

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología**

**“Efecto de la actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial de  
*Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a  
*Candida albicans*”**

**TESIS**

**Presentada por**

**Bach. Luis André Tuyo Llipita**

**Para optar el Título Profesional de**

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

**TACNA – PERÚ**

**2015**

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, TACNA  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 262

TÍTULO PROFESIONAL DE:  
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por Resolución de Facultad N° 8252-2015-FACI-UNJBG, el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la tesis:

**“Efecto de la actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a *Candida albicans*”**

El mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : DR. SEGUNDO MANUEL ALVARADO CONTRERAS  
SECRETARIO : MGR. ROBERTO CASTELLANOS CABRERA  
MIEMBRO : MGR. ISABEL ANCCO OLIVA

Para examinar y calificar la sustentación de tesis en acto público el día 29 de octubre del 2015 a las 11:00 horas.

Presentado por el Bachiller: **LUIS ANDRÉ TUYO LLIPITA**, de la Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología.

Los miembros del Jurado Calificador, en forma individual y secreta emitieron su calificación sobre la tesis expuesta y procedió a emitir el siguiente resultado:

Aprobado por **UNANIMIDAD**, con el calificativo de **BUENO** y promedio de 15.

Para ratificar lo detallado firman:

  
Dr. Segundo M. Alvarado Contreras  
Presidente

  
Mgr. Roberto Castellanos Cabrera  
Secretario

  
Mgr. Isabel Ancco Oliva  
Miembro

**Dedicatoria:**

*Esta tesis está dedicada al esfuerzo de mis padres por educarme y a todas las personas que estuvieron a mi lado brindándome una palabra de apoyo en ese trayecto de mi vida, muchas gracias a todas ellas.*

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por llenar mi vida de dicha y bendiciones que a diario me ayudan a ser mejor cada día.

A mis maestros, por su disposición y ayuda brindada por sus conocimientos para lograr una buena formación profesional.

A mi asesor, Dr. César Julio Cáceda Quiroz, por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

Al Mblgo. Edwin Obando Velarde, por su constante apoyo, paciencia, dedicación y consejos para la culminación de este trabajo.

En general, a todas y cada una de las personas que han formado o forman parte importante de mi vida, les agradezco por haberme brindado su apoyo y el ánimo para seguir adelante.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Justificación del problema.....	6
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. Objetivo general.....	7
1.3.2. Objetivos específicos.....	7
1.4. Hipótesis.....	8
1.5. Determinación de variables .....	8
1.6. Operacionalización de variables.....	9
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
2.1. Etnobotánica.....	10
2.2. Historia de <i>Tagetes minuta</i> .....	10
2.2.1. Difusión y origen.....	11
2.2.2. Descripción botánica.....	11
2.2.3. Composición química.....	12
2.2.4. Clasificación científica.....	13
2.2.5. Propiedades medicinales y uso tradicional.....	14
2.3. Antimicrobianos de origen vegetal .....	15

2.3.1. Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural.....	16
2.3.2. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.....	17
2.4. Aceites esenciales.....	18
2.4.1. Definición.....	18
2.4.2. Clasificación .....	20
2.4.3. Distribución y estado natural.....	21
2.4.4. Empleo de los aceites esenciales.....	22
2.4.4.1. Industria alimentaria.....	22
2.4.4.2. Industria farmacéutica.....	23
2.4.4.3. Industria de cosméticos.....	23
2.4.4.4. Industria de productos de uso veterinario.....	23
2.4.5. Extracción de los aceites esenciales.....	24
2.4.5.1. Método de la expresión.....	25
2.4.5.2. Método de la destilación por arrastre con vapor de agua.....	25
2.4.5.3. Método de la extracción con solventes volátiles.....	25
2.4.5.4. Método de enflorado o enfleurage.....	26
2.4.5.5. Método de extracción con fluidos supercríticos.....	26
2.5. Hongos.....	27
2.5.1. Generalidades.....	27
2.5.2. Estructura.....	29
2.5.3. Levaduras.....	35

2.6. <i>Candida albicans</i> .....	36
2.6.1. Descripción micológica.....	36
2.6.2. Descripción taxonómica.....	37
2.6.3. Composición química.....	37
2.6.4. Ecología.....	39
2.6.5. Anatomía patológica y patogenia .....	39
2.6.6. Epidemiología.....	41
2.7. Candidiasis.....	44
2.7.1. Generalidades.....	44
2.7.2. Tipos de candidiasis.....	45
2.7.2.1. Candidiasis mucocutánea.....	45
2.7.2.2. Candidiasis cutánea.....	47
2.7.2.3. Candidiasis diseminada.....	48
2.7.2.3.1. Candidiasis del aparato urinario.....	48
2.7.2.3.2. Endocarditis.....	49
2.7.2.3.3. Meningitis por <i>Candida</i> .....	50
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
3.1. Lugar de estudio.....	52
3.2. Tipo de estudio.....	52
3.3. Unidades de estudio.....	52
3.4. Materiales de laboratorio.....	53

3.5. Metodología.....	54
3.5.1. Recolección de <i>Tagetes minuta</i> L.....	54
3.5.2. Secado de <i>T. minuta</i> L.....	55
3.5.3. Obtención del aceite esencial.....	55
3.5.4. Evaluación de actividad del aceite esencial de <i>T. minuta</i> L.....	56
3.5.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Método de la macro dilución en medio líquido .....	62
3.5.6. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF).....	66
3.5.7. Diseño experimental.....	67
3.5.8. Análisis estadístico.....	67
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>82</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>CUADRO N° 1.</b> Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales.....	19
<b>CUADRO N° 2.</b> Áreas de aplicación de los aceites esenciales.....	24
<b>CUADRO N° 3.</b> Concentraciones del aceite esencial de huacatay en discos de sensibilidad.....	58
<b>CUADRO N° 4.</b> Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de <i>Tagetes minuta</i> L.....	65
<b>CUADRO N° 5.</b> Composición fitoquímica del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. “huacatay”.....	69
<b>CUADRO N° 6.</b> Evaluación antimicótica <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. “huacatay” frente a <i>Candida albicans</i> por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer.....	71
<b>CUADRO N° 7.</b> Evaluación antimicótica <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. “huacatay” frente a <i>Candida albicans</i> por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer.....	72

<b>CUADRO N° 8.</b>	Determinación del grado de sensibilidad de <b><i>Candida albicans</i></b> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <b><i>Tagetes minuta L.</i></b> “huacatay” según Duraffourd (1983).....	73
<b>CUADRO N° 9.</b>	Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <b><i>Tagetes minuta L.</i></b> a través de la variación de los promedios de los halos de inhibición frente a <b><i>Candida albicans</i></b> .....	74
<b>CUADRO N° 10.</b>	Prueba de Tukey para los promedios de los Halos de inhibición de los tratamientos del aceite esencial de <b><i>Tagetes minuta L.</i></b> frente a <b><i>Candida albicans</i></b> .....	76
<b>CUADRO N° 11.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Producido por el aceite esencial de <b><i>Tagetes minuta L.</i></b> “huacatay” frente a <b><i>Candida albicans</i></b> .....	79
<b>CUADRO N° 12.</b>	Concentración Mínima Fungicida (CMF) producido por el aceite esencial de <b><i>Tagetes minuta L.</i></b> “huacatay” frente a <b><i>Candida albicans</i></b> .....	81

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Pág.</b>
<b>GRÁFICO Nº 1.</b> Prueba de significancia de Tukey para la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Tagetes minuta L.</i> “huacatay” frente a <i>Candida albicans</i> .....	77
<b>GRÁFICO Nº 2.</b> Promedio de cada uno de los halos y los tratamientos del aceite esencial de <i>Tagetes minuta L.</i> en estudio frente a <i>Candida albicans</i> .....	78

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO Nº 1.</b>	Partes del huacatay.....101
<b>ANEXO Nº 2.</b>	Equipo de extracción mediante el método de arrastre con vapor de agua.....102
<b>ANEXO Nº 3.</b>	Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al aceite de <i>Tagetes minuta L.</i> "huacatay" por el método de difusión en disco (kirby Bauer).....103
<b>ANEXO Nº 4.</b>	Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al aceite de <i>Tagetes minuta L.</i> "huacatay" de 2,5 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....105
<b>ANEXO Nº 5.</b>	Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al aceite de <i>Tagetes minuta L.</i> "huacatay" de 3,0 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....106
<b>ANEXO Nº 6.</b>	Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al aceite de <i>Tagetes minuta L.</i> "huacatay" de 3,5 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....107

<b>ANEXO N° 7.</b>	Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al aceite de <i>Tagetes minuta L.</i> “huacatay” de 4,0 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....	108
<b>ANEXO N° 8.</b>	Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al aceite de <i>Tagetes minuta L.</i> “huacatay” de 4,5 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....	109
<b>ANEXO N° 9.</b>	Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al aceite de <i>Tagetes minuta L.</i> “huacatay” de 5,0 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....	110
<b>ANEXO N° 10.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial de <i>Tagetes minuta L.</i> para <i>Candida albicans</i> .....	111
<b>ANEXO N° 11.</b>	Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de <i>Tagetes minuta L.</i> para <i>Candida albicans</i> .....	112
<b>ANEXO N° 12.</b>	Análisis de cromatografía gaseosa del aceite esencial de <i>Tagetes minuta L.</i> “huacatay” .....	113

## RESUMEN

La diversidad vegetal peruana llega aproximadamente a unas 50 000 especies detectadas. Razones sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, previamente validados científicamente y tecnológicamente con los respectivos estudios. Por otro lado, las infecciones micóticas son un problema importante en la práctica médica, por su elevada frecuencia y complicaciones. Dentro de las cuales, la más habitual es *Candida albicans*. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. "huacatay" frente a la levadura *Candida albicans*.

La planta *Tagetes minuta* L. se recolectó en el mercado mayorista "Grau", durante los meses de noviembre, diciembre del año 2013 y, enero y febrero del año 2014. Para la extracción del aceite esencial, se emplearon las hojas y tallos, realizándose por arrastre a vapor. La cepa utilizada para este ensayo fue ***Candida albicans***. La actividad antimicótica "*in vitro*" del aceite esencial de esta planta se puso de manifiesto utilizando el método de difusión del disco (Kirby Bauer), con cuatro repeticiones a diferentes concentraciones, obteniéndose de esta manera la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración

Mínima Fungicida (CMF). Los resultados para la difusión en disco fue para el caso de ***Candida albicans*** en el tratamiento T1 con una sensibilidad promedio de 13,25 mm; a partir de ello los demás tratamientos fueron sensibles. Los resultados del MIC fue en el caso de ***Candida albicans*** de 2,8728 mg/ml (T8). Además, la CMF fue para esta levadura de 3,2886 mg/ml, en la que no se evidenció crecimiento alguno. Se concluye que el aceite esencial de ***Tagetes minuta L.*** presentó compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos, con efecto antimicótico *in vitro* frente a la levadura ***Candida albicans***.

Palabras Clave: Kirby - Bauer, CMI, CMF, *Candida albicans*, *Tagetes minuta L.*

## I. INTRODUCCIÓN

Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso de plantas en los sistemas de salud, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80 % de la población utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria a la salud (OMS, 1979). La medicina tradicional en nuestro país es practicada por personas de todo nivel sociocultural, con un uso amplio y variado, basado en plantas medicinales, originalmente los únicos elementos curativos que conocía el hombre, que se han mantenido a través de la historia, sobre todo en zonas rurales remotas o entre minorías étnicas de la sociedad moderna, persistiendo como complemento del hombre pobre o como alternativa a la asistencia médica inaccesible. Sobre todo en centros de culturas aborígenes andino amazónicas supervivientes, donde la medicina moderna sigue siendo desconocida y donde las plantas aún proporcionan las únicas medicinas (Chávez, 1997).

En los últimos años, un 80 % de la población mundial ha recurrido a las plantas medicinales para tratar diversas enfermedades o afecciones, porque son accesibles y más baratos que los productos farmacéuticos

(OMS). El Perú es conocido como el tercer país megabiodiverso del mundo, siendo catalogado por algunos científicos como el primero o segundo, porque posee una extraordinaria riqueza biológica, fuente natural de moléculas bioactivas. La diversidad vegetal peruana llega aproximadamente a unas 50 000 especies detectadas, mientras que todo el continente europeo posee 12 000 especies. Razones sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, previamente validados científica y tecnológicamente con los respectivos estudios (Brack *et al*, 2002).

Así mismo, las infecciones micóticas son un problema importante en la salud, por su elevada frecuencia y complicaciones. Dentro de las cuales, la más habitual es *Candida albicans*. Las infecciones causadas por esta levadura constituyen un problema permanente debido a que son oportunistas y por su prevalencia desarrollan cierta resistencia ante cualquier tipo de antibiótico como mecanismo de defensa propio de estos microorganismos.

La importancia de este estudio radica en evaluar la actividad antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. “huacatay” con el objeto de validar científicamente las propiedades terapéuticas de esta planta; para

revalorizar el uso de las plantas medicinales de nuestro medio, brindando un aporte técnico (científico) adecuado a la medicina tradicional. Demostrar el efecto antimicótico permitirá ofrecer una alternativa importante en el enfoque tradicional del tratamiento de heridas superficiales en la zona rural y promover el diseño del ensayo clínico derivado del presente estudio, luego de la demostración *in Vitro*.

## 1.1. Planteamiento del problema

Actualmente, en el mundo moderno la población crece aceleradamente y con ella también las enfermedades como las producidas por bacterias, virus, hongos, etc. A pesar que existen muchos antimicrobianos para el control o tratamiento, el uso irracional de éstos viene generando resistencia microbiana y otras secuelas. La biodiversidad vegetal ofrece alternativas antibacterianas y algunas especies con excelentes resultados, debido a sus constituyentes químicos.

El uso de las plantas medicinales y la medicina tradicional ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud que reconoce su importancia en los sistemas de salud en muchos países en vías de desarrollo, instando a los estados y miembros a hacer estudios de las plantas medicinales utilizadas por los curanderos tradicionales y la población para determinar aquellos que tengan un efecto satisfactorio, de manera de incluirlas en la farmacopea nacional (Moscoso, 2002).

