" (anís del campo), se desarrolló en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). El estudio de la determinación antibacteriana se realizó en el Centro de Investigaciones BIOLAB. El análisis de la actividad antioxidante se realizó en el Centro de Producción Farmacéutica (CENPROFARMA) de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

3.2 Muestra

3.2.2. Muestra estudiada

La planta en estudio, *Tagetes filifolia*, fue recolectada en el poblado Monterrey a orillas del río Santa, en la provincia de Huaraz, Región Ancash a 2700 m.s.n.m. Posteriormente las hojas fueron separadas del tallo y de las inflorescencias, luego fueron pesadas en una balanza común para luego continuar con la extracción del aceite esencial por el método de arrastre con vapor de agua. Paralelamente, una muestra de la planta fue llevada al Museo de Historia Natural para su identificación taxonómica.

3.3. Tipo y diseño

TIPO

Experimental

DISEÑO

Cuasi y pre experimental

3.4. Procedimiento

3.4.1. Extracción del aceite esencial

Para la extracción del aceite esencial se aplicó el método por arrastre con vapor de agua. Se utilizó 5,750 kg de *Tagetes filifolia*, colocándose aproximadamente 1,5 kg de hojas y tallos de *Tagetes filifolia* en la tolva del destilador, se procedió a llenar con agua el balón destilador; previa instalación del conducto refrigerante, haciendo circular el agua a través del mismo. Luego se llevó a calentamiento hasta desprendimiento de un líquido inmiscible conteniendo vapor de agua condensada y el aceite esencial, siendo recolectados en un embudo, para posteriormente decantar el aceite esencial.

Luego se procedió a eliminar todo rastro de agua con sulfato de sodio anhidro, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4°C.

3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana

Método experimental: El método que se usará es el de difusión en agar a través de la medición de los halos de inhibición para determinación de la actividad antimicrobiana de *Tagetes filifolia*.

Método de Difusión en Agar (Actividad Antibacteriana):

En esta prueba se enfrenta la bacteria integrada previamente en el medio de crecimiento sólido Agar Mueller Hinton respectivamente versus una muestra de aceite esencial de *Tagetes filifolia*, la cual se expresa en la presencia de un halo de inhibición producto de la difusión del antibiótico en el medio sólido; halo que corresponde a la cantidad o concentración del antibiótico.^{4,50}

Se utilizó como material biológico cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC

25923), y la determinación antibacteriana se realizó en las instalaciones de la Unidad de Análisis Clínicos del Centro de Investigaciones Biocientífica.

Procedimiento:

Preparación del inóculo: Se trabajó con los siguientes microorganismos:

Bacterias

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923)

Los cultivos bacterianos fueron reactivados por medio de incubación en Agar Tripticasa Soya. Se prepararon los respectivos inóculos primero tomando con un asa de Kohle, y en condiciones asépticas, una “asada” de las colonias de los microorganismos reactivados para obtener suspensión en 5 ml de Solución Salina estéril al 0.9%, ajustándose la turbidez al tubo 0.5 de la escala de McFarland ($1 - 1.5 \times 10^8$ UFC/ml).

Preparación de las muestras: Se prepararon las muestras en concentraciones de 100%, 50% y 10% con el aceite esencial de *Tagetes filifolia*, más el alcohol etílico absoluto como solvente, tal como se muestra en la siguiente tabla:

	Muestras		
	100%	50%	10%
Aceite esencial	100 µL	50 µL	10 µL
Etanol absoluto	-	50 µL	90 µL
Total	100 µL	100 µL	100 µL

Preparación de las placas:

Para ello se reconstituyó el Agar Mueller Hinton con agua destilada, luego se llevó a autoclavado, se enfrió entre 45° - 50°C; y se procedió a incorporar 0.2 ml del inóculo de la cepa bacteriana junto con 20 ml de Agar Mueller Hinton, se agitó para homogenizar y posteriormente se procedió a repartir en cada placa Petri 20 ml de Agar Mueller Hinton conteniendo un tipo de cepa bacteriana, para 5 placas bajo la siguiente distribución:

Muestra			Control negativo	Control Positivo
Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5
100%	50%	10%	Etanol	Antibióticos

Luego se dejó enfriar las placas para proceder a rotularlas para su posterior evaluación; y con ayuda de un sacabocado estéril de 10 mm se hizo los pozos en el centro de la placa, los sobrantes se retiraron con el asa de Kohle.

Incorporación de la muestra e Incubación del Inóculo

1. Se colocó 0.1 ml de muestra de concentraciones de 100%, 50% y 10% en tres placas respectivamente,
2. En el control negativo se colocó 0.1 ml de alcohol absoluto;
3. En el de control positivo, para las bacterias se utilizaron discos de Ciprofloxacino, Cloramfenicol y Ceftriaxona, diluidas en Dimetilsulfóxido (DMSO). Luego se dejó en reposo por una hora, esto con la intención de permitir una mejor difusión de la muestra en el agar; después se llevó a incubación por 24 horas a 37°C. Las pruebas se realizaron por triplicado.
4. Para demostrar repetibilidad, se realizará el análisis por triplicado realizando la medida de los halos y considerando la media de los resultados.
5. El diámetro de cada halo de inhibición se medirá usando una regla milimetrada (+/- 0,5 mm). Siendo estas registradas mediante una cámara digital Lumix a 8.2 Megapixels.

Lectura de los resultados:

Luego de la incubación, se observó la presencia de halos de inhibición de crecimiento, y se procedió a tomar la medida del diámetro de estos en milímetros. Las placas que presentaron actividad antibiótica significativa (definida como una zona clara perfecta con un diámetro mayor a 18 mm).

El cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, se realizará de la siguiente manera:

% efecto de inhibición =	$\frac{\text{Promedio de diámetros de halos de inhibición del extracto.}}{\text{Promedio de diámetros de halos de inhibición del control positivo}} \times 100$
--------------------------	---

Los datos se presentarán como valores promedios \pm desviación estándar de las determinaciones por triplicado

3.6. Determinación de la actividad antioxidante

Método experimental: El método que se usó es de captación del radical libre difenil picril hidrazilo (DPPH):

Fundamento: Se basa en la reducción del radical libre estable 2,2 – difenil picril hidrazilo, mediante la captación de un átomo de Hidrógeno que dona el antioxidante (sustancia atrapadora de radicales libres). Se cuantifica midiendo la reducción de la medida de la absorbancia a 517 nm. ^{48,49}

Procedimiento:

Se preparó una solución metanólica de aceite esencial de *Tagetes filifolia* a una concentración de 50%, del cual se preparan 25ml de otras soluciones de 10% y 1% para ser leídas por triplicado

Preparación de las muestras para la prueba de Captación del radical libre difenil picril hidrazilo (DPPH)

Tubos	50%	10%	1%	Patrón
<i>Muestra Problema</i>	0,2ml	0,2ml	0,2ml	-
<i>Metanol</i>	-	-	-	0,2ml
<i>DPPH 20mg/mL</i>	0,8ml	0,8ml	0,8ml	0,8ml
<i>Total</i>	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
<i>Blanco muestra</i>	en lugar de la muestra , agregar 0,2 mL de metanol	en lugar de la muestra , agregar 0,2 mL de metanol	en lugar de la muestra , agregar 0,2 mL de metanol	

La solución de DPPH (2,2 –difenil picril hidrazilo) se preparó en metanol. Se usó como control antioxidante una solución de vitamina C.

3.7 Análisis de datos

Los resultados se expresarán en tablas y figuras. La diferencia significativa que existe entre los tratamientos serán evaluados a través de la estadística descriptiva y en el caso de pruebas inferenciales con un nivel de significancia estadística de 0,05. mediante el programa SPSS versión 17.

IV. RESULTADOS

Tabla 1: Propiedades físico químicas del aceite esencial de *Tagetes filifolia*

Características organolépticas:	Resultado
Olor	Sui generis persistente
Color	Amarillo
Sabor	Dulce persistente
Aspecto general	Líquido transparente
Propiedades físico-químicas:	Resultado
Densidad relativa	0,97%
Índice de Refracción	
Rotación Específica	
Índice de Acidez	
Ensayo fitoquímico	Resultado
Shinoda (flavonoides)	++++
FeCl₃ (fenoles)	++++
Prueba de espuma (saponinas)	++
Dragendorff (alcaloides)	-
Borntrager (antraquinonas)	++

Tabla 2: Actividad antioxidante encontrada en las muestras del aceite esencial de *Tagetes filifolia* mediante espectrofotometría por el método de DPPH.

Pruebas de Actividad Antioxidante a:	Resultado
50 ppm	0.87%
150 ppm	0%
300 ppm	0%
1%	32,16%
10%	58,67%
50%	80,89%

(ppm: partes por millón)

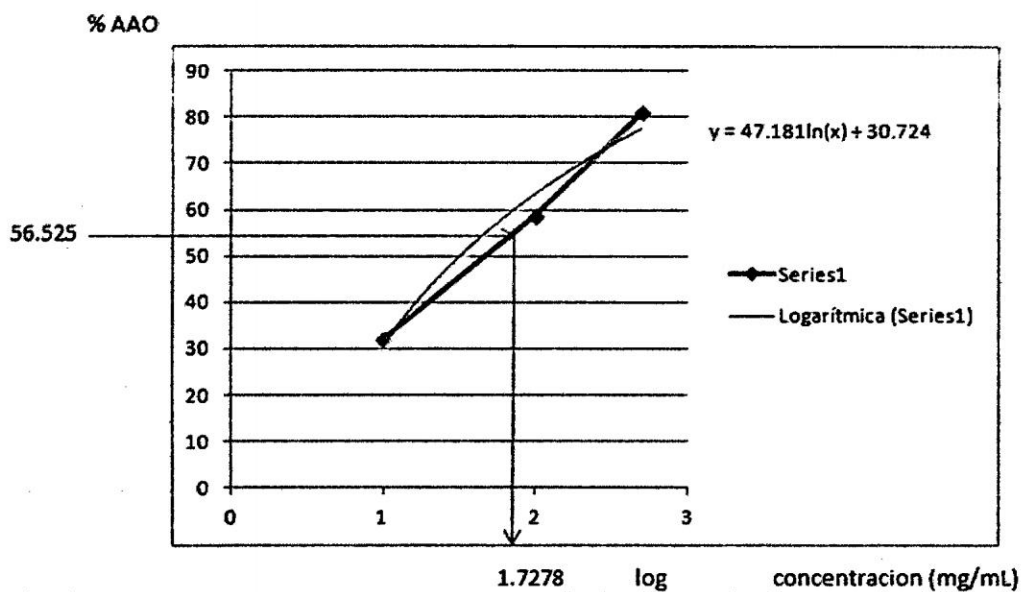


Figura N° 01. Actividad antioxidante encontrada en las muestras del aceite esencial de *Tagetes filifolia* mediante espectrofotometría por el método de DPPH.