Entre estas plantas medicinales se encuentra a *Tagetes minuta* L. conocida popularmente como “huacatay”, es una especie nativa del sur de Sudamérica donde vegeta en pastizales templados y regiones montañosas. Estos vegetales son típicos por sus estructuras secretoras

de aceites en todos sus órganos, las cuales son de tres tipos: cavidades, conductos y tricomas glandulares. Por sus aceites esenciales con propiedades agroquímicas y farmacológicas de interés, es una especie de importancia económica (Del Fueyo, 1986; Simon *et al.*, 2002).

Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de su sistema de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Sin embargo, poco se ha explorado sobre su actividad antimicótica, lo cual fue objetivo del presente estudio. Es por ello, el interés de conocer la actividad curativa de esta planta. Por lo tanto, se asume que el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. presenta actividad antimicótica frente a la levadura *Candida albicans* para lo cual se planteó el siguiente problema:

¿Poseerá el aceite esencial de ***Tagetes minuta* L.** acción antimicrobiana *in vitro* frente a la levadura ***Candida albicans***?

## 1.2. Justificación del problema

Las constantes apariciones de cepas resistentes, no solamente a los antifúngicos convencionales, es preocupante y es por ello que se recurre a la búsqueda de nuevas alternativas eficaces y seguras, provenientes de productos naturales, donde sus principios activos se encuentran equilibrados y sus efectos indeseables son limitados en comparación con los fármacos sintéticos.

La investigación en el uso de plantas medicinales forma parte de la etnobotánica. En tal sentido, cabe mencionar que alrededor del 80 % de la población mundial utiliza las plantas como medio curativo, siendo varias las razones por las que socialmente el uso de las plantas medicinales está tomando un auge en estos tiempos, ya sea como respuesta a una medicina alopática, muchas veces iatrogénica; en otros casos por la reducida o inexistente accesibilidad económica de la población a los medicamentos de síntesis, aunado al hecho incontrastable que los países en vías de desarrollo, como es el caso de Perú, existe un uso indiscriminado de productos farmacéuticos de dudosa efectividad.

Por otro lado, la candidiasis, mayormente causada por *Candida albicans*, es una patología que en la actualidad está experimentando un incremento en la frecuencia de su aparición no sólo en pacientes

inmunosuprimidos y hospitalizados, sino que también en aquellos en los que las circunstancias medio ambientales los exponen.

Por ello, existe el interés en el desarrollo del presente trabajo; de determinar si *Tagetes minuta* L. “huacatay” presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans*; de esta manera se contribuirá con nuevas alternativas naturales para combatir las diversas afecciones de este microorganismo.

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a la levadura *Candida albicans*.

#### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer el aceite esencial de las hojas y tallo de *Tagetes minuta* L. por el sistema de arrastre a vapor.
- Determinar el grado de sensibilidad in vitro que presenta el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. frente a ***Candida albicans*** mediante la técnica de difusión en disco.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial de *Tagetes minuta* L frente a ***Candida albicans***.

- Determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. frente a ***Candida albicans***.

#### 1.4. HIPÓTESIS

- El aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” tiene actividad antimicótica in vitro frente a la levadura *Candida albicans*.

#### 1.5. DETERMINACIÓN DE VARIABLES

##### 1.5.1. TIPOS DE VARIABLES

###### a) Variable independiente

Actividad antimicótica del aceite esencial de ***Tagetes minuta* L.** (huacatay).

###### b) Variable dependiente

Agente micótico patógeno (***Cándida albicans***)

### 1.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
<b>INDEPENDIENTE</b> Aceite esencial	Cuantitativa	Diámetro del halo de inhibición	Medido en mm.
	Cualitativa	Diámetro del halo de inhibición (Duraffourd)	Sensible (+), Muy sensible (++) Sumamente sensible (+++)
<b>DEPENDIENTE</b>	La levadura <i>Candida albicans</i>	Crecimiento micótico de la cepa.	Turbidez / UFC

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Etnobotánica

Desde la antigüedad nuestros antepasados han utilizado las plantas como una forma de ayuda para poder calmar los dolores y malestares, y es así que aprovechando los conocimientos heredados de generaciones anteriores y de los indicios proporcionados por cierto grupos étnicos que asignan cualidades curativas, se distinguen centenares de plantas y se saben muchas de las propiedades de cada una, naciendo con ello las plantas medicinales que hasta hoy en día se siguen empleando (Barh, 1988).

En el caso del Perú, la gran biodiversidad botánica por un lado y los conocimientos incipientes de sus propiedades fitoquímicas por otro lado, marcan una brecha considerable que requiere esfuerzos coordinados de diferentes sectores de la sociedad científica, con fines tanto académicas, como prácticos de aprovechar el potencial natural (Hernández, 2003).

### 2.2. Historia de *Tagetes minuta*

*Tagetes minuta*, conocido comúnmente en Perú como “huacatay”, es una hierba anual de la familia de las Asteráceas, erecta puede alcanzar hasta 50 cm de alto; tiene hojas lanceoladas, dentadas y un olor fuerte. Es producido en la costa, sierra y amazonía del Perú, además,

en los yungas y otros valles altos de Bolivia. El nombre común “huacatay” proviene de la voz quechua en donde se le llama “huatacay” nombre usado en Arequipa.

### **2.2.1. Difusión y origen**

Es una especie difundida ampliamente en Sudamérica (Argentina, Chile, Bolivia, Perú y Paraguay); tiene una distribución secundaria (introducida) en Estados Unidos, Australia, África y Asia, se puede comprobar las bondades en la culinaria y medicina. En el Perú se ha encontrado en la costa sierra y selva de nuestro país. Se ha podido verificar que esta especie forma parte del que hacer familiar (Ulloa, 2006).

### **2.2.2. Descripción botánica**

El “huacatay”, cuyo nombre científico es *Tagetes minuta* L., pertenece a la familia de las Asteráceas es una planta herbácea, ascendente, no muy ramificado, anual, que puede crecer hasta 50 cm; presenta hojas lanceoladas, dentadas y un olor fuerte; mide de 1,2 a 2,5 y hasta 5 cm de largo por 0,2 hasta 0,7 mm de ancho. Presenta cabezuelas (inflorescencia de flores densas, sésiles, sobre una estructura parecida a un cojín), en corimbos (flores a una misma altura, pero con pedicelos de diferentes longitudes), pedúnculos (sostén de la inflorescencia) de 0,1 a 0,5 cm de largo, involucro (grupo de hifas que

rodean a la inflorescencia) de 0,7 a 1 cm de largo por 0,15 a 0,3 cm de ancho.

Sus flores son liguladas (flores periféricas) de una a tres, amarillas, ovadas (con forma de huevo) a elípticas de 0,1 a 0,2 cm de largo. Flores del disco (flores centrales) de 3 a 5, corola de 0,3 a 0,4 cm de largo. Vilano (cáliz modificado) 1 o 2 de escamas subuladas (angostamente triangular) de 0,2 a 0,3 cm de largo.

Sus frutos y semillas: el fruto es una cápsula (fruto simple, seco que abre al madurar) desde 0,45 hasta 0,7 cm de largo. La planta se propaga por semillas. Éstas requieren luz para germinar, su temperatura óptima es de 25°C. (Strother, 2006).

### **2.2.3. Composición química**

La planta de “huacatay” contiene un aceite esencial que está constituido por monoterpenos como:  $\beta$ -pineno, limoneno, 2-fenilpropil butirato, 1-Deceno, Undecano, 1-Dodeceno, 2-Undecenal (Aldehído). Sin embargo, la composición del aceite esencial de “huacatay” puede variar significativamente, en función de distintos factores como la parte de la planta recolectada, el grado de desarrollo de la planta en el momento de

la recolección o la procedencia geográfica, entre otros. En el área mediterránea de la India se distinguen principalmente un tipo de aceite esencial de “huacatay” que tiene un elevado contenido de  $\beta$ -ocimeno y en menor grado de limoneno (Kiran, 2007).

#### **2.2.4. Clasificación científica**

Gracias a los estudios taxonómicos las plantas han sido clasificadas, dando lugar al nombre científico basado en el género y la especie, definido por sus características más relevantes; este nombre científico es tomado de la lengua latina y su empleo ha sido generalizado a nivel mundial, de esta manera se ha visto favorecido el avance de la ciencia en cuanto al conocimiento de las plantas en beneficio de la humanidad (Cronquist, 1981).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Tagetes*

Especie: *Tagetes minuta* L.

### **2.2.5. Propiedades medicinales y uso tradicional**

*Tagetes minuta* L. “huacatay” se usa en la gastronomía peruana como condimento en la preparación de ajíes, tales como salsas, guisos y asados. Es un ingrediente indispensable en la preparación de la ocopa, una salsa de ají, cebolla, ajos y maní, típica de la región de Arequipa, a servirse sobre papas cocidas. Es junto al chincho (*Tagetes elliptica*) una de las hierbas aromáticas indispensables para la pachamanca y uno de los componentes del aderezo del pollo a la brasa.

Para la preparación de una salsa de “huacatay” se emplean únicamente las hojas frescas, arrancadas a mano y sin tallos. Las hojas pueden ser molidas en mortero o batán o licuadas con aceite, ají y otros ingredientes para formar una masa similar al pesto, o preparada con queso fresco, leche y nueces. Las hojas secas pierden casi por completo su aroma y sabor. Para guisos se agrega una ramita en la olla, que luego se retira. La hierba tiene alto rendimiento y una ramita de seis a ocho hojas alcanza para seis porciones de salsa de ocopa o para una entera olla de guiso.

En la gastronomía boliviana es ampliamente utilizada en algunas variantes de la llajua así como en la preparación de Queso Humacha, plato típico consistente en papas y mazorcas de maíz cocidos y bañados

en una salsa de queso y hierbas aromáticas que tradicionalmente se sirve en semana santa.

El “huacatay” también puede ser usado como pesticida (nematicida). Se le atribuyen propiedades medicinales como digestivo, carminativo y antiabortivo. La infusión de sus hojas se usa para aliviar los dolores gástricos y la decocción de sus flores y hojas frescas para aliviar los catarros y bronquitis. De sus hojas se extrae un aceite esencial utilizado en perfumería y aromaterapia (Ulloa, 2006).

### **2.3. Antimicrobianos de origen vegetal**

Las plantas, hierbas y especias contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos.

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana, encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) y proteínas (Hernández, 2003).

Los compuestos utilizados como antimicrobianos atacan varios sitios dentro de las células microbianas y dependiendo de la concentración utilizada, pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos (Araujo *et al*, 2008).

Los sitios de acción de los antimicrobianos en la célula microbiana, incluyen a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de ciertos microorganismos (Conner, 1993).

Según Smid y Gorris (1999), citado por Hernández (2003), los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que éstos pueden verse afectados por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas.

### **2.3.1. Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural**

Conner (1993) sugirió que la actividad antimicrobiana de los compuestos vegetales se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos los involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto activo cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y

con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular.

Según Kabara (1991), citado por Nychas (1995), menciona que los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser de dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación.

### **2.3.2. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos**

Para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se aplican los métodos convencionales de ensayo para antibióticos (Kalemba *et al*, 2003).

Existen dos técnicas básicas usadas para la evaluación de las actividades antimicrobianas de los aceites esenciales a saber: El método de difusión en agar y el método de las diluciones.

El estudio de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de los microorganismos patógenos, puede realizarse a través de diversos métodos, el de uso común por los laboratorios de microbiología es el de difusión en agar, estandarizado para microorganismos de crecimiento

rápido. El método estandarizado y recomendado por el NCCLS se basa en el descrito originalmente por Bauer, que obtiene resultados cualitativos que correlacionan bien con los resultados cuantitativos obtenidos mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Cona, 2002).

## **2.4. Aceites esenciales**

### **2.4.1. Definición**

Los aceites esenciales son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles y se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas. La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la tecnología llamada de destilación por arrastre con vapor, en sus diferentes modalidades. La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerán de la técnica que se utilice para el aislamiento.

Los aceites esenciales, generalmente, son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),

- Monoterpenos,
- Sesquiterpenos y

- Fenilpropanos

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del “ajo” y la “cebolla”, los cuales contienen compuestos azufrados.

**Cuadro N° 1.** Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales.

<b>GRUPO FUNCIONAL</b>	<b>NATURALEZA QUÍMICA</b>	<b>EJEMPLO</b>
<b>HIDROCARBUROS</b>	Terpénicos	Limoneno, $\alpha$ -terpineno
	Aromáticos	Cumeno, $\rho$ -cimeno
	Sesquiterpénicos	trans- $\beta$ -Cariofileno
<b>ALDEHÍDOS</b>	Monoterpénicos	Citral
	Alifáticos	Nonanal, octadenal
	Aromáticos	Cinamaldehido
<b>ALCOHOLES</b>	Monoterpénicos	Geraniol, citronelol
	Sesquiterpénicos	3-Decanol
	Alifáticos	Espatulanol, cedrol
	Aromáticos	Alcohol bencílico
<b>FENOLES</b>	Aromáticos	Timol, carvacrol

**Fuente:** Díaz, 2007.

### 2.4.2. Clasificación

Se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en **esencias fluídas, bálsamos y oleorresinas.**

- Las **esencias fluídas** son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Los **bálsamos** son de consistencia más espesa, son poco volátiles propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc.
- Las **oleorresinas** tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de páprika, de pimienta negra, de clavero, etc.).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como **naturales, artificiales y sintéticos.**

- Los **aceites esenciales naturales** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos.
- Los **aceites esenciales artificiales** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool (terpeno), o la esencia de anís enriquecida con anetol.
- Los **aceites esenciales sintéticos** como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto, son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Martínez, 2001).

#### **2.4.3. Distribución y estado natural**

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajeno, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo,

mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.). Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales (González, 1984).

#### **2.4.4. Empleo de los aceites esenciales**

##### **2.4.4.1. Industria Alimentaria**

Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el “cilantro”, “naranja” y “menta”, entre otros. También son utilizados en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos. Con respecto a esta utilidad se puede citar las esencias extraídas del “naranja”, “limón”, “mentas” e “hinojo”, entre

otros. Estas esencias también se emplean en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas.

#### **2.4.4.2. Industria farmacéutica**

Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto). El eucaliptol es muy empleado en odontología. Son utilizados en la fabricación de neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos (naranjas y menta, entre otros).

#### **2.4.4.3. Industria de cosméticos**

Esta industria emplea los aceites esenciales en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este campo se pueden citar los aceites de geranio, lavanda y rosas.

#### **2.4.4.4. Industria de productos de uso veterinario**

Esta industria emplea el aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. (Van Ginkel, 2003).