Tabla N° 03: Halos de Inhibición de tres antibióticos frente a bacterias indicadoras. Ayacucho 2014

ANTIBIOTICO (ug/ml)	HALOS DE INHIBICION DE BACTERIAS INDICADORAS (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25933)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25923)
Ceftriaxona (30 ug)	26	32	20
Cloranfenicol (30 µg)	21	25	14
Ciprofloxacino(5 µg)	26	35	28
<i>Tagetes filifolia</i> (160 ug/ml)	16	12	9

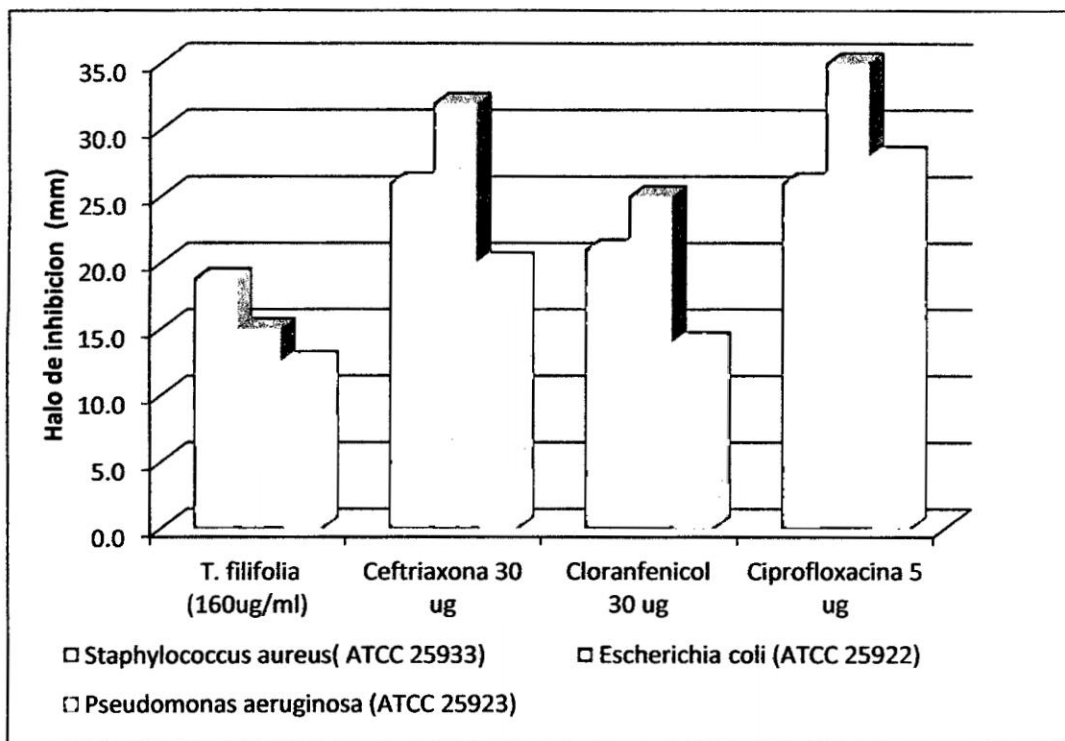


Figura N° 02: Gráfico comparativo de los halos de inhibición del aceite esencial de la hoja y tallo de *Tagetes filifolia* “anis del campo” (160ug/ml) frente a antibióticos (Ceftriaxona 30 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Cloranfenicol 30 µg), Ayacucho 2014

Tabla N° 04: Diámetro promedio de los halos de inhibición de ocho concentraciones crecientes de aceite esencial de la hoja y tallo de *Tagetes filifolia* “anís del campo”, Ayacucho 2014

CONCENTRACIÓN EXTRACTO (ug/ml)	HALOS DE INHIBICION DE BACTERIAS INDICADORAS		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25933)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25923)
160	18.83	15.03	12.57
80	18.33	14.20	12.33
40	18.00	14.03	11.67
20	18.00	13.77	11.23
10	15.77	13.47	10.27
5	15.07	13.03	10.00
2.5	14.00	12.20	8.25
1.25	13.20	11.70	8.25

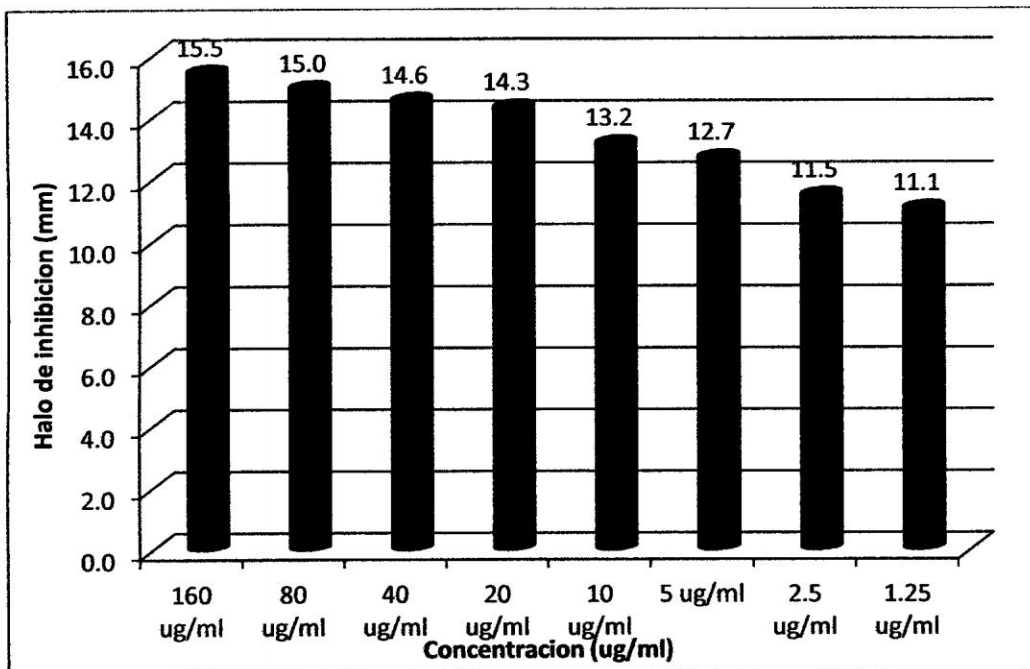


Figura N° 03 Representación de la actividad antibacteriana frente a bacterias indicadoras en ocho concentraciones crecientes de aceite esencial de la hoja y tallo de *Tagetes filifolia* “anís del campo”, Ayacucho 2014

V. DISCUSION

Los aceites esenciales de las plantas, químicamente son líquidos aromáticos, que contienen lectinas, polipéptidos, alcaloides, fenoles, quininas, flavonas, flavonoides, terpenos, taninos y cumarinas; con una variada actividad antioxidante y anticancerígena demostrada en diversas investigaciones experimentales realizadas a nivel internacional, nacional y local.

Los resultados de la investigación nos indica en la Tabla N° 01 la presencia de actividad antioxidante de 32.16%, 58.67%, 80.89% a concentraciones de 1%, 10% y 50% respectivamente; frente a un 78% de actividad antioxidante de la Vitamina C (utilizada como control); por lo que a concentraciones de 50% se tiene una actividad antioxidante superior a la Vitamina C utilizada como control. De los resultados presentados y a la elaboración de una curva logarítmica se obtiene un IC₅₀ (concentración que provoca la captación del 50% de radicales DPPH) a una concentración de 53.43 %

Los resultados obtenidos parecen ser superiores a otros realizados como el que evalúa la actividad antioxidante del aceite esencial de las flores de *Tagetes erecta*, mediante el DPPH, encontrándose un efecto scavenger de 64.3 +/- 2.6 %, 69.2 +/- 4.1 % y 71.5 +/- 0.7 % para concentraciones de 25, 50 y 100 mg/ml respectivamente ⁵¹. En la misma línea otro estudio determinó la actividad antioxidante del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho", mediante el método de DPPH, obteniendo un IC₅₀ para una concentración de 975 ug/ml,

y 54.8% de capacidad de captación del radical DPPH a 1248 µg/ml; inferior a los obtenidos con el control de Trolox que dio un IC50 de 975 µg/mL, y 54.8% de capacidad de captación del radical DPPH a 1248 µg/mL ⁵² por su parte el aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta*, demostró en el ensayo de captación de radicales de DPPH una potente actividad antirradical con un valor IC50 de 36 ug/ml ⁵³.

Otros estudios relacionados a actividad antioxidante del género *Tagetes*; nos reflejan que en el caso del extracto metanólico de *Tagetes patula*, utilizando el método del DPPH se obtuvo un IC50 de 41+/- 0.8 mg/ml ⁵⁴. Para el caso de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de *Tagetes erecta*, con el método del DPPH, los resultados indicaron valores de 1.04±0.01 mmol de Equivalente Trolox / gramo cuando se utilizó como solvente el etanol puro; en relación a 0.14±0.00 mmol de Equivalente Trolox / gramo cuando se utilizó de solvente el agua; resultante de cambios significativos en el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides totales; los que aumentaron en primer lugar y luego disminuyeron con la elevación de la concentración de EtOH; por lo que el rendimiento de la actividad antioxidante de los extractos son fuertemente dependientes del tipo de disolventes, y donde la actividad antioxidante guarda una estrecha relación con los contenidos de fenoles y flavonoides como la galicina, quercetagetina, patuletina y quercetina que fueron los compuestos antioxidantes dominantes en los extractos, y donde la quercetagetina fue identificado con la capacidad antioxidante más fuerte ⁵⁵.

Por otro lado estudios realizados para demostrar la actividad antioxidante de aceites vegetales de otros géneros de plantas utilizando el método DPPH nos indica para el *Origanum syriacum*, un 17.12+1.21% de capacidad de captación del radical DPPH a 500 ug/mL ⁵⁶ ; un IC50: 0.245 µg/ml, y % 94.42% de capacidad de captación del radical DPPH a 8.0 µg/mL para el *Cinnamomun zeylanicum blume* (canela) ⁵⁷ ; un valor de IC50 de 43.35 µg/mL para *Luma chequen* (Molina) ⁵⁸ ; un valor de IC50 de 13 µg/mL para *Jungia paniculata* DC Gray "Matico serrano" ⁵⁹ ; y finalmente un IC50 de 13.13 ± 2.78 ug/mL para *Teucrium marum* (Lamiaceae) ⁶⁰.

No existe precisión exacta respecto del metabolito responsable del efecto antioxidante, aunque una investigación demostró para el caso del *Tagetes erecta* que podría ser debido a la presencia de alcanfor y el metileugenol, ambos utilizados como agente aromatizantes ⁶¹.

Los aceites esenciales de las plantas, químicamente son líquidos aromáticos, que contienen lectinas, polipéptidos, alcaloides, fenoles, quininas, flavonas, flavonoides, terpenos, taninos y cumarinas; con una variada actividad contra bacterias, hongos, virus, protozoos, helmintos y los insectos; y que ha sido utilizado de manera tradicional en diferentes partes del mundo para diversas infecciones microbianas relacionadas con la piel, fiebre, intestino y tracto respiratorio, causado por bacterias Gram positivas y negativas ⁶²

Estudios similares donde se utilizaron diversos extractos de *Tagetes lucida*, frente a *Staphylococo aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, por el método de discodifusión, utilizando la Kanamicina de 30 ug como control, dieron halos de inhibición de 16.67+/-0.58 mm y 16.67 +/- 0.58 mm para cada uno de ellos respectivamente. No se apreció ninguna reacción al extracto metanólico de *Tagetes lucida*; pero con halos de 15.33+/-0.58 y 15.00 +/-1.00 respectivamente al extracto con ethyl acetato, donde se aisló el 5,7,4'timethoxyflavona como el principal componente con actividad antimicrobiana contra Gram positivos y Gram negativos ⁶³.

Un estudio determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes patula*, frente a *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, que sometido al método de discodifusión se obtuvo halos de inhibición de 22 mm, 17 mm y 12 mm respectivamente, frente a controles positivos de Sulbactam Ampicilina (10ug/10ug) con 35mm, Netilmicina (30 ug) con 23 mm y Cefoperazona (75 ug) con 28 mm para cada uno de ellos. Se determinó que los principales constituyentes fueron piperitone (33.77%) trans-Beta-ocymene (14.83%), terpinoleno (13,87%) y Beta caryophylleno (9,56%) de importante actividad antimicrobiana contra gram positivos y gram negativos ⁶⁴.

Otro estudio determinó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Tagetes terniflora* frente a *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, que sometido al método de disco difusión se obtuvo halos de inhibición de 6 mm, 12 mm y 8 mm respectivamente; frente a control de Cloramfenicol de 100 ug/ml con halos de 9.1mm, 9.2 mm y 10.2 mm para cada uno de ellos ⁶⁵.

Se determinó la actividad antibacteriana de dos flavonoides extraídos de *Tagetes* del NOA como son quercetagetina-7-o-glucósido y quercetagetina-7-o-arbinosil galactósido frente a *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, que sometido al método de discodifusión se obtuvo

halos de inhibición de 8mm, 10mm, 18mm y 4mm, 10mm, 10mm. Se advierte que la actividad antibacteriana encontrada en un flavonol 7-o-glicosilado por primera vez, hacen de quercetagetina 7-o-glu un promisorio agente antimicrobiano a tener en cuenta con buena biodisponibilidad en humanos ⁶⁶.

En el año 2010, un estudio realizado en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho", determinando a una concentración del 10%, halos de inhibición de 25 +/-3 mm, 14.5 +/-0.71 mm, 20.25+5.56 mm para *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente. ⁵²

La actividad antimicrobiana se atribuye a diversas sustancia entre las que podemos mencionar para *Tagetes minuta* al flavonoide quercetagetina-7-arabinosyl galactósido es el más importante componente con actividad antimicrobiana ⁶⁶; ó la dihidrotagetona y el cis-Beta-ocimeno ¹⁴. Para el caso del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith se demostró la actividad antibacteriana al Isocarofileno, Verbenona y α -Pino, ya que los mismos son componentes principales de aceites esenciales que presentan actividad biológica ⁵².

Con los hallazgos presentados podemos mencionar que el aceite esencial del *Tagetes filifolia*, al igual que otros aceites esenciales y otras plantas del género *Tagetes* presentan una reconocida actividad antioxidante y antibacteriana, lo cual también es demostrado en el presente estudio, concordante con otras investigaciones pero con diferencias que se desprenden de las variaciones en la ejecución del método tanto para el DPPH y el método de disco difusión, que no se estandariza para todas las investigaciones, pero que no descartan el valor de los resultados obtenidos que nos induce a seguir investigando estas sustancias en un nivel mayor relacionado a modelos animales que permitan ver sus parámetros farmacocinéticos así como su efectividad clínica según corresponda.

VI. CONCLUSIONES

1. Los parámetros físico químicos del aceite esencial de *Tagetes filifolia* son densidad relativa 0,97% y su rendimiento de 0,8%(P/P).
2. Los principales compuestos fitoquímicos del aceite esencial de *Tagetes filifolia* son flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas y antraquinonas.
3. El aceite esencial de *Tagetes filifolia* presentó actividad antioxidante significativa en comparación a las sustancias de referencia: Vitamina C, el cual presentó una actividad antioxidante de 80,89% para una concentración del 50%, frente al 78% de actividad antioxidante de la Vitamina C (utilizada como control).
4. El aceite esencial de *Tagetes filifolia* presentó actividad antibacteriana frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933), con un halo de inhibición de 16 mm; para *Escherichia coli* (ATCC 25922) con un halo de inhibición de 12 mm y para *Pseudomonas aeruginosa* con un halo de inhibición de 9 mm.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar con el estudio fotoquímico de las especies vegetales nativas de nuestra variada Flora.
2. Continuar el trabajo de investigación del aceite esencial de *Tagetes filifolia*, para la determinación de su composición en diferentes pisos altitudinales y regiones geográficas del país.
3. Continuar la investigación del aceite esencial de *Tagetes filifolia* en otras cepas bacterianas y fúngicas.
4. Determinar la actividad Tóxica del Aceite Esencial de *Tagetes filifolia* in vivo
5. Realizar estudios de estabilidad y aplicativos a preparados galénicos (farmacéuticos) a base del aceite esencial de *Tagetes filifolia*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pulgar V J. Geografía del Perú - Las ocho regiones naturales del Perú. Lima: Editorial Universo.; 1981.
2. Sumaq Perú Travel SAC (Página principal en Internet) Lima; c2007 (citado 15 de febrero del 2009). Wiki Sumaq Perú); http://wiki.sumaqperu.com/es/Parque_Nacional_Huascar%C3%A1n
3. Shiva RC. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales y Ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (tesis doctoral). Barcelona; Universitat Autònoma de Barcelona; 2007
4. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003; 10: 813-829.
5. Martínez J, Sulbarán de Ferrer B, Ojeda de Rodríguez G, Ferrer A, Nava R.
6. Contreras N, Martínez J, Stashenko E. Determinación de la Actividad Antioxidante In Vitro de los Aceites Volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la Peroxidación Lipídica de Aceite. *Scientia et Técnica*. 2006 Mayo; 30: 365-370.
7. Eminagaoglu O, Tepe B, Yumrutas O, Akpulat A, Daferera D, Polissiou M, et al. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and metanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*. 2007; 100: 339–343.
8. Ferreyra, R. Flora del Perú: Dicotiledóneas. Lima; 1986.
9. Murga-Gutiérrez SN. Nemátodos Fitoparásitos asociados al cultivo de *Tagetes erecta* en el distrito Virú, La Libertad, Perú. *Neotrop. helminthol*. 2007;1(1): 15-20
10. Noorizadeh H, Farmany A, Noorizadeh M. Application of GA-PLS and GA-KPLS calculations for the prediction of the retention indices of essential oils. *Quim Nova*. 2011;34(8):1398-1404.
11. Akhtar A, Deshmukh AA, Bhonsle AV, Kshirsagar PM, Kolekar MA. In vitro antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic. *Veterinary World*. 2008;1(9):272-274.

12. Mendoza Meza DL, Manuel Taborda. Composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el ácaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (Acari:Pyroglyphidae). *Biosalud*. 2010;9(2):21-31.
13. Shojaii A, Fard MA. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN Pharmaceutics*. 2012;1-8.
14. Senatore F, Napolitano F. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour Fragr. J*. 2004; 19: 574–578
15. Pineda C, Camiloaga E, Zuñiga S. Actividad Antimicrobiana del extracto de hojas de Chincho (*Tagetes elliptica* L.) contra *Salmonella typhimurium* en cobayos (*Cavia porcellus* L.). *Investigación Valdizana*. 2007; 1 (1): 10-13
16. Tereschuk ML. Actividad biológica de flavonoides de Especies de tagetes más representativas del noroeste argentino (tesis doctoral). Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2005
17. Thorne R, Reveal J. An updated classification of the class Magnoliopsida ("Angiospermae"). 1era edición. The New York Botanical Garden (Nueva York): Enero: NYBG Press; 2007
18. Fuertes Ruiton C. y Mungía Chipana Y. Estudio Comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (kunth) Griseb "Muña" de tres regiones peruanas por Cromatografía de gases y Espectrometría de masas.
19. Turner The Comps of Mexico: A systematic account of the family Astereaceae, vol.6. Tageteae and Athemi deae. *Phytologia memoirs* 10; 1996
20. Villarreal Q. ,J.A. Familia compositae. Tribu Tageteae. Flora del bagío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología A.C. Ptzcuaro, Michoacan. Mexico.85p. 2003
21. Biblioteca digital de la medicina tradicional (visitada el 20 de setiembre 2014) <http://www.medicinatradicionalmexicana.una>
22. Semarnat. *Tagetes lucida* [www.semarnat.gob.mx/pfnm/tagetes lucida.html](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/tagetes_lucida.html) (visitada el 10 de agosto 2014)
23. Cubillo, D.,G. Sanabria y L. Hilje. Evaluación de Repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre *Bemisia*. *Manejo integrado de plagas*, 53: 65-72. 1999
24. Serrato C.M.A Barajas P.J.S y Diaz C.F. *Tagetes filifolia* Lag y *T Lucida* Cav de Oaxaca II Simposio sobre Biodiversidad de Oaxaca. 2007

25. Universidad de Antioquía (página principal en Internet). Medellín; c 2009 (actualizado el 14 de febrero de 2009; citado el 18 de febrero de 2009) Udea Facultad de química farmacéutica (aproximadamente 2 pantallas); <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>. //
26. Ortuño MF. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. España: Aiyana ediciones; 2006.
27. Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra M J, Queraltó Compañó J M. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Segunda edición; Volumen 1. Barcelona: editorial Reverté; 1998.
28. Costa J M. Diccionario de química física. Primera Edición. Barcelona: Ediciones Díaz de Santos; 2005.
29. Seymour RB, Carraher CE. Introducción a la química de los polímeros. Segunda reimpresión 2002. Barcelona: Editorial Reverte; 1996
30. Olsen ED. Métodos ópticos de análisis. Primera Edición. Barcelona: Editorial Reverté; 1990
31. McMurry J. Química Orgánica. Sexta edición. México DF: Thomson Learning; 2005.
32. Millar DD, Sangines MC, Torre Marina M. Química de Alimentos: Manual de Laboratorio. Primera Edición. San José– Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2003.
33. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica. Primera Edición. Buenos Aires – Argentina: Editorial Kier
34. <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>
35. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry. 2003; 10: 813-829.
36. Zekaria D. Los aceites esenciales, una alternativa a los Antimicrobianos.
37. Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cubana Med Milit 2001;30(1):36-44.
38. Cascales Angosto M, Académica Numeraria de las Reales de Farmacia y Doctores. La paradoja de aerobiosis ¿Por qué es tóxico el oxígeno? (Conferencia); 26 de enero del 2005. Real Academia de Ciencias Veterinarias. Disponible en: <http://www.racve.es/actividades/detalle/id/326>
39. Bello J. Ciencia Bromatológica, Principios generales de los alimentos. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S. A.; 2000