**Cuadro N° 2.** Principales áreas de aplicación de los aceites esenciales.

<b>INDUSTRIAS</b>	<b>APLICACIONES</b>
<b>Farmacéutica</b>	Medicina: Antibacteriales, antifúngicos, analgésicos, descongestionantes y aromaterapia.
	Veterinaria: Fármacos.
<b>Productos industriales</b>	Crayones, tinta, etiquetas, papeles.
	Cauchos, plásticos y tapicería.
	Agroquímicos: Bioinsecticidas.
<b>Industrias de aromas y sabores</b>	Alimentos y bebidas: Saborizantes, preservantes, confitería, salsas, condimentos y bebidas.
	Industria del tabaco: Saborizantes y fijadores.
<b>Cuidado personal</b>	Cosméticos y aseo personal: Perfumes, colonias, cremas, jabones, desodorantes y shampoos.
	Productos dentales: Pasta dental, enjuague bucal y antisépticos.

**Fuente:** Díaz, 2007.

#### **2.4.5. Extracción de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles y enflorado o enfleurage y con fluidos supercríticos.

#### **2.4.5.1. Método de la expresión**

En la expresión (acto de exprimir), el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y éste es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos (Martínez, 2001).

#### **2.4.5.2. Método de la destilación por arrastre con vapor de agua**

La muestra vegetal, generalmente seca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluídas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Martínez, 2001).

#### **2.4.5.3. Método de la extracción con solventes volátiles**

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a

escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (Martínez, 2001).

#### **2.4.5.4. Método de enflorado o enfleurage**

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Martínez, 2001).

#### **2.4.5.5. Método de extracción con fluidos supercríticos**

Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono líquido), las esencias son

así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente, se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Martínez, 2001).

## **2.5. Hongos**

### **2.5.1. Generalidades**

Los hongos constituyen un grupo diverso de microorganismos que ocupan numerosas posiciones ambientales. En general, en la naturaleza son abundantes y llevan una vida libre, y tan sólo unos pocos forman parte de la flora humana normal. Aunque se han descrito numerosas especies de hongos, habitualmente son menos de 100 las que se asocian con la aparición de enfermedades en el ser humano. Al contrario de los virus, los parásitos protozoarios y algunas especies de bacterias, para preservar o perpetuar la especie, los hongos no necesitan colonizar

o infectar los tejidos del ser humano o de los animales. A excepción de dos casos importantes (la candidiasis y la pitiriasis versicolor), todas las infecciones por hongos tienen su origen en una fuente exógena, sea por inhalación o por implantación traumática. (Dixon *et al*, 1999; Murray *et al*, 2012).

Los hongos son microorganismos eucariotas. Su característica más significativa es que poseen un núcleo envuelto por una membrana nuclear. Al contrario de lo que ocurre en las células de las plantas y en algunas bacterias, los hongos no contienen clorofila, por lo que no pueden sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz. En consecuencia, en la naturaleza todos los hongos existen como saprofitos (microorganismos que viven sobre materia orgánica muerta o en descomposición), simbioses (microorganismos que viven conjuntamente y en asociación con otros, con ventajas mutuas para ambos), comensales (dos microorganismos que viven en estrecha relación y en la que mientras uno se beneficia, el otro ni se beneficia ni resulta perjudicado) o como parásitos (microorganismos que viven sobre o en el interior de un huésped, del que obtienen beneficios sin corresponder a cambio con unas contribuciones útiles; además, en el caso de los patógenos, la relación resulta perjudicial para el huésped) (Moscoso, 2002).

### **2.5.2. Estructura**

Los hongos poseen las estructuras típicas de las células eucariotas. En contraste con las células bacterianas, las células de los hongos poseen un complejo citosol que contiene (entre otras estructuras) microvesículas, microtúbulos, ribosomas, mitocondrias, aparato de Golgi, núcleos y un Retículo Endoplasmático de doble membrana. Los núcleos de los hongos están envueltos por una membrana y contienen prácticamente todo el ADN celular. Asimismo, poseen un nucléolo verdadero y rico en ARN. Una interesante propiedad peculiar de esta membrana es que durante el ciclo mitótico persiste durante toda la metafase; en cambio, la membrana nuclear de las células de las plantas y los animales se disuelve y vuelve a formarse posteriormente (tras la segregación de los cromosomas a sus centrómeros) (Lehman, 1998).

Rodeando el citosol complejo se encuentra otra membrana, el plasmalemma, formada por glucoproteínas, fosfolípidos y ergosterol. Es significativo el hecho de que los hongos posean ergosterol (en lugar de colesterol, que es el principal esteroide que se encuentra en los tejidos de los mamíferos), puesto que la mayor parte de las estrategias de

tratamiento antifúngico están basadas en la presencia de ergosterol en la membrana de los hongos (Lehman, 1998; Murray et al, 2012).

Al contrario de lo que ocurre en las células de los mamíferos, inmediatamente por fuera del plasmalemma los hongos poseen una pared celular rígida y formada por múltiples capas. La pared celular, que es estructural y bioquímicamente compleja, como componente fundamental contiene quitina, un homopolímero de residuos N-acetilglucosamina con enlaces  $\beta$ -(1,4). Por encima de la quitina se encuentran capas de glucanos, así como otros polisacáridos complejos en asociación con polipéptidos. En los hongos filamentosos, la biosíntesis de quitina ocurre en el extremo de crecimiento. La síntesis de quitina está controlada por la actividad de tres quitina-sintasas. Estas enzimas están localizadas en el citosol formando unas estructuras aisladas y ligadas a la membrana que se denominan quitosomas. La forma activa de la quitina-sintasa se encuentra en el plasmalemma; asimismo, la polimerización de las microfibrillas de quitina ocurre en la parte exterior de esta membrana (Lehman, 1998).

Además de la pared celular, algunos hongos producen también un polisacárido capsular. Esta estructura aísla al microorganismo del

ambiente que lo rodea, si bien al mismo tiempo permanece en comunicación directa con dicho ambiente; en el caso de los patógenos, este ambiente es el tejido del huésped. La pared celular y algunas estructuras (p. ej., el material capsular) determinan la virulencia del microorganismo y desempeñan, asimismo, un papel en la aparición en el huésped de respuestas inmunológicas.

Aunque la mayoría de los hongos presentan una respiración aerobia, algunos poseen una capacidad limitada para la anaerobiosis (fermentación) y otros son anaerobios estrictos. Desde el punto de vista metabólico, son heterótrofos y químicamente versátiles, produciendo metabolitos tanto primarios (p. ej., ácido cítrico, etanol, glicerol) como secundarios (p. ej., penicilina, amanitinas, aflatoxinas). En comparación con el tiempo de división de las bacterias (minutos), el de estos microorganismos es largo (horas) (Lehman, 1998; Murray et al, 2012).

Los hongos además, sus células vegetativas no son acidorresistentes. Debido a los glucanos y otros polisacáridos complejos que componen su pared celular (que se tiñen con los métodos de metenamina-plata o con la tinción del ácido peryódico de Schiff), en

las secciones histopatológicas los hongos pueden teñirse mediante procedimientos especiales.

Aunque la capacidad de los hongos para causar enfermedad en el ser humano o en los animales parece ser accidental, la mayor parte de los hongos causantes de enfermedades han desarrollado unas características que les permiten adaptarse y proliferar en ambientes hostiles. Los hongos que colonizan las capas cutáneas de la epidermis o que invaden el pelo y las uñas metabolizan la queratina (proteína fibrosa insoluble que constituye la materia principal de estos tejidos). Otros hongos (p. ej., *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Coccidioides immitis*) han desarrollado una capacidad para vencer a diversos mecanismos de defensa celular del huésped, pueden proliferar a temperaturas superiores a las del huésped (37 °C), así como a las que se encuentran en los ambientes naturales (aproximadamente 25 °C) y, asimismo, pueden sobrevivir en caso de disminución del estado de oxidación-reducción (una situación que aparece en los tejidos lesionados). Los hongos pueden dividirse en dos formas morfológicas básicas: levaduras e hifas. Además, sus etapas de desarrollo pasan por fases tanto vegetativa como reproductiva. Estas fases se observan a menudo de manera simultánea en los cultivos y, en

ocasiones, no es posible separar una de otra con facilidad (Murray *et al*, 2012).

Las levaduras son unicelulares y se reproducen asexualmente mediante unos procesos denominados formación de blastoconidios (gemación) o fisión (Lehman, 1998).

La mayor parte de los hongos presentan unos filamentos tubulares y ramificados (parecidos a hebras) que se denominan «hifas» y que se alargan en sus extremos mediante un proceso llamado «extensión apical». Estas estructuras filamentosas pueden ser cenocíticas (huecas y multinucleadas) o bien tabicadas (divididas por particiones). El término colectivo para un conjunto de hifas es micelio (sinónimo de «moho»). Las hifas que crecen sumergidas o sobre la superficie de un medio de cultivo son llamadas hifas vegetativas (puesto que es responsable de la absorción de los nutrientes). En cambio, las hifas que se proyectan por encima de la superficie del medio son denominadas hifas aéreas. Las hifas aéreas producen a menudo unas estructuras especializadas llamadas «conidios» (que son unos elementos de reproducción asexual conocidos también como «propágulas») que se transmiten fácilmente por el aire y se diseminan en el ambiente. La forma, el tamaño y ciertas

características del desarrollo de los conidios sirven al micólogo para identificar una especie concreta (Murray et al, 2012).

Es muy peculiar la morfología de *Candida albicans*, que forma parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y las membranas que revisten la mucosa de otras cavidades y tejidos. Además de ser levaduriforme o filamentoso, este microorganismo puede adoptar una morfología de pseudohifa en la que las células se alargan y unen lo mismo que salchichas. La formación de pseudohifas constituye una forma exagerada del proceso de gemación; en este caso, las células recién formadas no adoptan una forma ovalada y se escapan de la célula madre, sino que permanecen unidas a ella y siguen alargándose. La morfología de los hongos no es fija, puesto que algunos son dimórficos (p. ej., *H. capsulatum*, *B. dermatidis*, *C. inmitis*, *P. brasiliensis*); es decir, pueden existir en forma de micelio o de levadura según las condiciones ambientales del medio en que se encuentran (en la tierra, sobre vegetación en descomposición o en los tejidos del huésped) (Lehman, 1998; Murray et al, 2012).

### 2.5.3. Levaduras

El término levadura se refiere a un germen unicelular nucleado, que se reproduce por gemación. Tal designación suele considerarse inadecuada, en parte porque algunas levaduras se reproducen por fusión, y porque muchas producen micelio o pseudomicelio en condiciones adecuadas; en parte porque puede haber otros hongos en una forma unicelular de tipo de levadura que se reproduzcan por gemación, por ejemplo, los oídios. Basándose en la formación de esporas sexuales, algunas levaduras son ascomicetos, otras probablemente son basidiomicetos (las levaduras basidioesporángicas) y otras no se ha comprobado que tengan una etapa sexual y se agrupan con los hongos imperfectos. Así, pues, el término "levadura" tiene significado algo incierto; como se utiliza de ordinario, se refiere a aquellos microorganismos que suelen presentarse siempre o predominantemente en forma de levadura (Burroys, 1969).

Quizá las levaduras más frecuentemente encontradas como contaminantes de cultivos bacterianos, y que se descubren creciendo en los alimentos, sean los asporógenos *Rhodotorulae*; las formas de color rosado o coral, muchas veces observadas, son *Rhodotorula, flava* o *R. glutinis*. Dada la distribución ubicua de las levaduras, no sólo en el aire,

el polvo y el suelo, sino en la superficie del cuerpo y en la boca, tubo digestivo y vagina, no debe sorprender que estas formas se hayan descubierto en muchos procesos patológicos. Al respecto, se han descrito gran número de especies, la mayor parte de veces en forma inadecuada. En muchos casos la levadura probablemente no guardaba relación causal con la enfermedad; en otros se ha descrito repetidamente una misma levadura como especie diferente, dando así origen a diversos nombres sinónimos, y se ha acumulado una lista muy grande de levaduras "patógenas" (Murray *et al*, 2012).

El examen crítico ha permitido aclarar que sólo unas pocas especies de levaduras son realmente patógenas para el hombre y los animales (Murray *et al*, 2012).

## **2.6. *Candida albicans***

### **2.6.1 Descripción micológica**

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7  $\mu\text{m}$ ). Asimilan y fermentan azúcares. Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16  $\mu\text{m}$  de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados.

Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. (Pontón *et al*, 2002)

### 2.6.2. Descripción taxonómica

Su descripción taxonómica es la siguiente:

**Reino:** Fungi

**División:** Deuteromycota

**Clase:** Blastomycetes

**Orden:** Pseudosaccharomycetales

**Familia:** Cryptococcaceae

**Género:** *Candida*

**Especie:** *Candida albicans*

**Sinónimos:** *Monilia albicans*, *Candida stellatoidea*

### 2.6.3. Composición química

La composición química de *Candida albicans* está representada por 20-40 % de proteínas y 30-50 % de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. (Murray *et al*, 2012).

La pared celular de *Candida albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manán, glucán y quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos.

El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2 % y 22,9 % del peso seco y poco más de 40 % de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán  $\beta$ -1,3 y el D-Glucán  $\beta$ -1,6 constituyen entre 47 % y 60 % del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6 % y 25 %, lípidos entre 1 % y 7 % y quitina entre 0,6 % y 9 % del peso de la pared celular.

El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como la levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la

pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): manoproteínas,  $\beta$ -glucán-quitina,  $\beta$ -glucán, y una capa de fibrillas (Murray *et al*, 2012).

#### **2.6.4. Ecología**

*Candida albicans* está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas. En estas localizaciones se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica por sí solo la presencia de infección. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad y se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa (Pontón *et al*, 2002).

#### **2.6.5. Anatomía patológica y patogenia**

*Candida albicans* presenta una serie de factores de patogenicidad que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos cabe mencionar el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, el cual favorece la evasión de

los mecanismos defensivos del hospedador. También existen otros tipos de factores de patogenicidad, tales como:

- a) **Adhesinas.** Que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres.
- b) **Proteinasas y fosfolipasas.** Las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador
- c) **Tigmotropismo.** Movimiento que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos.
- d) **Producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras**  
Cabe señalar que la pared celular de *C. albicans* es esencial para su patogenicidad desde el momento en que ésta es requerida para su crecimiento. Además, la pared celular le proporciona rigidez y protección a esta especie. La adherencia de este hongo es superior a la de otras especies de *Candida* y es aumentada por la existencia de una lesión epitelial por los carbohidratos y por la disminución de la flora bacteriana saprofita.

Estos factores de patogenicidad están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto y que determinan el fenotipo y patogenicidad de cada aislamiento, entre los genes asociados a éstos se encuentra el gen de la hexosaminidasa (HEX1), también se encuentran genes de proteínas aspárticas (SAP1, SAP2, SAP3, SAP4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión (Choquehuanca, 2004).

#### **2.6.6. Epidemiología**

En los Estados Unidos las especies de *Candida* representan la cuarta causa de septicemia intrahospitalaria (SIH): 8 % al 10 % del total de estas complicaciones. Un grupo de investigadores reveló que la incidencia de infecciones intrahospitalarias en cualquier localización anatómica es del 2,5 % al 10 %, que las SIH representan alrededor del 10 % de todas las infecciones intrahospitalarias y que el 8 % de estas últimas es causado por especies de *Candida* (alrededor de la mitad ocurre en pacientes internados en UCI).

Por su parte, los datos del *National Hospital Discharge Survey* (NHDS) revelan que desde 1996 hasta 2002, la frecuencia de

candidiasis invasiva se mantuvo relativamente estable, en aproximadamente 22 a 24 episodios por 100 000 enfermos/año. El número se elevó a 29 por 100 000 pacientes en 2003.

Según los datos del *ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program*, entre 1997 y 2003, la lista de especies aisladas de distintas muestras siguió en aumento cada año; a pesar de que *C. albicans* fue la causa más frecuente de candidiasis invasiva en todo el mundo, la frecuencia se redujo con el paso del tiempo (del 73,3 % al 62,3 %). La incidencia de infecciones por *C. glabrata* y *C. krusei* se mantuvo relativamente estable, mientras que las infecciones por *C. tropicalis* y por *C. parapsilosis* aumentaron (del 4,6 % al 7,5 % y del 4,2 % al 7,3 %, respectivamente).

En Estados Unidos, *C. glabrata* es la segunda especie más común en los casos de SIH, después de *C. albicans*; en cambio, en otros países, las especies más frecuentes son *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (SIIC, 2002).

Los factores predisponentes para esta frecuencia elevada de infecciones por levaduras son:

- Aumento de la utilización de quimioterapia y de trasplantes de médula ósea y de otros órganos, con inmunosupresión intensa acompañante.
- Internaciones prolongadas en hospitales.
- Cateterismo vascular.
- Administración prolongada de antimicrobianos de amplio espectro.
- Uso profiláctico extenso de antimicóticos.

La candidemia, definida como la infección del torrente sanguíneo, puede derivar en la diseminación de la infección a múltiples órganos determinando la formación de microabscesos, lesiones cutáneas embólicas, abscesos renales y hepatoesplénicos, endocarditis, meningitis, artritis, osteomielitis y endoftalmitis. (Choquehuanca, 2004).

La incidencia de infecciones invasoras causadas por *Candida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas como consecuencia del aumento de poblaciones de mayor riesgo, ya sea por su condición de inmunosupresión, o por la utilización de procedimientos diagnósticos y/o terapéuticos invasores. Sin embargo, el compromiso osteoarticular por *Candida*, secundario a la invasión del torrente

sanguíneo por el hongo, es una localización infrecuente (Choquehuanca, 2004).

## **2.7. Candidiasis**

### **2.7.1. Generalidades**

En los pacientes con trastornos del sistema inmunitario y en los enfermos internados con patologías graves, las infecciones por hongos son una causa importante de morbilidad y de mortalidad.

Las distintas especies de *Candida*, ampliamente distribuidas, son los hongos más comunes causantes de micosis; integran la flora microbiológica normal pero sólo 10 especies son causa de enfermedad en los seres humanos. La patología asociada con estos hongos incluye un amplio espectro, desde trastornos leves de la piel y mucosas hasta infecciones potencialmente fatales (candidemia, peritonitis, endocarditis infecciosa, infecciones de catéteres intravasculares y meningitis). Aunque algunas de las entidades son difíciles de categorizar, se considera que la candidiasis invasiva incluye a la candidemia y a la candidiasis sistémica (SIIC, 2002).

La candidiasis es una infección por hongos que también se conoce por los nombres de moniliasis, “infección por levaduras”, “infección por hongos”; son causadas por un hongo del género *Candida*, el más frecuente de todos es la *Candida albicans*, que causa alrededor del 90 % de las infecciones por hongos. (Koneman, 1987)

Otros miembros de la familia, que pueden ocasionar la infección, son la *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Los principales factores de patogenicidad que contribuyen al aumento en su capacidad de infectar son la germinación rápida en los tejidos después de diseminarse por el torrente circulatorio; la producción de proteasas, las adhesinas para las proteínas de la matriz extracelular, los receptores de unión al complemento y los cambios fenotípicos.

Las principales manifestaciones clínicas de *Candida albicans* son de tres tipos: mucocutánea, cutánea y sistémica. (Koneman, 1987).

## **2.7.2. Tipos de candidiasis**

### **2.7.2.1. Candidiasis mucocutánea**

La candidiasis de las mucosas afecta sobre todo la cavidad bucal y el conducto vaginal. La candidiasis bucal, una enfermedad conocida

como muguet, es la manifestación clínica más frecuente de candidiasis en los seres humanos. La infección se manifiesta como placas blancas en la mucosa bucal y la lengua, que, en las infecciones más graves, pueden unirse en una membrana. Estas se adhieren firmemente al epitelio y cuando se las retira revela una base enrojecida y edematosa. El diagnóstico puede hacerse mediante la observación de las pseudohifas y los blastoconidios característicos en la microscopia de las preparaciones teñidas con Gram de frotis del exudado, entre las causas predisponentes figuran la alteración de la flora normal después de la antibiótico terapia prolongada, el pH bajo de las secreciones salivales en los recién nacidos, la hipertrofia de las papilas de la lengua (lengua negra vellosa) y la glositis crónica. La candidiasis bucal se reconoce ahora como una enfermedad que define el SIDA y se observa casi en el 100 % de estos pacientes.

Aunque clásicamente está causada por *Candida albicans*, la especie estrechamente relacionada, *Candida dubliniensis*, ha surgido hace poco como el agente más problemático en muchos casos, lo que expresa la resistencia inducida a ciertos agentes antimicóticos derivados de los azoles, en especial el fluconazol. Por consiguiente, puede estar indicada la identificación por el laboratorio de C.

*dublinsiensis* para los casos de muguet bucal antes de administrar el tratamiento empírico con un antimicótico azólico (Koneman, 1987).

Las mucosas de la tráquea, los bronquios y casi cualquier parte del tubo digestivo, pueden sufrir infecciones por *Candida*. Un ambiente con pH bajo puede explicar esta predisposición, en especial en los pacientes con procesos malignos de la sangre. La disfagia, el dolor retroesternal, la hemorragia gastrointestinal alta y las náuseas son síntomas asociados. La candidiasis esofágica también puede suceder como una propagación orofaríngea, sobre todo en los recién nacidos (Koneman, 1987).

#### **2.7.2.2. Candidiasis Cutánea**

Las infecciones de la piel suelen afectar las partes húmedas e intertriginosas, como las zonas interdigitales de las manos y los pies, debajo de las mamas, las axilas y los pliegues de la ingle. La infección de las uñas se conoce como onicomicosis o paroniquia si están afectados los pliegues de la piel que encierran las uñas. La dermatitis de pañal en los recién nacidos también es una manifestación frecuente. La candidiasis mucocutánea crónica es una infección oportunista de la piel y las mucosas, asociada con varios trastornos genéticos que

afectan la función de los leucocitos o del sistema endocrino (Koneman, 1987).

### **2.7.2.3. Candidiasis diseminada**

La candidiasis sistémica es una enfermedad relativamente rara, que suele suceder como un episodio terminal de los pacientes con neoplasias debilitantes (crisis blásticas de leucemias y linfomas por ejemplo), enfermedades inmunosupresoras y luego del trasplante de órganos, en especial durante el síndrome de rechazo agudo. A continuación se describen los órganos en los cuales puede producirse la siembra tras la diseminación de las especies de *Candida* a partir de los sitios primarios de infección mucocutánea.

#### **2.7.2.3.1. Candidiasis del aparato urinario**

Esta presentación es relativamente rara y se manifiesta como cistitis, causada con mayor frecuencia por *Torulopsis (Candida) glabrata* y pielonefritis, ya sea por vía ascendente a partir de la infección vesical o por diseminación hemática desde un sitio primario distante de infección. Pueden verse agregados de pseudohifas y blastoconidios en la histología de los glomérulos, probablemente en un microambiente que favorece el crecimiento debido a la disminución de

pH por el intercambio de iones de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$ . En la actualidad, *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata* es el segundo o tercer de agente causal de infecciones superficiales (bucal, esofágica, vaginal o urinaria) o sistémicas candidiásicas. La emergencia de *C. glabrata* como patógeno intrahospitalario puede relacionarse con su resistencia a los azoles que se han usado de manera eficaz en el tratamiento de otras infecciones por levaduras (Koneman, 1987).

#### **2.7.2.3.2. Endocarditis**

Esta infección se ve más a menudo en personas con valvulopatías preexistentes, en especial tras episodios de septicemia asociados con el uso de catéteres permanentes, infusiones intravenosas. Hogevik y Alestigt presentaron siete casos de endocarditis en el oeste de Suecia. En cuatro casos las infecciones se asociaron con la colocación de prótesis valvulares; en tres casos estaban afectadas las válvulas propias. Debido a la alta mortalidad, los autores hacen hincapié en la necesidad del diagnóstico temprano, el tratamiento antimicótico inmediato y la cirugía de urgencia si la ecografía revela una falta de respuesta, la septicemia por *Candida* también puede observarse en los pacientes que reciben antibióticos y corticosteroides por periodos muy prolongados. Aunque la mayoría de las cepas de *C. albicans* pueden

aislarse en los cultivos de sangre realizados en los frascos para hemocultivos comerciales, Marcelis y cols. Informaron que los medios de cultivo que contienen resina (específicamente, en sus estudios utilizaron BACTEC PLUS que tiene un alto contenido en resina) puede reforzar la recuperación, en especial en pacientes que reciben antibióticos (Koneman, 1987).

#### **2.7.2.3.3. Meningitis por *Candida***

Esta enfermedad rara es secundaria a la diseminación a partir de los sitios de infección en los aparatos gastrointestinal o respiratorio, émbolos sépticos liberados de las válvulas cardíacas infectadas, traumatismo o como complicación de una neurocirugía. En una revisión retrospectiva de 21 casos de especies de *Candida* aisladas en el líquido cefalorraquídeo luego de una neurocirugía, Geers y Gordon encontraron que el 86 % de estos pacientes tenían válvulas cerebroespinales permanentes (desviaciones). Gelfand y cols. Informaron casos de sobreinfección tras meningitis bacteriana aguda en adultos que sufrieron traumatismo del sistema nervioso central o intervención quirúrgica. Estos autores aconsejan que en todo paciente con meningitis bacteriana que no mejora con tratamiento antimicrobiano debe investigarse la sobreinfección por *Candida*, en

especial en los casos en que hay colocados catéteres permanentes (Koneman, 1987).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología y en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann -Tacna.

#### 3.2. Tipo de estudio

Es una investigación cuasi experimental prospectivo.

#### 3.3. Unidades de estudio

##### 3.3.1. Material biológico

El aceite esencial de *Tagetes minuta L.* fue obtenido en el Laboratorio de Microbiología, Escuela de Biología Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann -Tacna.

##### 3.3.2. Material microbiológico

Se trabajó con una levadura oportunista; *Candida albicans*, proporcionado por el Laboratorio del Hospital Hipólito Unanue de Tacna.

### **3.4. Materiales de laboratorio**

#### **3.4.1. Material de vidrio**

- Balones de vidrio de 500 y 1000 ml
- Micro pipetas de 0,5 – 10  $\mu$ l, 20 – 200  $\mu$ l y, 100 – 1000  $\mu$ l
- Probetas de 10 y 50 ml
- Tubos de ensayo de 13 x 150 mm
- Placas Petri de de 15 x 100 mm
- Vaso precipitado de 50, 100 y 250 ml
- Matraces de 50 y 100 ml

#### **3.4.2. Medios de cultivo**

- Agar Nutritivo
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agar Sabouraud
- Caldo Cerebro Corazón (BHI)

#### **3.4.3. Reactivos**

- Dimetilsulfóxido
- Alcohol de 70°
- Agua destilada

#### **3.4.4. Equipos y otros**

- Equipo de destilación a escala industrial
- Balanza analítica
- Autoclave
- Incubadora
- Cámara cuenta colonia
- Refrigeradora
- Asa bacteriológica
- Pinzas
- Mechero Bunsen
- Gradilla
- Cámara fotográfica digital
- Papel aluminio

### **3.5. Metodología**

#### **3.5.1. Recolección de *Tagetes minuta* L.**

La planta *Tagetes minuta* L. “huacatay” se obtuvo en una comercializadora ubicada en el mercado de la localidad (Mercado Grau) y se colocó en bolsas de primer uso para su conservación hasta su procesamiento.

### **3.5.2. Secado de *Tagetes minuta* L.**

Para el secado de la muestra se empleó una habitación de 3 m<sup>2</sup> por un periodo de 2 a 4 días, la cual cumplió con los siguientes requisitos: buena circulación de corrientes de aire, poca luz, temperatura de 25-28 °C y baja humedad. La muestra que se recolectó se extendió de forma homogénea y uniforme sobre una plataforma horizontal de madera para evitar la humedad entre ellas y permanentemente se removió para conseguir un buen secado homogéneo.

### **3.5.3. Obtención del aceite esencial de *Tagetes minuta* L.**

**Técnica:** Arrastre de vapor (Lock de Ugaz, O. 1994) y Martínez M, Alejandro (2001).

Para la extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. se colocó aproximadamente 200 gramos de muestra (hojas y tallos) en un balón, de capacidad volumétrica de un litro (balón de extracción) mientras se agregaba agua (volumen aproximado de 650 ml) en otro balón de extracción, de la misma capacidad del anterior, el cual fue sometido a calor directo (cocina eléctrica) y

luego por arrastre a vapor se logró la obtención de la muestra de aceite esencial de Huacatay. El producto se recogió en un tubo de ensayo con tapa rosca y se almacenó a temperatura de refrigeración y en oscuridad hasta el momento de su utilización.