40. Hernández RM, Sastre GA. Tratado de nutrición. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1999
41. Cubero N, Monferrer A y Villalta J. Aditivos alimentarios: Colección Tecnología de los Alimentos. Madrid: Mundi-Prensa Libros; 2002
42. Cheng Y, Prusoff WH. "Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction". *Biochem Pharmacol* 1973; 22 (23): 3099–108.
43. Puertas-Mejía M, Hillebrand S. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare L.*) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 16 Apr 2002; 17(5): 380 – 384
44. Mehmet Hakki A, Ahmet M. Screening Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Origanum syriacum L.* Growing in Turkey. *B Biol. Pharm. Bull.* (2003); 26(12): 1725—1729
45. Baik JS, Sang-Suk K. Chemical Composition and Biological activities of Essential Oils Extracted from Korean Endemic Citrus Species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 18(1): 74–79
46. Teixeira da Silva J. Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*. 2004 December; 3 (12): 706-720,
47. Schmidt E, Jirovetz L, Buchbauer G and et al. Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) Leaves from Sri Lanka. *Jeobp*. 2006; 9 (2): 170 – 182
48. Kuskoski EM, Asuero AG y Troncoso AM. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 2005 Oct- Dic; 25(4): 726-732.
49. Ugartondo V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares (Tesis de Doctorado). Barcelona: Universitat de Barcelona; 2009.
50. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de Microbiología. Tercera Edición. Barcelona; Masson S. A.; 2005.
51. Perez RM, Hernandez H, Hernandez S. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Tagetes erecta*. *J. Chil. Chem. Soc.* v.51 n.2 Concepción junio 2006

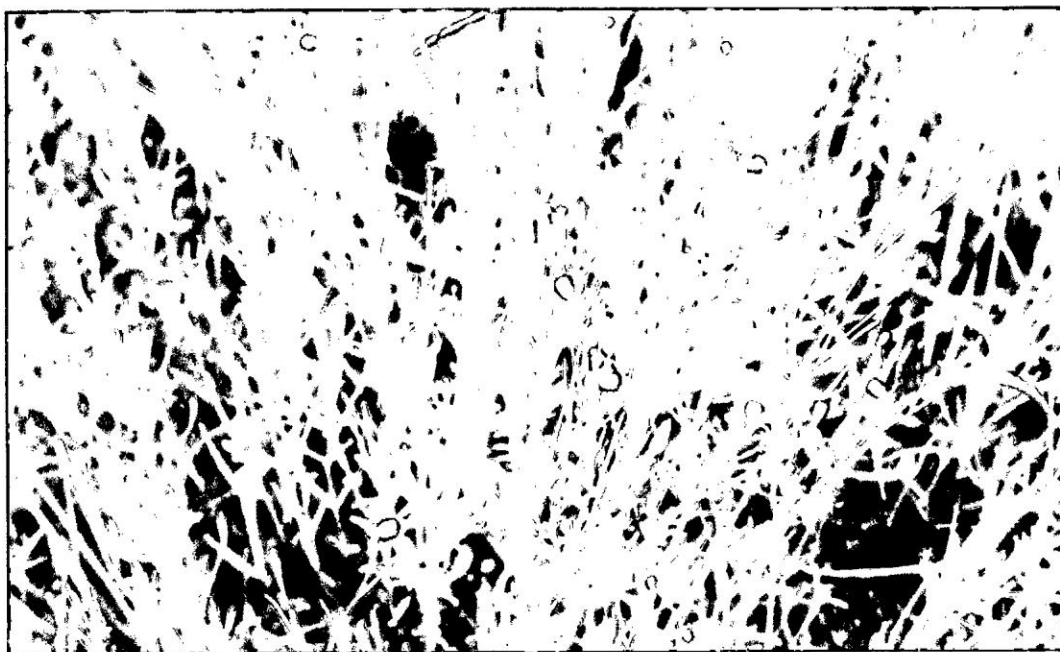
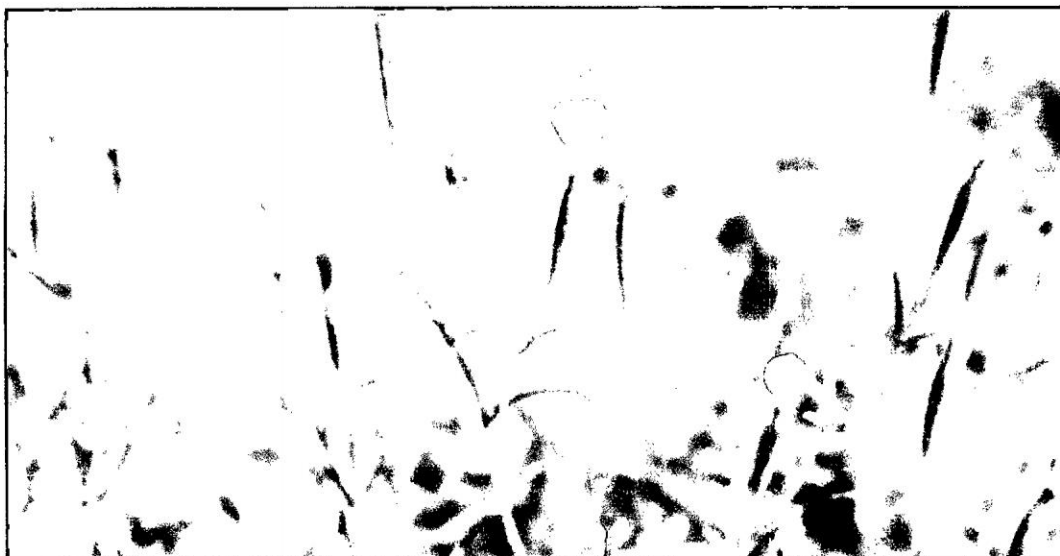
52. Segovia IK, Suárez LL. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho" y determinación de su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Lima 2010
53. Ali NA, Shaporov FS, AL Kaf AG, Hill GM, Arnold N, Al Sakari SS, Setzer WN, Wessjohann L. Compition of essential oil from *Tagetes minuta* and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat Prod Commun* 2014 Feb; 9(2): 265-8
54. Kashif M, Bano S, Naqvi S, Faizi S, Lubna, Ahmed Mesaik M, Azeemi KS, Farooq AD. Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from *Tagetes patula* flower. *Pharm Biol.* 2015 May;53(5):672-81.
55. Gong Y, Liu X, He WH, Xu HG, Yuan F, Gao YX. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia.* 2012 Apr;83(3):481-9.
56. Mehmet Hakki A, Ahmet M. Screening Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. *B Biol. Pharm. Bull.* (2003); 26(12): 1725—1729
57. Schmidt E, Jirovetz L, Buchbauer G and et al. Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) Leaves from Sri Lanka. *Jeobp.* 2006; 9 (2): 170 – 182
58. Carhuapoma YM, Bonilla RP, Suárez CS, et al. Estudio de la Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma Chequen (Molina) "arrayán". *Ciencia e Investigación.* 2005; 8(2): 73-79.
59. Béjar E, Suárez S. Antioxidant and gastroprotective in vitro properties of *Jungia paniculata* DC Gray "Matico serrano". Havana Redox 2007, Abstract Book (64 de 105). 2007 January 25-27. Habana, Cuba.
60. Ricci D, Fraternali D, Giamperi L. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 2005 ; 98 : 195-200.
61. Teixeira J. Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (12), pp. 706-720, December 2004
62. Upadhyay RK. Essential oils: antimicrobial, antihelminthic, antiviral, anticancer and anti insect properties. *J. Appl. Biosci.*, 36(1): 1-22, June, 2010

63. Hernández T, Canales M, Flores C, García A, Durán A, Avila J. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology* 2006, 44 (1): 19-22.
64. Rondon M, Velasco J, Hernández J, Pecheneda M, Rojas J, Morales A, Carmona J, Díaz T. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* collected from the Venezuela andes. *Rev. Latinoamer.Quim*, 34/1-3(2006)
65. Tereschuk ML, Baigori MD, Abdala LR. Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. *Fitoterapia* 74: 404-406 (2003)
66. Tereschuk M, Quarenghi M, Gonzales M, Baigori M. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de Tagertes del Noa. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas* Vol 6 (6): 364-366. 2007

ANEXOS



ANEXO N° 01:

FIGURA N° 04 Fotos de *Tagetes filifolia* "anís del campo"



ANEXO N° 02:

FIGURA N° 05: Constancia de verificación del insumo utilizado para el proyecto de tesis

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

"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 303-USM-2014

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


La muestra vegetal (plata completa) recibida de **Ina HUAILLA QUISPE**, ha sido estudiada y clasificada como: ***Tagetes filifolia* Lag** 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 filifolia* Lag

Nombre vulgar: "anís"
Determinado por Mag. Hamilton Beltran.

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

Fecha, 18 de setiembre de 2014

 *Hydee Montoya Ferreros*
a. **Hydee Montoya Ferreros**
DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)
JEFE

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

Telfs. (511)471-0117, 470-4471,
470-7918, 619-7000 anexo 5703

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

ANEXO N° 03:

FIGURA N° 06: Protocolo de análisis de la actividad antioxidante de *Tagetes filifolia*



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



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00483-CPF-2014

ORDEN DE ANÁLISIS : 002634/2014
SOLICITADO POR : INA HUAILLA QUISPE
DIRECCIÓN : Jr. De Lozada y Puga 194 Dpto 310 San Miguel
MUESTRA : ACEITE ESENCIAL DE TAGETES FILIFOLIA
"ANISILLO"
NÚMERO DE LOTE : -----
CANTIDAD : 01 vial de vidrio
FECHA DE RECEPCIÓN : 15 de Setiembre del 2014

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADO
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A :	-	ESPECTROFOTOMETRÍA (DPPH)	
50ppm	-		0,87%
150 ppm	-		0%
300 ppm	-		0%
1%	-		32,16%
10%	-		58,67%
50%	-		80,89%