#### **3.5.4. Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Tagetes minuta* L.**

**Técnica:** Método de difusión de disco o Kirby Bauer (Koneman y col, 2004) y Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión (2002).

La actividad antimicrobiana del aceite esencial se evaluó por el método de difusión en disco. Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos al aceite esencial se empleó el método de difusión radial en el medio agar PDA (agar papa dextrosa) según recomendaciones del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) utilizando para ello discos de inhibición embebidos con el aceite esencial a volúmenes de 2,5 µl, 5,0 µl, 7,5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl

respectivamente. Esta técnica estandarizada por la NCCLS está basada en el conocido método de Kirby Bauer. Este método de difusión se basa en que el compuesto a estudiar se difundiera por el medio agarizado produciendo un gradiente de concentración, entonces, si el compuesto es efectivo contra el microorganismo probado se formará una zona de inhibición alrededor del disco embebido en el compuesto. El tamaño de la zona de inhibición proporcionó indicios de la relativa actividad de la sustancia.

**A. Determinación de la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* L.**

Probeta de 10 ml vacía = 16,2976 g

Probeta de 10 ml con aceite = 16,4122 g

Masa = 16,4122 g - 16,2976 g = 0,126 g

Volumen = 200  $\mu\text{l}$  o 0,2  $\text{cm}^3$

**D:** densidad

**m:** masa

**v:** volumen

$$D = m / v \qquad D = 0,126 \text{ g} / 0,2 \text{ ml} = 0,63 \text{ g/ml}$$

$$D = 0,8909 \text{ mg} / \mu\text{l}$$

$$1 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ mg}$$

$$0,63 \text{ g} \longrightarrow X \qquad X = 630 \text{ mg}$$

$$cc = 1000 \mu\text{l} \longrightarrow 630 \text{ mg}$$

$$2,5 \mu\text{l} \longrightarrow x$$

$$X = 1,575 \text{ mg} / \mu\text{l}$$

**Cuadro N° 3.** Concentraciones del aceite esencial de cedrón en discos de sensibilidad.

TRATAMIENTO ( T )	VOLUMEN ( $\mu\text{l}$ )	CONCENTRACIÓN ( $\text{mg}/\mu\text{l}$ )
T1	2,5	1,575
T2	5,0	3,15
T3	7,5	4,725
T4	10,0	6,3
T5	15,0	9,45
T6	20,0	12,6

**Fuente:** Elaboración propia.

Con el objeto de conocer entre cuáles de estas concentraciones pudiese estar el MIC (Concentración Mínima Inhibitoria); las placas Petri con muestras se incubaron a 37 °C por un periodo de 24 horas. Posteriormente, se observó la presencia del halo que se formó y se anotó el tamaño del halo en la zona de inhibición.

## **B. Estandarización de la población microbiana de estudio:**

### **Preparación del inóculo para *Candida albicans***

En la estandarización de la población microbiana se utilizó a partir de colonias de la levadura en estudio bien aislada de un cultivo puro de agar nutritivo. Con un asa bacteriológica se transfirieron las colonias a un tubo que contenga 5 ml de Caldo BHI, homogenizando las colonias hasta lograr turbidez, se incubó el inóculo a 37 °C por 4 horas, posteriormente, el inóculo se estandarizó por turbidez con el tubo 0,5 de la escala de Mac Farland cuya población microbiana fue de  $1,5 \times 10^8$  ufc /ml.

**C. Preparación de los discos de sensibilidad con las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* L.**

En esta etapa se preparó discos de sensibilidad 6 mm de diámetro de papel Wathman N° 42 previamente esterilizados, los discos de sensibilidad fueron embebidos con una micropipeta de rango variable con volúmenes de 2,5 µl, 5,0 µl, 7,5 µl, 10 µl, 15 µl y 20 µl de aceite esencial respectivamente.

**D. Prueba de susceptibilidad: Método de difusión en disco de susceptibilidad (Kirby - Bauer)**

De la suspensión microbiana de concentración de  $1,5 \times 10^8$  ufc /ml que se estandarizó, con la ayuda de una micro pipeta se tomaron 100 µl del inóculo micótico, los cuales se colocaron en las placas con agar PDA (agar papa dextrosa) procediendo a diseminar con una asa Digraslky, realizando un estriado homogéneo sobre toda la superficie de la placa. Luego, se dejó secar durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, usando una pinza estéril se tomó los discos impregnados con el aceite esencial

y se colocaron sobre la superficie de las placas con agar PDA (agar papa dextrosa), haciendo una ligera presión para asegurar el contacto con el medio. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas para observar la presencia y el tamaño de los halos de inhibición. Por otro lado, la lectura se realizó midiendo los halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del diámetro del disco. Para interpretar los resultados se tomó como referencia las pautas dadas por **Duraffourd (1983)**; que considera la actividad de los aceites como:

- Sensibilidad límite para un diámetro entre 9 a 14 mm.
- Sensibilidad Media para un diámetro comprendido entre 15 a 19 mm.
- Sumamente sensible para un diámetro superior o igual a 20 mm.

### 3.5.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

#### (CMI): Método de la macro dilución en medio líquido

Técnica: (Granados y Villaverde, 1996).

#### A. Preparación de la solución madre

Se preparó una solución madre de 10 000  $\mu$ l; la cual contenía 1 800  $\mu$ l de aceite esencial en 1 800  $\mu$ l de DMSO (Dimetilsulfóxido), para 6 400  $\mu$ l de medio BHI (Infusión Cerebro Corazón). La concentración final se obtuvo de la siguiente forma. En primer lugar, se determinó la densidad del aceite esencial de *Tagetes minuta* L.

$$D = m / V$$

$$D = 0,126 \text{ g} / 0,2 \text{ ml} = 0,63 \text{ g/ml}$$

$$D = 0,63 \text{ g} / \text{ml}$$

$$m = D \times V$$

$$m = 0,63 \text{ g/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$m = 0,63 \text{ g}$$

Entonces, en 1 ml de aceite esencial existe una concentración de 0,63 g de aceite esencial de “huacatay”.

Sin embargo, para la solución madre sólo se trabajó con miligramos de aceite esencial de *Tagetes minuta L.*

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 1000 \text{ mg} \\ 0.63 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad X \\ X = 630 \text{ mg} \end{array}$$

Entonces, en 1 ml o en 1 000  $\mu\text{l}$  hay una concentración de 630 mg de aceite esencial de *Tagetes minuta L.*

Para la solución madre, se llevó a 1 800  $\mu\text{l}$  de aceite esencial lográndose determinar lo siguiente:

$$\begin{array}{l} 630 \text{ mg.} \quad \longrightarrow \quad 1\,000 \mu\text{l} \\ X \quad \longrightarrow \quad 1\,800 \mu\text{l} \\ X = 1\,134 \text{ mg/ml} \end{array}$$

Por tanto, en 1 800  $\mu\text{l}$  de aceite esencial existe una concentración de 1 134 mg de aceite esencial de *Tagetes minuta L.*

Para la solución madre: Esta concentración se diluyó en 10000  $\mu\text{l}$  de solución total.

$$\begin{array}{l} 1134 \text{ mg} \quad \longrightarrow \quad 10\,000 \mu\text{l} \\ X \quad \longrightarrow \quad 1\,000 \mu\text{l} \\ X = 113,4 \text{ mg} \end{array}$$

Entonces, en 1 ml o 1 000  $\mu$ l tiene una concentración de 113,4 mg/ $\mu$ l de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. Pero en 500  $\mu$ l de solución madre se tuvo:

113, 4 mg  $\longrightarrow$  1 000  $\mu$ l

X  $\longrightarrow$  500  $\mu$ l

$$X = 56, 7 \text{ mg}$$

Finalmente, en 500  $\mu$ l se tiene una concentración de 56,7 mg de aceite esencial de *Tagetes minuta* L., pero ésta se diluyó en un tubo con 6400  $\mu$ l del medio BHI (Infusión Cerebro Corazón) alcanzándose una concentración final de 725,76 mg / $\mu$ l.

## **B. Preparación del MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) para *Candida albicans***

Se utilizó el método de la macro dilución en tubos con medio BHI (Infusión Cerebro Corazón), preparando diluciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. a diferentes concentraciones, después de lo cual se agregó una suspensión bacteriana constante de acuerdo al estándar de turbidez de 0,5 de Mc Farland. Se prepararon

12 tubos de 15 X 125 mm a los cuales se les agregó lo siguiente:

**CUADRO N° 4.** Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Tagetes minuta* L.

Tratamiento	Vol. de Solución Madre	Medio BHI	Vol. Total de la solución	Conc. Sol. madre en 1 000 µl	Conc. final de la solución
T1	41 µl	2 959 µl	3 000 µl	4,6494mg/µl	1,5498 mg/µl
T2	47 µl	2 953 µl	3 000 µl	5,3298mg/µl	1,7766 mg/µl
T3	51 µl	2 943 µl	3 000 µl	5,7834mg/µl	1,9278 mg/µl
T4	56 µl	2 944 µl	3 000 µl	6,3504mg/µl	2,1168 mg/µl
T5	62 µl	2 938 µl	3 000 µl	7,0308mg/µl	2,343 mg/µl
T6	67 µl	2 933 µl	3 000 µl	7,5978mg/µl	2,5326 mg/µl
T7	72 µl	2 928 µl	3 000 µl	8,1648mg/µl	2,7216 mg/µl
T8	76 µl	2 924 µl	3 000 µl	8,6184mg/µl	2,8728 mg/µl
T9	81 µl	2 919 µl	3 000 µl	9,2988mg/µl	3,0996 mg/µl
T10	87 µl	2 913 µl	3 000 µl	9,8658mg/µl	3,2886 mg/µl
T11(+)	-	3 000 µl	3 000 µl	-	-
T12(-)	100 µl	2 900 µl	-	-	-

**Fuente:** Elaboración propia.

### **3.5.6. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF)**

#### **A. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) para *Candida albicans***

**Técnica:** (Granados y Villaverde, 1996).

Una vez obtenido la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de la macro dilución en medio líquido se procedió a realizar la obtención de la Concentración Mínima Fungicida (CMF), tomando los tres tubos en donde no se presentó turbidez.

Se procedió a tomar 100 µl de los tubos 8, 9 y 10 para sembrar en placas con el medio PDA (Agar Papa Dextrosa), con la ayuda de un asa Digraslky se diseminó y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. y así ubicar el correspondiente CMF ( $\leq 1$  ufc/placa).

### **3.5.7. Diseño experimental**

Para la ejecución del experimento se utilizó el diseño experimental de bloques completamente al azar con 06 tratamientos (concentraciones) y 04 repeticiones, haciendo un total de 24 unidades experimentales (OMS, 1979).

### **3.5.8. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANDEVA), usando la prueba F a un nivel de significación de 0,01 y para establecer las diferencias medias entre las concentraciones se utilizaron la prueba de significación de Tukey al 0,01. Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS plus versión 5,1 en español. Los tratamientos a base de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. se expresaron en términos de mg/ml, mientras que los promedios de los halos de inhibición o de sensibilidad se expresaron en milímetros (mm).

#### IV. RESULTADOS

Se realizó el estudio *in vitro* en la especie fúngica ***Candida albicans***, proporcionado por el Laboratorio del Hospital Hipólito Unanue de Tacna, demostrándose la sensibilidad del hongo mencionado frente al aceite esencial de *Tagetes minuta* L, trabajándose con seis tratamientos y cuatro repeticiones.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas han sido agrupados en Cuadros y Gráficos para una mejor interpretación de los resultados que se detallan a continuación. Se utilizó el diseño completamente aleatorizado, debido a que éste es un diseño de distribución simple, al azar, siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

**Cuadro 5.** Resultados obtenidos en la Universidad Católica de Santa María Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnologías referente a la composición fitoquímica del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay”.

ANÁLISIS FISICOQUÍMICO	
ANÁLISIS	RESULTADO
<p><b>Determinación cuantitativa de metabolitos secundarios (%)</b></p> <p>Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación por normalización interna.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beta-pinene (1,54)</li> <li>• 1-Decene (4,25)</li> <li>• Undecane (3,8)</li> <li>• Limoneno (3,47)</li> <li>• Undecane (2,33)</li> <li>• 2-Phenylpropyl butyrate (1,7)</li> <li>• Undecane (6,27)</li> <li>• 1-Octanol, 2-methyl- (1,37)</li> <li>• 4-Octyne-3,6-diol (1,68)</li> <li>• Nonane,5-butyl- (1,38)</li> <li>• 1-Dodecene (17,76)</li> <li>• Dodecane (3,09)</li> <li>• Bicyclo(3.1.1)heot-3-en-2-one,4,6, (5,31)</li> <li>• 2-Decenal, (E)- (1,2)</li> <li>• Tridecane (1,54)</li> <li>• 2-Undecenal (1,93)</li> <li>• 1-Tridecene (41,4)</li> </ul>

**Fuente:** Universidad Católicas Santa María - Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad - Arequipa

En el Cuadro 5 se muestra la composición fitoquímica del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” obtenido por el método de cromatografía

gaseosa con detección de masa en forma cualitativa y cuantitativa. Se determinó que los componentes con mayor presencia son: 1-Dodeceno o alfa-Dodeceno (17,76 %); 1-Trideceno (41,4 %) y limoneno (3,47 %).

**Cuadro 6.** Evaluación antimicótica *in vitro* del aceite esencial de *Tagetes minuta L.* “huacatay” frente a *Candida albicans* por el método de difusión en disco Kirby-Bauer.

TRATAMIENTOS	ACEITE ESENCIAL		DIÁMETRO DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm)
	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	
<b>T1</b>	2,5	1,575	11
<b>T2</b>	5,0	3,15	17
<b>T3</b>	7,5	4,725	24
<b>T4</b>	10,0	6,3	28
<b>T5</b>	15,0	9,45	32
<b>T6</b>	20,0	12,6	46

**Fuente:** Elaboración propia.

En el Cuadro 6 se observa el efecto antimicótico de las 6 concentraciones probadas que se evidencian con halos de inhibición entre 11 y 46 mm de diámetro. Siendo la concentración de 12,6 mg/ml la que generó el halo de mayor tamaño y la concentración de 1,575 mg/ml la que generó el halo de menor tamaño.