Lima, 29 de Setiembre del 2014

Mg. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico

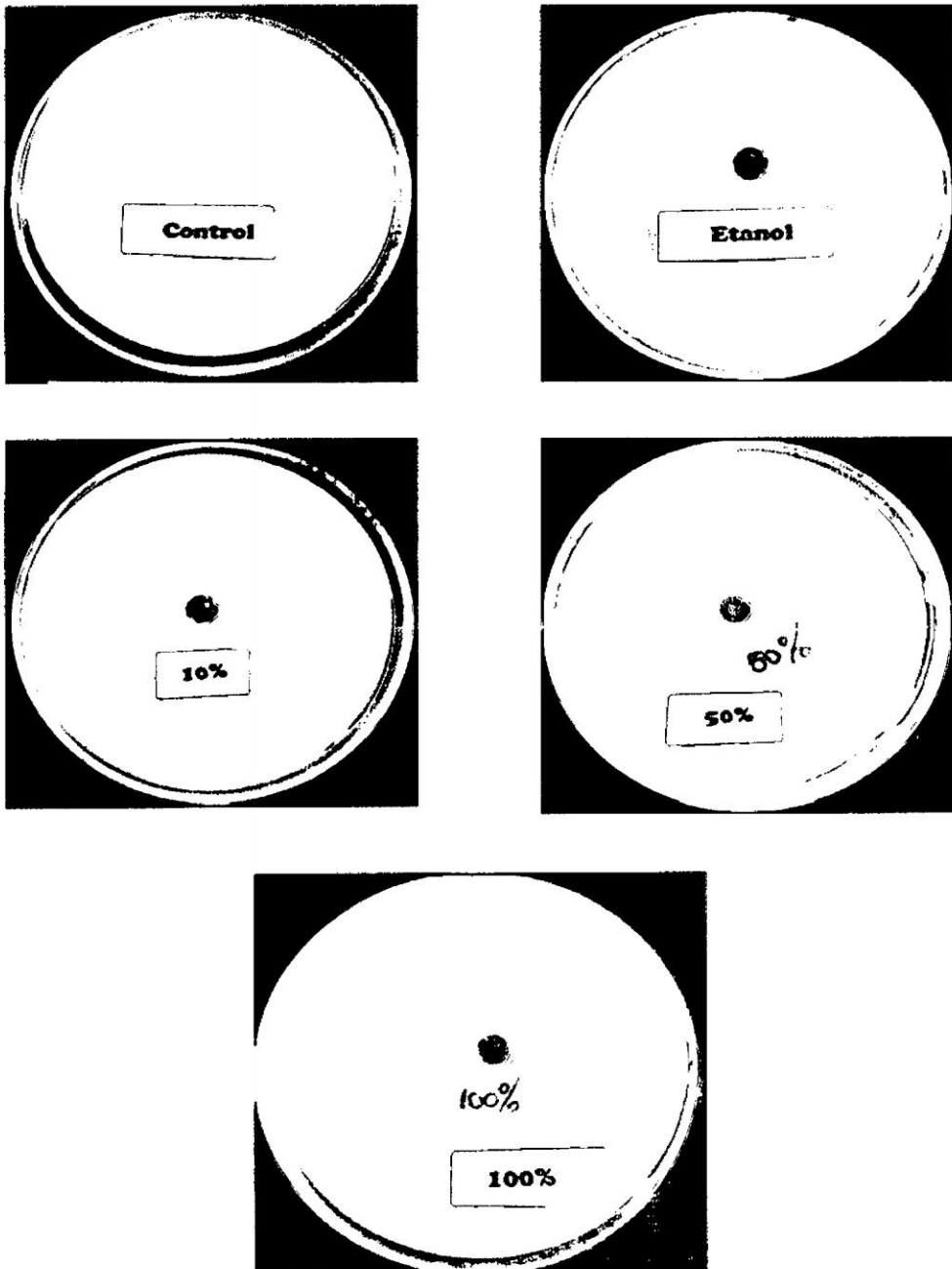


FCCA-009 R

FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO
Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú - Tel: (511) 328-4737 Fax: (511) 328-4737 - Correo: cca@unmsm.edu.pe
E-mail: cca@unmsm.edu.pe

ANEXO N° 04:

FIGURA N° 07: Imágenes del procesamiento de la actividad antimicrobiana del *Tagetes filifolia*



ANEXO N° 05: Matriz de consistencia

Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo", Ayacucho 2014.				
VARIABLES	PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	METODOLOGÍA
<p>Variable independiente Aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentración de 50ug/ml, 100ug/ml y 300ug/ml. • Rendimiento • Densidad absoluta • Índice de refracción <p>Variable dependiente 1 Actividad antioxidante Indicador: % de actividad antioxidante</p> <p>Variable dependiente 2 Actividad antimicrobiana Indicador: % de actividad antimicrobiana.</p>	<p>Problema general</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Tendrá efecto antioxidante y antimicrobiano el aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo"? <p>Problemas específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuáles son las propiedades físicas del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo"? • ¿Cuál es el porcentaje de actividad antioxidante del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" con el DPPH? • ¿Cuál es el % de actividad antimicrobiana del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo"? 	<p>Objetivo general Determinar el efecto antioxidante y antimicrobiano del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo"</p> <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar las propiedades físicas del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" • Determinar la concentración con mayor efecto actividad antioxidante del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" con el DPPH en comparación al ácido cítrico, vit. E (pones cual es tu estándar) • Determinar la lectura promedio del halo de inhibición del aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" 	<p>Hipótesis general El aceite esencial de la semilla de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" tiene actividad antioxidante y antimicrobiana</p> <p>Hipótesis específicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • El aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" con el DPPH tiene un buen porcentaje de actividad antioxidante. • El aceite esencial de la hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" con el DPPH tiene un buen porcentaje de actividad antimicrobiana. 	<p>TIPO Experimental DISEÑO Cuasi y pre experimental POBLACIÓN Plantas de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo". Huaraz, Ancash MUESTRA "x" Kg de hoja y tallo de <i>Tagetes filifolia</i> "anis del campo" TECNICA Observación INSTRUMENTO</p> <ul style="list-style-type: none"> • Guía de recolección de datos • Materiales y reactivos de laboratorio • Equipos: Espectrofotómetro (act. Antioxidante), Incubadora y autoclave (act. Antimicrobiana) <p>PROCEDIMIENTO</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recolección y preparación del material vegetal. • Extracción del aceite vegetal: Método de arrastre de vapor de agua • Determinación de las propiedades físicas • Evaluación de actividad antioxidante: Inhibición de la reacción con el DPPH, IC50, % de captación, % de actividad antirradicalaria, o equivalentes a trolox o vitamina C • Evaluación de la actividad antimicrobiana: Lectura del halo de inhibición <p>PROCESAMIENTO Análisis de varianza, Prueba de Tukey, para p < 0.05. Se utilizará el software SPSS v 17</p>

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA HOJA Y TALLO DE *Tagetes filifolia* "ANÍS DEL CAMPO", AYACUCHO 2014.

Ina Huaila^{1a} ; Johnny Tinco^{1b}

RESUMEN

Objetivo: Determinar algunos parámetros fisicoquímico cualitativamente, así como la actividad antibacteriana y antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Tagetes filifolia* "anis del campo" obtenido de la Provincia de Huaraz, Región Ancash. **Materiales y métodos:** Se realizó la extracción del aceite esencial por el método de arrastre con vapor de agua. La determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar en Agar Mueller Hinton y medición de los halos de inhibición para las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923). La determinación de la actividad antioxidante mediante el método de captación del radical libre difenil picril hidrazilo (DPPH). **Resultados:** Se obtuvo una actividad antioxidante de 80.89% para una concentración del 50%, frente al 78% de actividad antioxidante de la Vitamina C (utilizada como control). La actividad antibacteriana permitió visualizar halos de inhibición de 16 mm, 12 mm y 9 mm para las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente. **Conclusiones:** Se confirma la actividad antibacteriana y antioxidante de *Tagetes filifolia*.

Palabras clave: Actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, *Tagetes filifolia* (fuente: DeCS)

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL LEAF AND STEM OF *Tagetes filifolia* "ANISE FIELD" AYACUCHO 2014.

SUMMARY

Objective: To determine some physicochemical parameters qualitatively as well as antibacterial and antioxidant activity of essential oil from the leaves of *Tagetes filifolia* "field anise" obtained from the Province of Huaraz, Ancash Region. **Materials and methods:** the extraction of essential oil was performed by the method of stripping steam. The determination of antimicrobial activity by agar diffusion method on agar Mueller Hinton and measuring zones of inhibition to the strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923). Antioxidant determining the activity by the method of free radical uptake diphenylpicrylhydrazyl (DPPH). **Results:** The antioxidant activity of 80.89% was obtained at a concentration of 50%, versus 78% of antioxidant activity of vitamin C (used as control). The antibacterial activity allowed visualize zones of inhibition of 16 mm, 12 mm and 9 mm for the strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichiacoliy* *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusions:** Antibacterial and antioxidant activity of *Tagetes filifolia* is confirmed.

KEYWORDS: antioxidant activity, antimicrobial activity, *Tagetes filifolia* (source: MeSH)

¹ Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga

^a Bachiller en Farmacia y Bioquímica

^b Profesor Asociado TC, EFP de Farmacia y Bioquímica

INTRODUCCIÓN

El Perú posee una rica variedad en especies vegetales, debido a las condiciones geográficas favorables, por ejemplo la presencia de la Cordillera de los Andes, la existencia de tres regiones geográficas y la diversidad de pisos ecológicos; conjugando una variada representación vegetal por cada departamento.¹

Con respecto a la región Ancash, entre la flora más representativa tenemos a la Puya Raimondi, y a otras plantas propias de la región como son el ichu, los árboles de quisuar, queñoa, etc; igualmente, se han identificado más de 850 especies de flora, que conforman diferentes asociaciones de humedales, pastizales, matorrales y bosques; destacando entre ellas las especies arbóreas del género *Polylepis*, *Gynoxys*, *Buddleja* y *Alnus*. Destaca también la variedad de orquídeas además, de especies de importancia como recurso genético, entre las que tenemos a *Oxalis* sp. (oca silvestre), *Solanum* sp. (papa silvestre) *Lupinus* sp. (chocho silvestre) etc.² También destaca la flora medicinal, como la Puca maca, la Wila wila, el Anís del campo, etc. Con respecto al anís del campo, es una planta medicinal que se usa como antipirético, antiparasitario, antifúngico y para trastornos digestivos, en forma de polvo, infusión, tintura y jarabe.

Por otro lado la medicina tradicional, en los últimos años ha cobrado importancia como una terapia alternativa al uso de medicamentos sintéticos producidos en la industria farmacéutica, y cabe destacar el uso de variadas plantas medicinales, de cuyas hojas, frutos, tallos y raíz se obtienen metabolitos activos por medio de extractos alcohólicos, acuosos; por destilación o decocción.³

Uno de los componentes activos de dichas plantas medicinales son los aceites esenciales, una compleja mezcla natural de metabolitos secundarios volátiles, aislados de las plantas mediante métodos como: destilación, extracción con solventes, etc. Los principales constituyentes de los aceites esenciales son compuestos químicos conocidos como mono y sesquiterpenos,

incluyendo carbohidratos, éteres, aldehídos y cetonas, los que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de estas plantas medicinales. Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades farmacológicas, demostrando propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. Otras cumplen actividad biocida contra una gran variedad de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas. Además durante mucho tiempo han sido utilizados en el campo de la cosmética, en la elaboración de perfumes, la conservación de alimentos y aromaterapia.^{3, 4, 5, 6, 7}

Gran parte de su uso proviene de su contenido de aceites esenciales, que le brindan el aroma característico. El presente estudio pretende determinar la composición química, la actividad antioxidante y antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes filifolia*; apoyado en hipótesis e investigaciones anteriores realizadas sobre aceites esenciales y su potencial efecto antioxidante y antibacteriano; asimismo brindar información para futuros estudios y aplicaciones de la mencionada especie; y aprovechar así nuestros recursos naturales como alternativa de salud frente a los antibióticos convencionales y a los antioxidantes artificiales, cuyos efectos secundarios han producido diversos problemas en pacientes y consumidores, como resistencia bacteriana, reacciones adversas y predisposición a enfermedades oncológicas.^{8, 9}

Antecedentes

La especie botánica en estudio en el presente trabajo comprende cerca de 60 especies comprendiendo entre ellas a: *Tagetes filifolia*, además de *Tagetes elliptica* Smith, *Tagetes erecta*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pusilla*, *Tagetes lucida*, *Tagetes patula*, y *Tagetes terniflora*, entre las más destacables debido a sus usos como alimentos, condimentos, como materia prima en la extracción de pigmentos, en la medicina tradicional y como antagonista de nemátodos fitoparásitos.^{8, 9}

En diversos estudios realizados usando extractos metanólicos y acuosos de esta

planta se encontró una actividad potente frente a bacterias patógenas y se sugiere considerar su uso como una alternativa para sustituir o complementar antibióticos, especialmente en la alimentación animal. Según referencias el aceite esencial del fruto tiene efectos anticonvulsivos y relajantes, se emplea en el tratamiento de algunas enfermedades como la epilepsia y es utilizado como antiparasitario en veterinaria. Además esta esencia también mostró actividad insecticida y acaricida y presentó efecto antibiótico frente a bacterias y hongos patógenos que afectan al hombre y los animales; sin embargo, su actividad frente a microorganismos fitopatógenos es una actividad menos estudiada, lo que justifica el presente estudio.^{10,11,12,13}

Aspectos botánicos

DIVISION	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: ASTERIDAE
ORDEN	: ASTERALES
FAMILIA	: ASTERACEAE
SUBFAMILIA	: ASTEROIDEAE
TRIBU	: TAGETEAE
GENERO	: <i>Tagetes</i>
ESPECIE	: <i>Tagetes filifolia</i>
NOMBRE VULGAR	: "anís del campo"

Descripción botánica.

Historicamente, el nombre de *Tagetes*, originalmente fue aplicado por el filósofo Apuleus (siglo II), ello en honor al bello Dios etrusco Tages, en alusión a la hermosura de las flores; nombre que posteriormente fue adoptado por Leonhartus Fuchius en su libro "Historia Stirpium" en el siglo XVI.^{16,17}

Esta planta es originaria de Centroamérica. El "anís de campo" habita en climas cálidos, semicálidos y templados, entre los 300 msnm y hasta los 2000 msnm, se desarrolla en los meses de agosto a enero y su altura varía desde 10 hasta 40 cm.^{19,20} Crece de manera silvestre a las orillas de caminos, preferentemente en bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorrales xerófilos, bosques de encino, etc.²¹

Usos medicinales tradicionales

Los nombres comunes con los que se conoce a esta especie son anisillo, hierba anís, anís del campo, flor de Santa María, curucumin, limonsillo, putsutis²² Esta planta posee excelentes propiedades aperitivas, por lo cual es muy recomendado su consumo previo a las comidas en aquellas personas que presenten algún grado elevado de inapetencia. Además debido a su composición presenta propiedades sedantes, por lo cual se emplea para tratar problemas en que se necesite controlar y relajar los nervios, así como también para manejar la ansiedad^{19,23} También se usa como forraje para ganado y como insecticida cuando se quema en fresco, por ejemplo al quemarse su humo ahuyenta a los mosquitos.²⁴

Actividad Antibacteriana:

A pesar del desarrollo de antibióticos, las infecciones bacterianas aun constituyen un mayor problema en medicina, y la presencia de numerosas cepas resistentes suponen un nuevo reto. La medicina natural ha sido utilizada en este campo de manera extensa durante siglos; y recientemente un creciente interés en los productos naturales se ha estado dando y ello debido a su disponibilidad, menores efectos adversos o toxicidad así como una mejor biodegradabilidad en comparación con la disponibilidad de antibióticos y preservantes. De esta manera, los aceites esenciales de algunas plantas ofrecen un gran potencial y esperanza terapéutica.³⁵ Ciertos componentes de los aceites esenciales pueden actuar como "desacopladores", que interfieren con la translocación del protón sobre la membrana de una vesícula y subsecuentemente interrumpen la fosforilación del ADP (metabolismo de energía primario). Los terpenoides específicos con grupos funcionales, como alcoholes fenólicos o aldehídos, también interfieren en las proteínas enzimáticas integradas a la membrana o asociadas a ella, deteniendo su producción o actividad.^{35,36} Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre, así como en aquellos

presentes en los alimentos, bien por su implicación en infecciones alimentarias tóxicas, o por su capacidad para alterar las propiedades de los alimentos.³⁶

Actividad antioxidante:

Se consideran Radicales Libres a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química desapareada a diferencia de la normal tendencia de los electrones localizados en los átomos y moléculas que forman pares. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos con una gran diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos.³⁷ Los aceites esenciales presentan actividad antioxidante probablemente debido a la presencia de compuestos fenólicos como el carvacrol y el timol, esto en plantas aromáticas

METODOLOGÍA

Muestra estudiada

La planta en estudio, *Tagetes filifolia*, fue recolectada en el poblado Monterrey a orillas del río Santa, en la provincia de Huaraz, Región Ancash a 2700 m.s.n.m. Posteriormente las hojas fueron separadas del tallo y de las inflorescencias, luego fueron pesadas en una balanza común para luego continuar con la extracción del aceite esencial por el método de arrastre con vapor de agua. Paralelamente, una muestra de la planta fue llevada al Museo de Historia Natural para su identificación taxonómica.

Tipo de estudio

Experimental, con diseño cuasi y pre experimental

Determinación de la actividad antimicrobiana

El método que se usará es el de difusión en agar a través de la medición de los halos de

como *Origanum syriacum* L. y *Origanum vulgare* L. cuya actividad ya fue comprobada.^{43,44} En algunos frutos cítricos, la actividad antioxidante puede atribuirse a la presencia de β -pineno, α -pineno, limoneno, α -terpineno y α -terpinoleno.⁴⁵

Las flores de algunas plantas ornamentales procedentes de la tribu Anthemidae (perteneciente a la familia Asteraceae) poseen aceites esenciales con actividad antioxidante como *Dendranthema grandiflora*, *Chrysanthemum morifolium* y *Tanacetum spp*; atribuido a la presencia de sesquiterpenos y monoterpenos, de compuestos como camfor, pinocamfona, tuyona, 1,8-cineol y pulegona.⁴⁶ La captación de radicales DPPH y OH por el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume es atribuida a la capacidad de donar hidrógeno del Eugenol (compuesto de naturaleza fenólica), presente en concentraciones significativas; demostrando una mayor actividad el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume que el Eugenol, ya que presenta un nivel de IC50 más bajo que el anterior.⁴⁷

inhibición para determinación de la actividad antimicrobiana de *Tagetes filifolia*. En el método de difusión en agar se enfrenta la bacteria integrada previamente en el medio de crecimiento sólido Agar Mueller Hinton respectivamente versus una muestra de aceite esencial de *Tagetes filifolia*, la cual se expresa en la presencia de un halo de inhibición producto de la difusión del antibiótico en el medio sólido; halo que corresponde a la cantidad o concentración del antibiótico.^{4,50} Se utilizó como material biológico cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923), y la determinación antibacteriana se realizó en las instalaciones de la

Unidad de Análisis Clínicos del Centro de Investigaciones Biocientífica.

En el de control positivo, para las bacterias se utilizaron discos de Ciprofloxacino, Cloramfenicol y Ceftriaxona, diluidas en

Dimetilsulfóxido (DMSO). Luego se dejó en reposo por una hora, esto con la intención de permitir una mejor difusión de la muestra en el agar; después se llevó a incubación por 24 horas a 37°C. Las pruebas se realizaron por triplicado. Para demostrar repetibilidad, se realizará el análisis por triplicado realizando la medida de los halos y considerando la media de los resultados. El diámetro de cada halo de inhibición se medirá usando una regla milimetrada (+/- 0,5 mm). Siendo estas registradas mediante una cámara digital Lumix a 8.2 Megapixels.

Determinación de la actividad antioxidante

RESULTADOS

Los aceites esenciales de las plantas, químicamente son líquidos aromáticos, que contienen lectinas, polipéptidos, alcaloides, fenoles, quininas, flavonas, flavonoides, terpenos, taninos y cumarinas; con una variada actividad antioxidante y anticancerígena demostrada en diversas investigaciones experimentales realizadas a nivel internacional, nacional y local.

Los resultados de la investigación nos indica en la Tabla N° 01 la presencia de actividad antioxidante de 32.16%, 58.67%, 80.89% a concentraciones de 1%, 10% y 50% respectivamente; frente a un 78% de actividad antioxidante de la Vitamina C (utilizada como control); por lo que a concentraciones de 50% se tiene una actividad antioxidante superior a la Vitamina C utilizada como control. De los resultados presentados y a la elaboración de una curva logarítmica se obtiene un IC50 (concentración que provoca la captación del 50% de radicales DPPH) a una concentración de 53.43 %

Los resultados obtenidos parecen ser superiores a otros realizados como el que evalúa la actividad antioxidante del aceite esencial de las flores de *Tagetes erecta*, mediante el DPPH, encontrándose un efecto scavenger de 64.3 +/- 2.6 %, 69.2 +/- 4.1 % y 71.5 +/- 0.7 % para concentraciones de 25, 50 y 100 mg/ml respectivamente⁵¹. En la misma línea otro estudio determinó la actividad

El método que se usó es de captación del radical libre difenil picril hidrazilo (DPPH), que se basa en la reducción del radical libre estable 2,2 – difenil picril hidrazilo, mediante la captación de un átomo de Hidrógeno que dona el antioxidante (sustancia atrapadora de radicales libres). Se cuantifica midiendo la reducción de la medida de la absorbancia a 517 nm.^{48,49} Se preparó una solución metanólica de aceite esencial de *Tagetes filifolia* a una concentración de 50%, del cual se preparan 25ml de otras soluciones de 10% y 1% para ser leídas por triplicado La solución de DPPH (2,2 –difenil picril hidrazilo) se preparó en metanol. Se usó como control antioxidante una solución de vitamina C.

antioxidante del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho", mediante el método de DPPH, obteniendo un IC50% para una concentración de 975 ug/ml, y 54.8% de capacidad de captación del radical DPPH a 1248 µg/ml; inferior a los obtenidos con el control de Trolox que dio un IC50 de 975 µg/mL, y 54.8% de capacidad de captación del radical DPPH a 1248 µg/mL⁵² por su parte el aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta*, demostró en el ensayo de captación de radicales de DPPH una potente actividad antirradical con un valor IC50 de 36 ug/ml⁵³. Otros estudios relacionados a actividad antioxidante del género *Tagetes*; nos reflejan que en el caso del extracto metanólico de *Tagetes patula*, utilizando el método del DPPH se obtuvo un IC50 de 41+/- 0.8 mg/ml⁵⁴. Para el caso de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de *Tagetes erecta*, con el método del DPPH, los resultados indicaron valores de 1.04±0.01 mmol de Equivalente Trolox / gramo cuando se utilizó como solvente el etanol puro; en relación a 0.14±0.00 mmol de Equivalente Trolox / gramo cuando se utilizó de solvente el agua; resultante de cambios significativos en el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides totales; los que aumentaron en primer lugar y luego disminuyeron con la elevación de la concentración de EtOH; por lo que el rendimiento de la actividad antioxidante de los extractos son fuertemente dependientes

del tipo de disolventes, y donde la actividad antioxidante guarda una estrecha relación con los contenidos de fenoles y flavonoides como la galicina, quercetagetina, patuletina y quercetina que fueron los compuestos antioxidantes dominantes en los extractos, y donde la quercetagetina fue identificado con la capacidad antioxidante más fuerte ⁵⁵.