**Cuadro 7.** Evaluación antimicótica *in vitro* del aceite esencial de *Tagetes minuta L.* “huacatay” frente a *Candida albicans* por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer.

Tratamiento	Aceite esencial		Diámetro de los halos de inhibición (mm)				Promedio del halo (mm.)
	Volumen	Concent. (mg/ml)	Repeticiones				
			R1	R2	R3	R4	
T1	2,5	1,575	13	16	13	11	13,25
T2	3,0	1,890	13	14	13	15	13,75
T3	3,5	2,205	14	14	16	13	14,25
T4	4,0	2,520	14	15	16	14	14,75
T5	4,5	2,835	16	16	17	16	16,25
T6	5,0	3,15	21	22	16	17	19,0

**Fuente:** Elaboración propia.

En el Cuadro 7 se observa el efecto antimicótica de las 6 concentraciones probadas que se evidenciaron con halos de inhibición entre 13,25 y 19,0 mm de diámetro. Siendo la concentración de 3,15 mg/ml la que generó el halo de mayor tamaño y la concentración de 1,575 mg/ml la que generó el halo de menor tamaño.

**Cuadro 8.** Determinación del grado de sensibilidad de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta L.* “huacatay” según Duraffourd (1983).

TRATAMIENTOS	ACEITE ESENCIAL		GRADO DE SENSIBILIDAD		
	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Sensibilidad límite: entre 9 a 11 mm	Sensibilidad media: entre 11 a 20 mm	Sumamente sensible: de 20 mm a más
			Sensible = +	Muy sensible = ++	Sumamente sensible = +++
T1	2,5	1,575		11	
T2	5,0	3,15		17	
T3	7,5	4,725			24
T4	10,0	6,3			28
T5	15,0	9,45			32
T6	20,0	12,6			46

**Fuente:** Elaboración propia.

En el Cuadro 8 según **Duraffourd (1983)**, se reportó la sensibilidad a partir del tratamiento T1 con un halo de 11 mm a la concentración de 1,575 mg/ml, hasta el tratamiento T6 con un halo de inhibición de 46,0 mm a la concentración de 12,6 mg/ml.

**Cuadro 9.** Análisis de varianza para comparar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta L.* a través de la variación de los promedios de los halos de inhibición frente a *Candida albicans* entre los diferentes tratamientos.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Significación 0,01
Concentraciones	5	90,208	18,04	6,83	0,0017 **
Halos (Bloques)	3	10,125	3,375	1,28	0,3179 ns
Error experimental	15	39,625	2,642		
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>139,958</b>			

CV: 10,69 % \*\* Diferencias altamente significativas ns: No significativo

### 1.- Formular la hipótesis

$H_0$  : El promedio entre las concentraciones son iguales

$H_0$  : Las diferentes concentraciones tienen el mismo efecto sobre las variables de estudio

$H_1$  : No todos los promedios entre concentraciones son iguales

$H_1$  : Las diferentes concentraciones tienen diferente efecto sobre las variables de estudio

**2.- Nivel de significancia**  $\alpha = 5 \% = 0,01$

**3.- Estadístico de prueba**  $F_c = 6,83; p = 0,0017$

**4.- Decisión:**  $p = 0,0017 < \alpha = 1 \% = 0,01$ , entonces se acepta  $H_1$

**5.- Conclusión:** Al nivel del 1% de significancia se concluye que el tamaño de los halos en las diferentes repeticiones son diferentes, es decir que existen diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 99 %

En el Cuadro 9 el análisis de varianza utilizado para  $F_c$  fue de 0,01 % de probabilidad; los promedios de halos de inhibición indican que no existen diferencias estadísticas a nivel halos, es decir, fueron uniformes; sin embargo, para los tratamientos se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas, por lo que se deduce que existe evidencia estadística para señalar que los diferentes tratamientos influyeron directamente sobre la variable en estudio, con un nivel de confianza del 99 %.

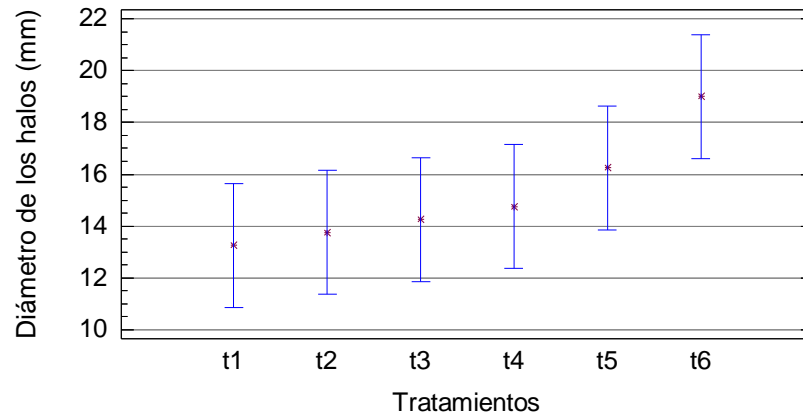
**CUADRO 10.** Prueba de significación de Tukey para los promedios de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Tagetes mimuta L.* frente a *Candida albicans*.

Orden de mérito	Tratamientos (mg/ml)	Promedio de halos (mm)	Significancia $\alpha$ 0,01
1	T <sub>6</sub>	19,0	a
2	T <sub>5</sub>	16,25	a b
3	T <sub>4</sub>	14,75	a b
4	T <sub>3</sub>	14,25	b
5	T <sub>2</sub>	13,75	b
6	T <sub>1</sub>	13,25	b

**Fuente:** Elaboración propia.

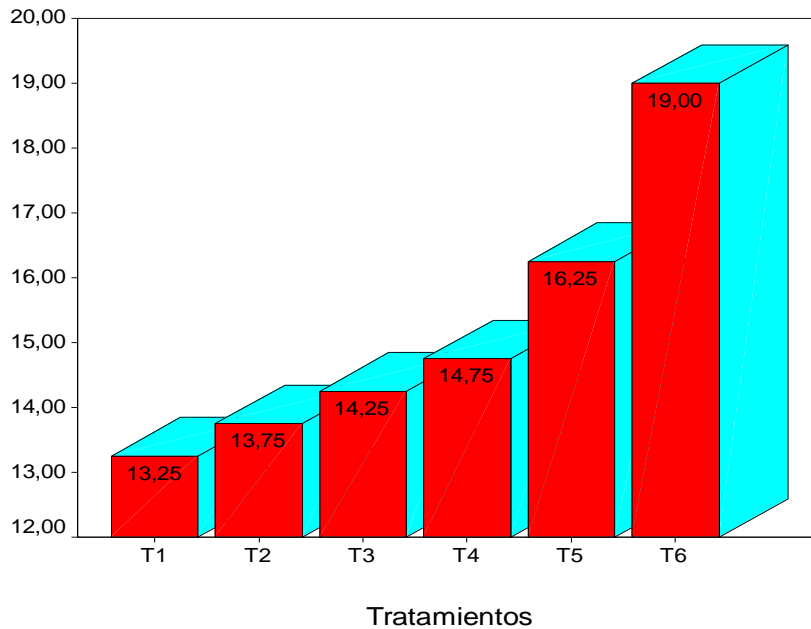
La prueba de significación de Tukey indica que el tratamiento T<sub>6</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>4</sub> lograron los mayores promedios con 19,00; 16,25 y 14,75 mm, siendo estadísticamente similares en sus promedios, el resto de tratamientos fueron estadísticamente similares, donde los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>1</sub> obtuvieron los menores promedios con 13,75 y 13,25 mm, respectivamente.

### Medias y 99,0 Porcentajes Intervalos de Confianza



**Gráfico 1.** Prueba de significancia de Tukey para la actividad antimicrobica del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” frente a *Candida albicans*.

En el gráfico 1 se muestra el gráfico de medias e intervalos de Tukey al 99,0 % no apreciándose diferencias estadística significativas entre los tratamientos; sin embargo, destacaron con los mayores promedios el T5 y T6.



**Gráfico 2.** Promedio de cada uno de los halos y los tratamientos del aceite esencial de *Tagetes minuta L.* en estudio frente a *Candida albicans*.

En la gráfico 2 se observa los promedios de cada uno de los tratamientos en estudio donde se determinó que el mayor promedio lo obtuvo el tratamiento T6 que alcanzó el mayor promedio de 19 mm. Los promedios más bajos correspondieron a los tratamientos T2 y T1 con 13,75 y 13,25 mm, respectivamente.

**CUADRO 11.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) producido por el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a *Candida albicans*.

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Turbidez
T1	1,5498 mg/μl	T
T2	1,7766 mg/μl	T
T3	1,9278 mg/μl	T
T4	2,1168 mg/μl	T
T5	2,343 mg/μl	T
T6	2,5326 mg/μl	T
T7	2,7216 mg/μl	T
T8	2,8728 mg/μl	NT
T9	3,0996 mg/μl	NT
T10	3,2886 mg/μl	NT
TP	Control Positivo	T
TN	Control Negativo	NT

**Fuente:** Elaboración propia.

T: Presenta turbidez.

NT: No Presenta turbidez.

El Cuadro 11 muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* L., donde se observa que a partir de la concentración de 2,8728 mg/ml se inhibe el crecimiento microbiano; pero no se nota a partir de 1,5498 mg/μl. Por tanto, el **MIC** para *Tagetes minuta* L. fue de 2,8728 mg/ml.

**Cuadro 12.** Concentración Mínima Fungicida (CMF) producido por el aceite esencial de *Tagetes minuta L.* “Huacatay” frente a *Candida albicans*.

Nº Tubos	Nº Placas	Conc. mg/ml	UFC/Placa	Observaciones
T8	P1	2,8728	10	
T9	P2	3,0996	4	
T10	P3	3,2886	0	<b>CMF</b>

**Fuente:** Elaboración propia.

El Cuadro 12 muestra la determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF), basándonos a partir de los resultados obtenidos del Cuadro 10; tomando los 3 primeros tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo 10 con la concentración de 3,2886 mg/ml hubo inhibición total del crecimiento microbiano; mientras que en el tubo 9 a una concentración de 3,0996 mg/ml hubo aun el crecimiento de 4 UFC y en el tubo 8 una concentración de 2,8728 mg/ml hubo un crecimiento de 10 UFC.

## V. DISCUSIÓN

Numerosas son las investigaciones que se han realizado encaminadas a la búsqueda de nuevos componentes con actividad antimicrobiana a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evolución de la actividad antimicrobiana en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello se han empleado técnicas “in vitro” dada la reproductibilidad de las mismas.

Diversos estudios en el campo de la Microbiología, Farmacología y Fitoquímica se están proyectando a comparar las propiedades curativas de muchas plantas en vista de la necesidad de ofrecer nuevas alternativas de tratamiento en base a los trabajos de investigación.

Dentro de las prioridades en investigación en salud en el Perú está el encontrar alternativas que promuevan o faciliten el acceso a la salud para todos en la Costa, Sierra y Selva del Perú (Alvarado, 1 989). Durante los últimos años, la medicina tradicional ha cobrado gran impulso y crédito creciente en todo el mundo. No obstante, una de las conclusiones más notables y reiteradas de las reuniones nacionales e internacionales celebradas sobre este tema es que existen factores que siguen

entorpeciendo su equipación con la medicina moderna. El reconocimiento de los valores teóricos y prácticos de la medicina tradicional es lento. Se desconoce la eficiencia y la seguridad de muchos medicamentos tradicionales, a pesar de que cada día aumenta más la cifra de ensayos clínicos que se realizan para estudiar esas características.

En el presente estudio se demostró las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay”, los cuales fueron ensayados en la prueba de difusión de disco o Kirby Bauer frente a una levadura oportunista representativo en la práctica médica, específicamente con *Candida albicans*.

Conociendo, empíricamente, algunas de sus propiedades medicinales de *Tagetes minuta* L. y su aplicación en diferentes áreas, fueron las razones que motivó el estudio de su aceite esencial. Para ello se realizó un pre-ensayo para observar si esta sustancia presentaba actividad antimicrobiana.

Muchos métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica, el test de difusión en agar es usado

en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas fastidiosas. Para el presente trabajo se incluyó el método estandarizado de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Comité for Clinical Laboratory Standars (NCCLS, 2002).

De acuerdo al estudio que se realizó al aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” en las instalaciones de la Universidad Católica Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Laboratorio de ensayo y control de calidad de Arequipa (Anexo 1 y 2), se encontró en forma cuantitativa la presencia de monoterpenos hidrocarbonados:  **$\beta$ -pineno** en un 1,54 % y limoneno en 3,47 % y monoterpenos oxigenados: tagetone o **2-methyl-octanol** en un 1,37 %, Bicyclo (3.1.1) hept-3-en-2-ine, 4,6 en un 5,31 %. Sin embargo, Kiran (2007), por cromatografía gaseosa detectó en el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” en forma cuantitativa principalmente la presencia de: limoneno 6,03 %,  $\beta$ -ocimene 49,27 % y tagetone en un 0,42 %. Por lo tanto, la acción antimicótica demostrada por el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” se basaría en estos compuestos bioactivos, básicamente monoterpenos, los cuales tienen propiedades antimicóticas.

Los ensayos de susceptibilidad están basados en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño (halo). Los resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zona, correlacionados con la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos.

Para la interpretación de los resultados se consideraron como referencia las pautas dadas por Duraffourd, 1983, que indica la actividad de los aceites esenciales como: **Nula**, para un diámetro inferior o igual a 9 mm, **sensible** entre 9 a 14 mm, sensibilidad media o **muy sensible** entre 15 a 19 mm, y finalmente, para un diámetro igual o superior a 20 mm la sensibilidad es considerada como **sumamente sensible** (Duraffourd, 1983).

En el presente trabajo de investigación se demostró las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Tagetes minuta L.*, los cuales fueron ensayados por el método de difusión en disco por su fácil aplicación en laboratorio, donde los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la actividad exhibida por el aceite esencial frente a un hongo

dimorfo oportunista como es ***Candida albicans***. Este estudio señaló que ***Candida albicans*** fue muy sensible frente al aceite esencial de ***Tagetes minuta* L.**

De los resultados obtenidos en el Cuadro 07, para ***Candida albicans***, se puede apreciar que la sensibilidad empezó a partir del tratamiento T1 (1,575 mg/ml) formando un diámetro de halo promedio de 13,25 llegando hasta generar un halo promedio de 19,0 mm, tratamiento T6 (3,15 mg/ml).