Por otro lado estudios realizados para demostrar la actividad antioxidante de aceites vegetales de otros géneros de plantas utilizando el método DPPH nos indica para el *Origanum syriacum*, un 17.12+1.21% de capacidad de captación del radical DPPH a 500 ug/mL ⁵⁶ ; un IC50: 0.245 µg/ml, y % 94.42% de capacidad de captación del radical DPPH a 8.0 µg/mL para el *Cinnamomun zeylanicum blume* (canela) ⁵⁷ ; un valor de IC50 de 43.35 µg/mL para Luma chequen (Molina) ⁵⁸ ; un valor de IC50 de 13 µg/mL para *Jungia paniculata* DC Gray "Matico serrano" ⁵⁹ ; y finalmente un IC50 de 13.13 ± 2.78 ug/mL para *Teucrium marum* (Lamiaceae) ⁶⁰.

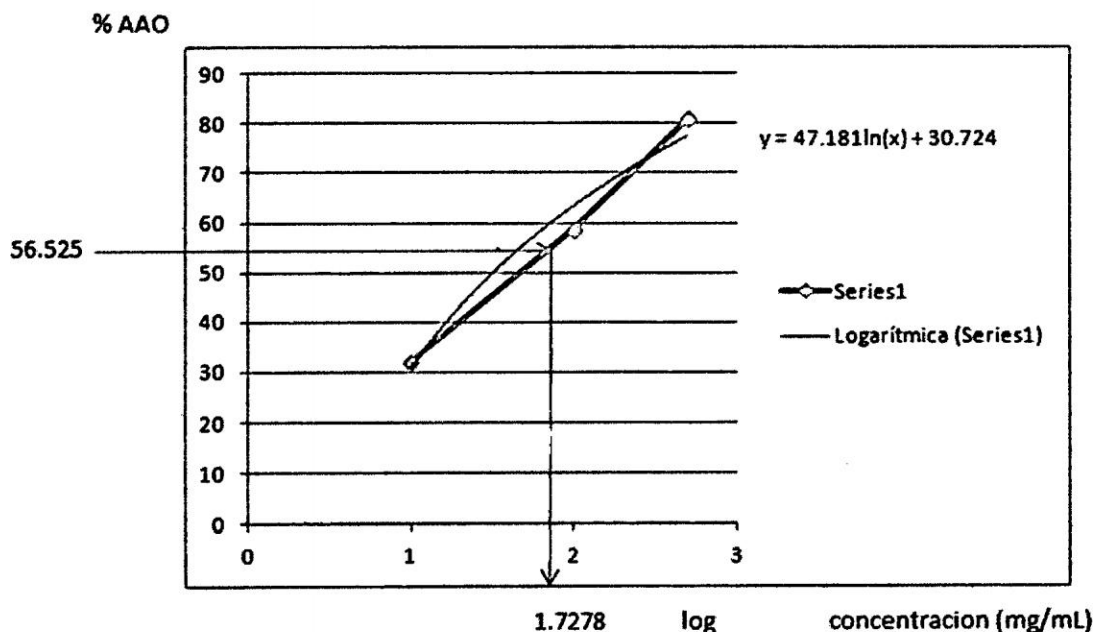
No existe precisión exacta respecto del metabolito responsable del efecto antioxidante, aunque una investigación demostró para el caso del *Tagetes erecta* que podría ser debido a la presencia de alcanfor y el metileugenol, ambos utilizados como agente aromatizantes ⁶¹.

Tabla 1: Actividad antioxidante encontrada en las muestras del aceite esencial de *Tagetes filifolia* mediante espectrofotometría por el método de DPPH.

Pruebas de Actividad Antioxidante a:	Resultado
50 ppm	0.87%
150 ppm	0%
300 ppm	0%
1%	32,16%
10%	58,67%
50%	80,89%

(ppm: partes por millón)

Gráfico N° 01. Actividad antioxidante encontrada en las muestras del aceite esencial de *Tagetes filifolia* mediante espectrofotometría por el método de DPPH.



Los aceites esenciales de las plantas, químicamente son líquidos aromáticos, que contienen lectinas, polipéptidos, alcaloides, fenoles, quininas, flavonas, flavonoides, terpenos, taninos y cumarinas; con una variada actividad contra bacterias, hongos, virus, protozoos, helmintos y los insectos; y que ha sido utilizado de manera tradicional en diferentes partes del mundo para diversas infecciones microbianas relacionadas con la piel, fiebre, intestino y tracto respiratorio, causado por bacterias Gram positivas y negativas⁶²

Estudios similares donde se utilizaron diversos extractos de *Tagetes lucida*, frente a *Staphylococo aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, por el método de discodifusión, utilizando la Kanamicina de 30 ug como control, dieron halos de inhibición de 16.67+/- 0.58 mm y 16.67 +/- 0.58 mm para cada uno de ellos respectivamente. No se apreció ninguna reacción al extracto metanólico de *Tagetes lucida*; pero con halos de 15.33+/- 0.58 y 15.00 +/-1.00 respectivamente al extracto con ethyl acetato, donde se aisló el 5,7,4'timethoxyflavona como el principal componente con actividad antimicrobiana contra Gram positivos y Gram negativos⁶³.

Un estudio determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes patula*, frente a *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, que sometido al método de discodifusión se obtuvo halos de inhibición de 22 mm, 17 mm y 12 mm respectivamente, frente a controles positivos de Sulbactam Ampicilina (10ug/10ug) con 35mm, Netilmicina (30 ug) con 23 mm y Cefoperazona (75 ug) con 28 mm para cada uno de ellos. Se determinó que los principales constituyentes fueron piperitone (33.77%) trans-Beta-ocymene (14.83%), terpinoleno (13,87%) y Beta caryophylleno (9,56%) de importante actividad antimicrobiana contra gram positivos y gram negativos⁶⁴.

Otro estudio determinó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Tagetes terniflora* frente a *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, que sometido al método de disco difusión se obtuvo halos de inhibición de 6

mm, 12 mm y 8 mm respectivamente; frente a control de Cloramfenicol de 100 ug/ml con halos de 9.1mm, 9.2 mm y 10.2 mm para cada uno de ellos⁶⁵.

Se determinó la actividad antibacteriana de dos flavonoides extraídos de *Tagetes* del NOA como son quercetagetina-7-o-glucósido y quercetagetina-7-o-arbinosil galactósido frente a *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, que sometido al método de discodifusión se obtuvo halos de inhibición de 8mm, 10mm, 18mm y 4mm, 10mm, 10mm. Se advierte que la actividad antibacteriana encontrada en un flavonol 7-o-glicosilado por primera vez, hacen de quercetagetina 7-o-glu un promisorio agente antimicrobiano a tener en cuenta con buena biodisponibilidad en humanos⁶⁶.

En el año 2010, un estudio realizado en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho", determinando a una concentración del 10%, halos de inhibición de 25 +/-3 mm, 14.5 +/-0.71 mm, 20.25+5.56 mm para *Staphylococo aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente.⁵²

La actividad antimicrobiana se atribuye a diversas sustancia entre las que podemos mencionar para *Tagetes minuta* al flavonoide quercetagetina-7-arabinosyl galactósido es el más importante componente con actividad antimicrobiana⁶⁶; ó la dihidrotagetona y el cis-Beta-ocimeno¹⁴. Para el caso del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith se demostró la actividad antibacteriana al Isocariofileno, Verbenona y α -Pineno, ya que los mismos son componentes principales de aceites esenciales que presentan actividad biológica⁵².

Con los hallazgos presentados podemos mencionar que el aceite esencial del *Tagetes filifolia*, al igual que otros aceites esenciales y otras plantas del género *Tagetes* presentan una reconocida actividad antioxidante y antibacteriana, lo cual también es demostrado en el presente estudio, concordante con otras investigaciones pero con diferencias que se desprenden de las variaciones en la ejecución del método tanto para el DPPH y el método de

disco difusión, que no se estandariza para todas las investigaciones, pero que no descartan el valor de los resultados obtenidos que nos induce a seguir investigando estas

sustancias en un nivel mayor relacionado a modelos animales que permitan ver sus parámetros farmacocinéticos así como su efectividad clínica según corresponda.

Tabla N° 02: Halos de Inhibición de tres antibióticos frente a bacterias indicadoras. Ayacucho 2014

ANTIBIOTICO (ug/ml)	HALOS DE INHIBICION DE BACTERIAS INDICADORAS (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25933)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25923)
Ceftriaxona (30 ug)	26	32	20
Cloranfenicol (30 µg)	21	25	14
Ciprofloxacino(5 µg)	26	35	28
<i>Tagetes filifolia</i> (160 ug/ml)	16	12	9

CONCENTRACION EXTRACTO (ug/ml)	HALOS DE INHIBICION DE BACTERIAS INDICADORAS		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25933)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25923)
160	18.83	15.03	12.57
80	18.33	14.20	12.33
40	18.00	14.03	11.67
20	18.00	13.77	11.23
10	15.77	13.47	10.27
5	15.07	13.03	10.00
2.5	14.00	12.20	8.25
1.25	13.20	11.70	8.25

Figura N° 02: Gráfico comparativo de los halos de inhibición del aceite esencial de la hoja y tallo de *Tagetes filifolia* "anis del campo" (160ug/ml) frente a antibióticos (Ceftriaxona 30 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Cloranfenicol 30 µg), Ayacucho 2014

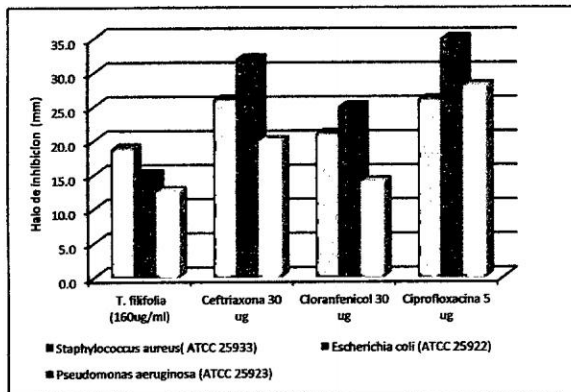
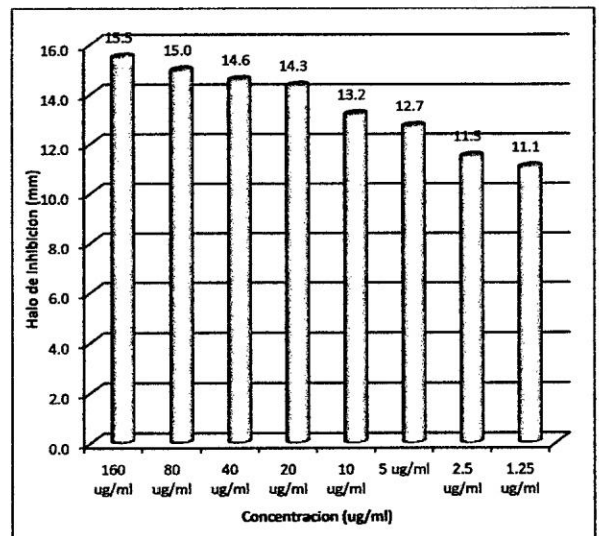