Marca (2012) demostró que ***Candida albicans*** es una levadura susceptible a los aceites esenciales de la canela y que por lo tanto, presenta un actividad antimicótica frente a los aceites esenciales de ciertas plantas. Los resultados obtenidos con el “huacatay” podrían deberse a la composición de la membrana del hongo y su interacción con los componentes fitoquímicos del aceite esencial de “huacatay” como el limoneno y el  $\beta$ -pineno que se presume penetró rápidamente las células de la levadura, indicando que el efecto fungicida resultaría de una extensiva lesión de la membrana celular del hongo (Anexo 01).

Así mismo, se observó en los Cuadros 06 y 07, que a partir del

tratamiento T1 (1,575 mg/ml) los halos de inhibición fueron notorios en el estudio *in vitro* que se realizó, concluyendo que inhibían a esa concentración a la especie micótica ensayada. Por lo tanto, el aceite esencial de ***Tagetes minuta* L.** “huacatay” inhibe el crecimiento del hongo que se ha usado en el presente estudio. En función de sus características lipofílicas como el  $\beta$ -pineno, éste podría interactuar con las enzimas de la membrana e interferir procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos. Se conoce que el limoneno, el  $\alpha$ -pineno y el  $\beta$ -pineno inhiben el consumo de oxígeno en las células. (Peñuelas *et al.*, 1996)

En este contexto, se puede hipotetizar que la actividad antimicótica observada en este trabajo podría ser atribuida a una interacción o efecto sinérgico de los principios activos como el  $\alpha$ -pineno y el  $\beta$ -pineno (Bruneton, 1994), cuya acción es la de provocar lesiones en la membrana citoplasmática y de esa manera evitar la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos, ocasionando alteraciones en la composición interna de la célula micótica (Hernández, 1991).

Al efectuar el análisis de varianza (ANDEVA) para el promedio de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos sobre ***Candida albicans***

(Cuadro 07), se observa que comparando estadísticamente mediante análisis de varianza, según el Cuadro 09, con niveles de confiabilidad al 99 %, se demuestra que no existen diferencias estadísticas a nivel de los halos, es decir fueron uniformes para las concentraciones utilizadas del aceite esencial de *Tagetes minuta L.* frente a *Candida albicans*; con un coeficiente de variabilidad 10,69 % siendo aceptable como un máximo de 15 % para condiciones de laboratorio en el análisis de varianza; sin embargo, para los tratamientos se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas, por lo que se deduce que existe evidencia estadística para señalar que los diferentes tratamientos del aceite esencial de ***Tagetes minuta L.*** influyeron directamente sobre la levadura ***Candida albicans***.

Al realizar la prueba de significación de Tukey, ésta indicó las diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos, los cuales según el Cuadro 10, se confirmó que el tratamiento T6 (3,15 mg/ml) tuvo mayor actividad antimicótica, con un halo de inhibición de 19,0 mm, siendo estadísticamente similares con el T5 y T4 (ver Anexo 01).

Como se puede observar, en el Cuadro 11, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), para ***Candida albicans*** fue de 2,8728 mg/ml en el tubo

8; por lo que se puede inferir que el aceite esencial presentó una actividad antimicótica frente a ***Candida albicans***, donde se observa que a partir de la concentración de 2,8728 mg/ml (tubo 8) hasta la concentración de 3,2886 mg/ml (tubo 10) inhibió el crecimiento micótico, ya que los tubos con dichas concentraciones no presentan turbidez alguna, como sí lo presenta los tubos del 1 al número 7, evidenciando un crecimiento micótico a partir de la concentración de 1,5498 mg/ml (tubo 1).

Así mismo, se determinó la Concentración Mínima Fungicida (CMF), a partir de las diluciones que salieron positivas en el MIC (ver Cuadro 12), se pudo estimar que CMF para ***Candida albicans*** fue <1 UFC, que se observó en la placa 03 con agar PDA (agar papa dextrosa), con una concentración de 3,2886 mg/ml, donde se apreció la inhibición absoluta del crecimiento de ***Candida albicans***; mientras que en placa 02 con el medio PDA, a una concentración de 3,0996 mg/ml, hubo aun el crecimiento de 4 UFC y en el tubo 08 o placa 01 una concentración de 2,8728 mg/ml hubo un crecimiento de 10 UFC.

Trabajos similares se han realizado en distintos países, por ejemplo, en Brasil, Juliana Moura Mendes y colaboradores (2011) investigaron la “Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre

cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos”, La CIM y CMF del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* fueron 0,512 y 1,024 mg/ml, respectivamente; al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio para *Candida albicans* se encontró un CMI de 2,8728 mg/μl y CMF de 3,2886 mg/ml. Esta diferencia podría deberse que aún cuando se trata de la misma especie fúngica, el poder antimicótico presenta diferencias entre los compuestos fitoquímicos presentes en las plantas (Perú - Brasil).

En Perú, Huamaní Achata, María Elena y Ruiz Quiroz, Julio Reynaldo (2005), en el trabajo “Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de tres departamentos del Perú”; La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans* ATCC 10231, fue de 0,25 mg/ml para *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels (nogal), *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* y de 0,5 mg/ml para *Piper spp.* Al comparar los resultados obtenidos con los nuestros para ***Candida albicans***, con un CMI de 2,8728 mg/ml con respecto al aceite esencial de ***Tagetes minuta* L.** “huacatay”, se observó una menor actividad de nuestra planta, por presentar una mayor concentración del

aceite esencial probablemente por tener una diferente composición fitoquímica y métodos extractivos.

Además de la complejidad de los aceites, hay evidencia que el tiempo de cosecha influye en la composición del aceite y su actividad biológica, otros factores como el genotipo, origen geográfico, ambiental y condiciones agroeconómicas, pueden haber influir en la composición del producto natural. Del mismo modo, depende también de la forma de tratamiento de la especie vegetal como del método utilizado para su extracción (Svoboda, 1999).

La sensibilidad de *Candida albicans* frente al espectro de inhibición del aceite esencial de “huacatay” pudiese también ser explicado por los mecanismos de daño a la pared celular fúngica, debido al incremento de su permeabilidad y la afectación de su estructura, que como consecuencia tendría lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular. Este daño se podría generar por la desestabilización de la pared celular compuesta por manan, glucan y quitina, debido a la interacción de los terpenos presentes en el aceite esencial, con las moléculas de la pared.

El estudio presente demostró que el potencial antimicrobiano del aceite esencial de ***Tagetes minuta* L.** no dependería solo de la composición química del aceite, sino también de la estructura celular del microorganismo.

En general, los resultados sugieren la realización de mayores estudios *in vitro* e *in vivo* considerando las diferentes especies, para determinar susceptibilidades de cada una de ellas, ampliando otros métodos de extracción, utilizando diferentes partes del vegetal o, en su defecto, realizar un estudio fitoquímico empleando otras especies botánicas en especial con las autóctonas registradas en nuestra región.

Por ello, los resultados del presente estudio permitieron confirmar que las hojas y tallos de ***Tagetes minuta* L.** “huacatay” es productora de compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados, con efecto antibacteriano *in vitro* frente a ***Candida albicans***.

## VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que el aceite esencial de la planta ***Tagetes minuta L*** presenta compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos, compuestos derivados de alcoholes; con efecto antimicótico *in vitro* frente a ***Candida albicans***.
- El aceite esencial de ***Tagetes minuta L*** “huacatay” frente a ***Candida albicans***, produjo un diámetro de halo de inhibición promedio de 19,0 mm a mayor concentración y de 13,25 mm a menor concentración.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial de ***Tagetes minuta L*** “huacatay” frente a ***Candida albicans*** fue de **2,8728 mg/ml**.
- La Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de ***Tagetes minuta L***. “huacatay” frente a ***Candida albicans*** fue de **3,2886 mg/ml**.

## VII. RECOMENDACIONES

- Se debe valorar la actividad antimicrobiana del aceite esencial ***Tagetes minuta L.*** “huacatay” frente a otros microorganismos, de tal modo, se cubrirá casi todo el espectro microbiano para convertirse en una alternativa natural.
- Se recomienda realizar otro tipo de extracción de ***Tagetes minuta L.*** “huacatay”, para las pruebas de comparación, como del extracto acuoso, hidroalcohólico, y de este modo lograr cuán efectivas son las diferentes extracciones y cómo variarán su espectro antimicrobiano frente a microorganismos de importancia clínica.
- Corroborar, luego del estudio *in vitro* en animales de laboratorio, su efecto antibacteriano en ensayos clínicos. Para de esta manera, continuar con estudios de toxicidad subaguda, toxicidad crónica, teratogenicidad y sus efectos adversos.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ALVARADO, CH. 1989.** Plantas medicinales del Perú. Editorial - CONCYTEC. Lima – Perú.
2. **ARAUJO, J.; DÍAZ R. & SALAS, A. 2008.** Actividad antimicrobiana de plantas. Universidad Científica del Sur. Rev. Científica del Sur. Fondo Editorial de la UCS.
3. **BARH, R. F. 1988.** Plantas medicinales. Virtudes insospechadas de plantas conocidas. Ediciones Readers Digest. México, D. F., Pág. 63-87.
4. **BRACK, A. & HEINZ, P. 2002. PERÚ MARAVILLOSO.** Edit. Epenza.1. Empresa Periodística Nacional SAC. Lima – Perú.
5. **BURROYS, WILLIAM. 1969.** “Tratado de Microbiología”- 19<sup>va</sup> edición, Editorial Interamericana S.A.
6. **CHOQUEHUANCA, G. L. 2004.** Tesis “Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Satureja boliviana*, “muña” frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas”. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias

biológicas y agropecuarias - Escuela Académica Profesional de Biología. Arequipa-Perú

7. **CONA, E. 2002.** Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante el Test de Difusión en Agar. Rev Chil Infec. Vol. 19. Pág. 77-81.
8. **CONNER, D. 1993. NATURALLY OCCURRING COMPOUNDS.** En A. Branen & P. Davison (Eds.). Antimicrobials in foods. 2<sup>th</sup> edition) (p. 441-468) New York: Marcel Dekker, Inc.
9. **CRONQUIST, A. 1981.** An integrated system of classifications of flowering plant. Columbia University Press New York 1262 pp.
10. **DEL FUEYO, G. M. 1986.** Ontogenia de las glándulas foliares e involucrales de *Tagetes minuta* (Compositae). Bol. Soc. Argent. Bot.
11. **DIXON DM, RHODES JC, FROMTLING R.A. (1999).** Taxonomy, classification, and morphology of fungi. In Murray PR et al, ed 7, editors: *Manual of clinical microbiology*, Washington, DC, American Society for Microbiology.
12. **DURAFFOURD, C. & J., LAPRAZ. 1983.** Cuaderno de Fitoterapia

Clínica. Editorial Masson – Francia.

13. **GONZÁLEZ, P. 1984.** "Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales", Universidad de La Salle, Bogotá, Capítulo VI.
14. **GRANADOS, R. & VILLAVERDE, C. 1996.** Bacteriología. Características y clasificación bacteriana y Virología. Características y técnicas bioquímicas. Editorial Paraninfo Magallanes - Madrid.
15. **HERNANDEZ, L. 2003.** Actividad inhibitoria letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. Innocua*.
16. **KALEMBA, D. & KUNICKA, A. 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10, pp.813-829.
17. **Kiran G.D. Babu , V.K. Kaul. 2007.** Variations in quantitative and qualitative characteristics of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) oils distilled under vacuum and at NTP.
18. **KONEMAN. ALLEN. JANDA. 1987.** "Diagnóstico Microbiológico"- Texto y Atlas en color-6<sup>ta</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana.

- 19. KONEMAN, E. W.; ALLEN, M.D.; STEPHEN, D.; & WILLIAM, M. 2004.** Diagnóstico Microbiológico. 5<sup>ta</sup> edición. Editorial Médica Panamericana S. A. Madrid - España.
- 20. LEHMAN (1998).** PF: Fungal structure and morphology. In Ajello L, Hay RJ, vol 4, editors: Topley and Wilsons Microbiology and microbial diseases, Medical mycology. London.
- 21. MARTINEZ, A. 2001.** Aceites Esenciales. Facultad de Química Farmacéutica. Medellin. [amart@muisca.udea.edu](mailto:amart@muisca.udea.edu).
- 22. MOSCOSO CASTILLA M. 2002.** Secretos Medicinales de la flora peruana y guía de maternidad, 4<sup>ta</sup> edición: Editorial Mundi-Prensa. España: Madrid.
- 23. MURRAY PATRICIA R, ROSENTHAL KEN S. 2012.** Microbiología Médica. 4<sup>ta</sup> Edición- Elsevier Science Impr. Mosby.
- 24. NATIONAL COMITÉ FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard..

- 25. NYCHAS, J. 1995.** Natural antimicrobials from plants. En: Gould G W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation* p. 59-89. London: Chapman & Hall.
- 26. OMS. 1979.** Plantas medicinales: un modelo de curación, clasificación popular correlativa de plantas y enfermedades en una comunidad rural andino-venezolano. Informes técnicos. Vol. II N° 6.
- 27. PONTÓN J., MORAGUES MD, GENÉ J, GUARRO J, QUINDÓS G. 2002.** Revista iberoamericana de micología: Hongos y actinomicetos alergénicos. España: Bilbao.
- 28. SIMON, P.; M., L. KATINAS & A. M., ARAMBARRI. 2002.** Secretory structures in *Tagetes minuta*.
- 29. SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE INFORMACIÓN CIENTÍFICA (SIIC) 2002.** Disponible en:  
<http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb534.htm>
- 30. STROTHER, J., 2006.** *Tagetes*. En: Barkworth, M. E., K. M. Capels, S. Long et. M. B. Piep (Eds.). *Flora of North America*. Vol. 21. New York and Oxford.
- 31. SVOBODA, K. and J., HAMPSON. 1999.** Bioactivity of essential oil of selected temperate aromatic plants. *Plant Biology*

departamentet SAC, Auchincruive, Ayr, Scotland, UK.

**32. UICN-OMS-WWF. 1993.** Directrices sobre Conservación de plantas medicinales. Organización Mundial de la Salud (OMS). Unión internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) *and* Worldlife Fund, Gland. pp 55.