Tabla N° 04: Diámetro promedio de los halos de inhibición de ocho concentraciones crecientes de aceite esencial de la hoja y tallo de *Tagetes filifolia* "anis del campo", Ayacucho 2014

Figura N° 03 Representación de la actividad antibacteriana frente a bacterias indicadoras en ocho concentraciones crecientes de aceite esencial de la hoja y tallo de *Tagetes filifolia* "anis del campo", Ayacucho 2014



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pulgar V J. Geografía del Perú - Las ocho regiones naturales del Perú. Lima: Editorial Universo.; 1981.
- Sumaq Perú Travel SAC (Página principal en Internet) Lima; c2007 (citado 15 de febrero del 2009). Wiki Sumaq Perú; http://wiki.sumaqperu.com/es/Parque_Nacional_Huascar%C3%A1n
- Shiva RC. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales y Ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (tesis doctoral). Barcelona; Universitat Autònoma de Barcelona; 2007
- Kalamba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003; 10: 813-829.
- Martínez J, Sulbarán de Ferrer B, Ojeda de Rodríguez G, Ferrer A, Nava R.
- Contreras N, Martínez J, Stashenko E. Determinación de la Actividad Antioxidante In Vitro de los Aceites Volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la Peroxidación Lipídica de Aceite. *Scientia et Técnica*. 2006 Mayo; 30: 365-370.
- Eminagaoglu O, Tepe B, Yumrutas O, Akpulat A, Daferera D, Polissiou M, et al. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and metanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*. 2007; 100: 339-343.
- Ferreyra, R. Flora del Perú: Dicotiledóneas. Lima; 1986.
- Murga-Gutiérrez SN. Nemátodos Fitoparásitos asociados al cultivo de *Tagetes erecta* en el distrito Virú, La Libertad, Perú. *Neotrop. helminthol*. 2007;1(1): 15-20
- Noorizadeh H, Farmany A, Noorizadeh M. Application of GA-PLS and GA-KPLS calculations for the prediction of the retention indices of essential oils. *Quim Nova*. 2011;34(8):1398-1404.
- Akhtar A, Deshmukh AA, Bhonsle AV, Kshirsagar PM, Kolekar MA. In vitro antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic. *Veterinary World*. 2008;1(9):272-274.
- Mendoza Meza DL, Manuel Taborda. Composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el ácaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (Acari:Pyroglyphidae). *Biosalud*. 2010;9(2):21-31.
- Shojaii A, Fard MA. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN Pharmaceutics*. 2012;1-8.
- Senatore F, Napolitano F. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour Fragr. J*. 2004; 19: 574-578
- Pineda C, Camiloaga E, Zuñiga S. Actividad Antimicrobiana del extracto de hojas de Chincho (*Tagetes elliptica* L.) contra *Salmonella typhimurium* en cobayos (*Cavia porcellus* L.). *Investigación Valdiviana*. 2007; 1 (1): 10-13
- Tereschuk ML. Actividad biológica de flavonoides de Especies de tagetes más representativas del noroeste argentino (tesis doctoral). Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2005
- Thorne R, Reveal J. An updated classification of the class Magnoliopsida ("Angiospermae"). 1era edición. The New York Botanical Garden (Nueva York): Enero. NYBG Press; 2007
- Fuertes Ruiton C. y Mungía Chipana Y. Estudio Comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (kunth) Griseb "Muña" de tres regiones peruanas por Cromatografía de gases y Espectrometría de masas.

-
19. Turner The Comps of Mexico: A systematic account of the family Astereceae, vol.6. Tageteae and Athemi deae. Phytologia memoirs 10; 1996
 20. Villarreal Q. ,J.A. Familia compositae. Tribu Tageteae. Flora del bagío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología A.C. Ptzcuaro, Michoacan. Mexico.85p. 2003
 21. Biblioteca digital de la medicina tradicional (visitada el 20 de setiembre 2014)
<http://www.medicinatradicionalmexicana.una>
 22. Semarnat. Tagetes lucida www.semarnat.gob.mx/pfnm/tagetes_lucida.html (visitada el 10 de agosto 2014)
 23. Cubillo, D.,G. Sanabria y L. Hilje. Evaluación de Repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre Bemisia. Manejo integrado de plagas, 53: 65-72. 1999
 24. Serrato C.M.A Barajas P.J.S y Diaz C.F. *Tagetes filifolia* Lag y *T Lucida* Cav de Oaxaca II Simposio sobre Biodiversidad de Oaxaca. 2007
 25. Universidad de Antioquía (página principal en Internet). Medellín; c 2009 (actualizado el 14 de febrero de 2009; citado el 18 de febrero de 2009) Udea Facultad de química farmacéutica (aproximadamente 2 pantallas); <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>. //
 26. Ortuño MF. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. España: Aiyana ediciones; 2006.
 27. Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra M J, Queraltó Compañó J M. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Segunda edición; Volumen 1. Barcelona: editorial Reverté; 1998.
 28. Costa J M. Diccionario de química física. Primera Edición. Barcelona: Ediciones Díaz de Santos; 2005.
 29. Seymour RB, Carraher CE. Introducción a la química de los polímeros. Segunda reimpresión2002. Barcelona: Editorial Reverte; 1996
 30. Olsen ED. Métodos ópticos de análisis. Primera Edición. Barcelona: Editorial Reverté; 1990
 31. McMurry J. Química Orgánica. Sexta edición. México DF: Thomson Learning; 2005.
 32. Millar DD, Sangines MC, Torre Marina M. Química de Alimentos: Manual de Laboratorio. Primera Edición. San José– Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2003.
 33. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica. Primera Edición. Buenos Aires – Argentina: Editorial Kier
 34. <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>
 35. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry. 2003; 10: 813-829.
 36. Zekaria D. Los aceites esenciales, una alternativa a los Antimicrobianos.
 37. Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cubana Med Milit 2001;30(1):36-44.
 38. Cascales Angosto M, Académica Numeraria de las Reales de Farmacia y Doctores. La paradoja de aerobiosis ¿Por qué es tóxico el oxígeno? (Conferencia); 26 de enero del 2005. Real Academia de Ciencias Veterinarias. Disponible en: <http://www.racve.es/actividades/detalle/id/326>
 39. Bello J. Ciencia Bromatológica, Principios generales de los alimentos. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S. A.; 2000
 40. Hernández RM, Sastre GA. Tratado de nutrición. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1999

41. Cubero N, Monferrer A y Villalta J. Aditivos alimentarios: Colección Tecnología de los Alimentos. Madrid: Mundi-Prensa Libros; 2002
42. Cheng Y, Prusoff WH. "Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction". *Biochem Pharmacol* 1973; 22 (23): 3099–108.
43. Puertas-Mejía M, Hillebrand S. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 16 Apr 2002; 17(5): 380 – 384
44. Mehmet Hakki A, Ahmet M. Screening Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. *B Biol. Pharm. Bull.* (2003); 26(12): 1725—1729
45. Baik JS, Sang-Suk K. Chemical Composition and Biological activities of Essential Oils Extracted from Korean Endemic Citrus Species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 18(1): 74–79
46. Teixeira da Silva J. Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*. 2004 December; 3 (12): 706-720,
47. Schmidt E, Jirovetz L, Buchbauer G and et al. Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) Leaves from Sri Lanka. *Jeobp.* 2006; 9 (2): 170 – 182
48. Kuskoski EM, Asuero AG y Troncoso AM. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 2005 Oct-Dic; 25(4): 726-732.
49. Ugartondo V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares (Tesis de Doctorado). Barcelona: Universitat de Barcelona; 2009.
50. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de Microbiología. Tercera Edición. Barcelona; Masson S. A.; 2005.
51. Perez RM, Hernandez H, Hernandez S. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Tagetes erecta*. *J. Chil. Chem. Soc.* v.51 n.2 Concepción junio 2006
52. Segovia IK, Suárez LL. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho" y determinación de su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Lima 2010
53. Ali NA, Shaporov FS, AL Kaf AG, Hill GM, Arnold N, Al Sakari SS, Setzer WN, Wessjohann L. Compition of essential oil from *Tagetes minuta* and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat Prod Commun* 2014 Feb; 9(2): 265-8
54. Kashif M, Bano S, Naqvi S, Faizi S, Lubna, Ahmed Mesaik M, Azeemi KS, Farooq AD. Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from *Tagetes patula* flower. *Pharm Biol.* 2015 May;53(5):672-81.
55. Gong Y, Liu X, He WH, Xu HG, Yuan F, Gao YX. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia.* 2012 Apr;83(3):481-9.
56. Mehmet Hakki A, Ahmet M. Screening Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. *B Biol. Pharm. Bull.* (2003); 26(12): 1725—1729
57. Schmidt E, Jirovetz L, Buchbauer G and et al. Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) Leaves from Sri Lanka. *Jeobp.* 2006; 9 (2): 170 – 182

-
58. Carhuapoma YM, Bonilla RP, Suárez CS, et al. Estudio de la Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma Chequen* (Molina) "arrayán". *Ciencia e Investigación*. 2005; 8(2): 73-79.
59. Béjar E, Suárez S. Antioxidant and gastroprotective in vitro properties of *Jungia paniculata* DC Gray "Matico serrano". Havana Redox 2007, Abstract Book (64 de 105). 2007 January 25-27. Habana, Cuba.
60. Ricci D, Fraternali D, Giamperi L. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2005 ; 98 : 195-200.
61. Teixeira J. Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (12), pp. 706-720, December 2004
62. Upadhyay RK. Essential oils: antimicrobial, antihelminthic, antiviral, anticancer and anti insect properties. *J. Appl. Biosci.*, 36(1): 1-22, June, 2010
63. Hernández T, Canales M, Flores C, García A, Durán A, Avila J. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology* 2006, 44 (1): 19-22.
64. Rondon M, Velasco J, Hernández J, Pecheneda M, Rojas J, Morales A, Carmona J, Díaz T. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* collected from the Venezuela andes. *Rev. Latinoamer.Quim*, 34/1-3(2006)
65. Tereschuk ML, Baigori MD, Abdala LR. Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. *Fitoterapia* 74: 404-406 (2003)
66. Tereschuk M, Quarenghi M, Gonzales M, Baigori M. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes* del Noa. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas* Vol 6 (6): 364-366. 2007