**33. VAN GINKEL, A. 2003.** Apuntes del Master y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.”

## IX. ANEXOS

### ANEXO 1. Partes de *Tagetes minuta* L. (huacatay)



**A**

A. Flores *Tagetes minuta* L.



**B**

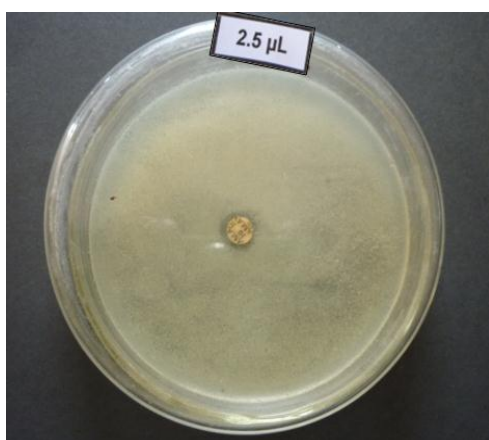
B. Ramas y hojas de *Tagetes minuta* L.

**ANEXO 2.** Equipo de extracción para el aceite esencial de la planta *Tagetes minuta* L. “huacatay” mediante el método de arrastre con vapor de agua.

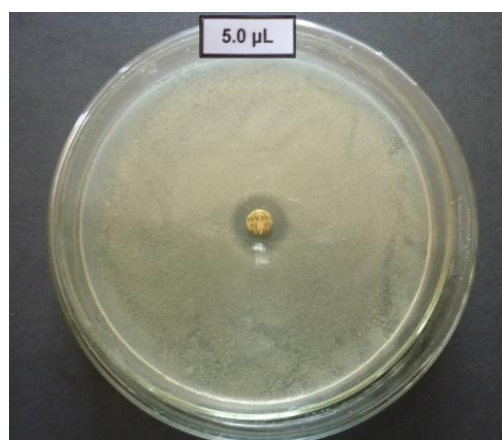


**Fuente.** Elaboración propia

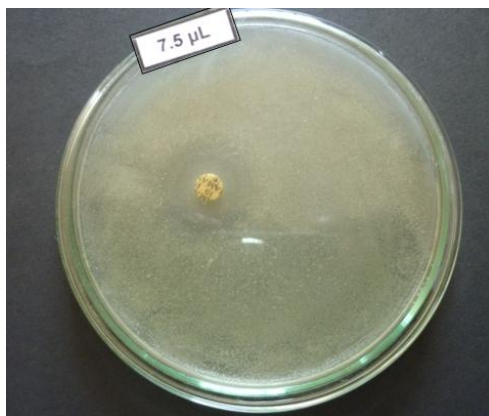
**ANEXO 3.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. "huacatay" por el método de difusión en disco (Kirby Bauer)



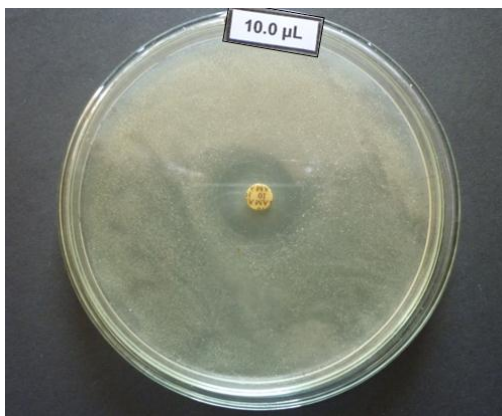
**a)**



**b)**



**c)**

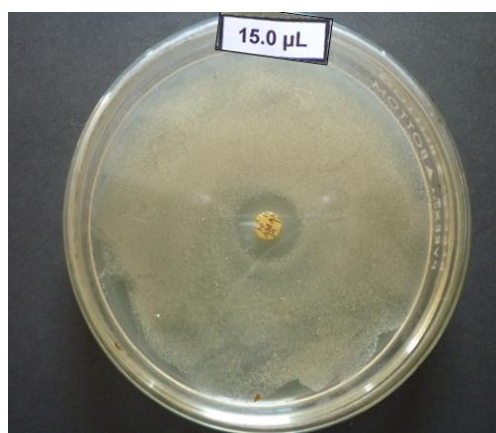


**d)**

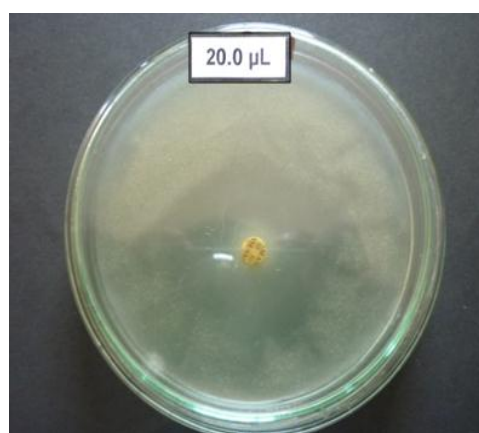
**Fuente.** Elaboración propia

**(Continua)**

**ANEXO 3.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. "huacatay" por el método de difusión en disco (Kirby Bauer)



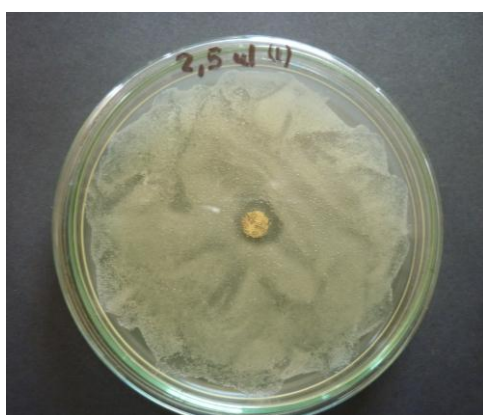
**e)**



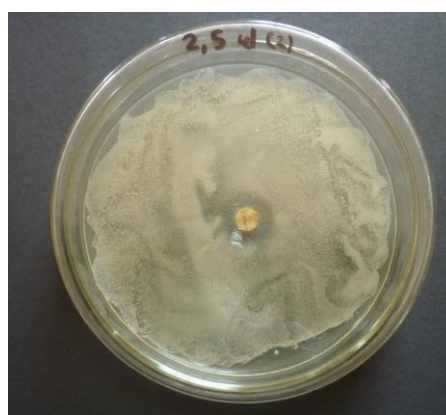
**f)**

**Fuente.** Elaboración propia

**ANEXO 4.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. "huacatay" de 2,5 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).



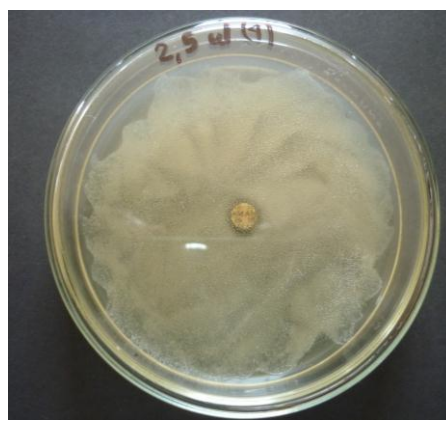
**a)**



**b)**



**c)**



**d)**

**a)** 13,0 mm;

**b)** 16,0 mm;

**c)** 13,0 mm;

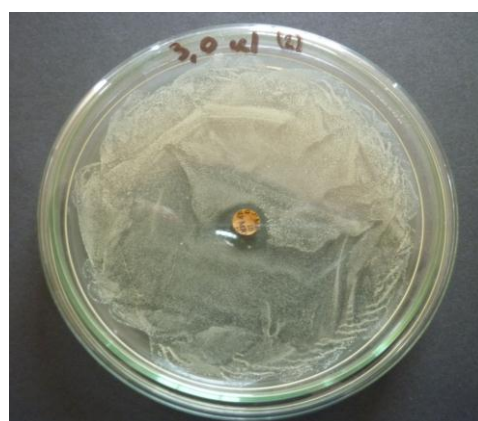
**d)** 11 mm.

**Fuente.** Elaboración propia

**ANEXO 5.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. “huacatay” de 3,0 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).



**a)**



**b)**



**c)**



**d)**

**a)** 13,0 mm;

**b)** 14,0 mm;

**c)** 13,0 mm;

**d)** 15,0 mm.

**Fuente.** Elaboración propia

**ANEXO 6.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. "huacatay" de 3,5  $\mu$ l por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).



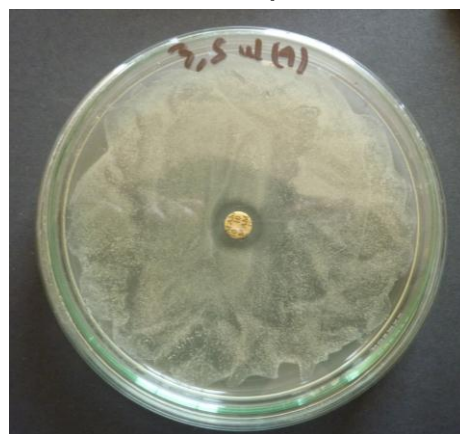
**a)**



**b)**



**c)**



**d)**

**a)** 14,0 mm;    **b)** 14,0 mm;    **c)** 16,0 mm;    **d)** 13,0 mm.

**Fuente.** Elaboración propia

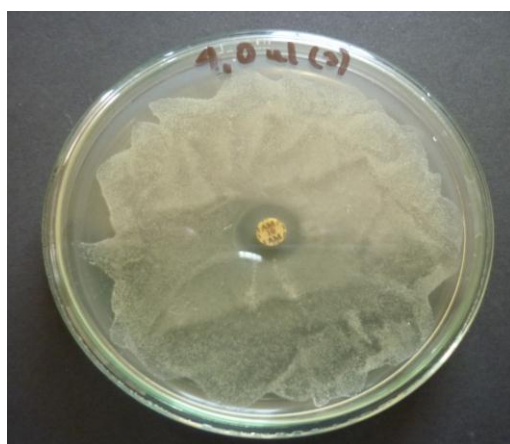
**ANEXO 7.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. “huacatay” de 4,0 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).



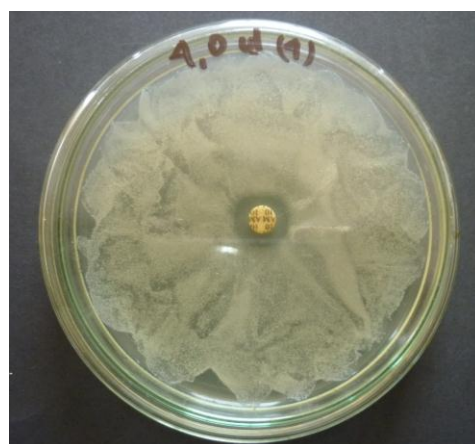
a)



b)



c)



d)

a) 14,0 mm;

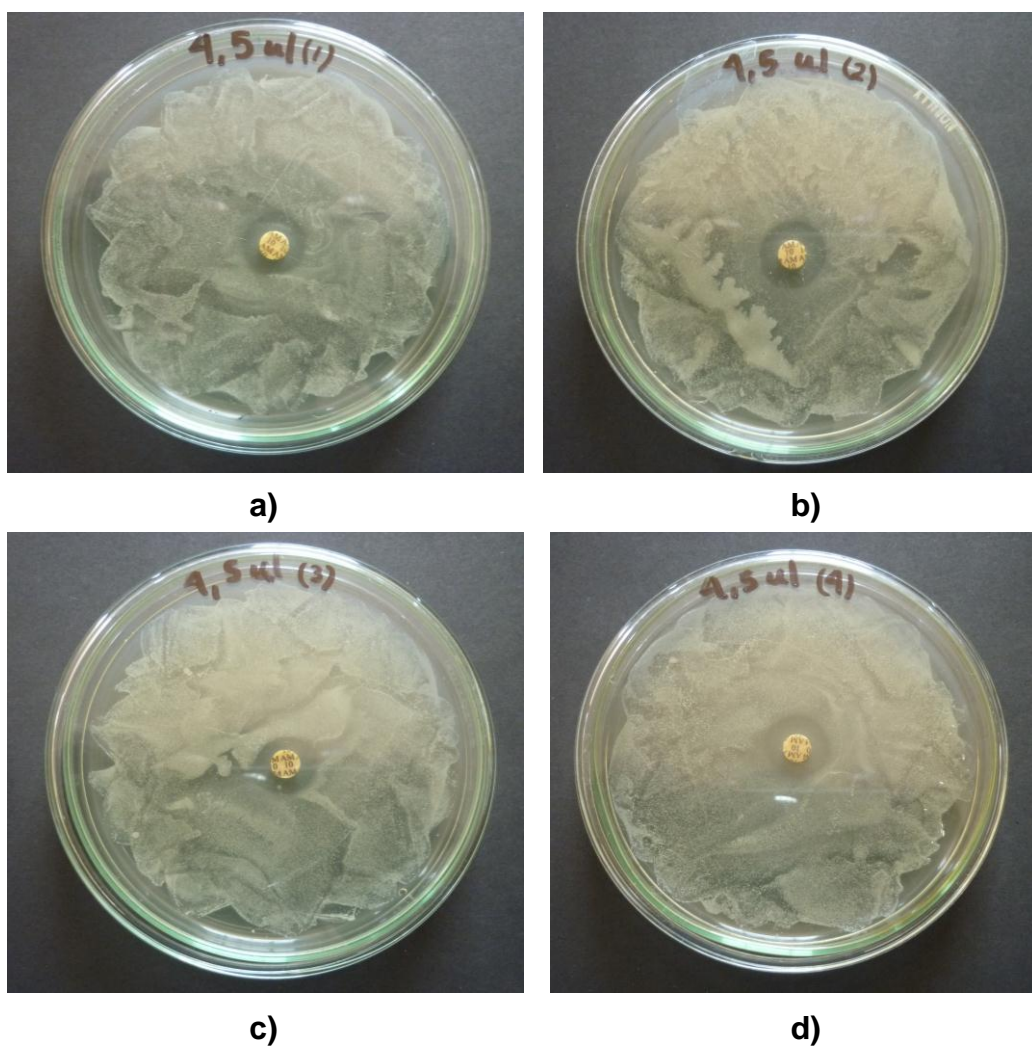
b) 15,0 mm;

c) 16,0 mm;

d) 14,0 mm.

**Fuente.** Elaboración propia

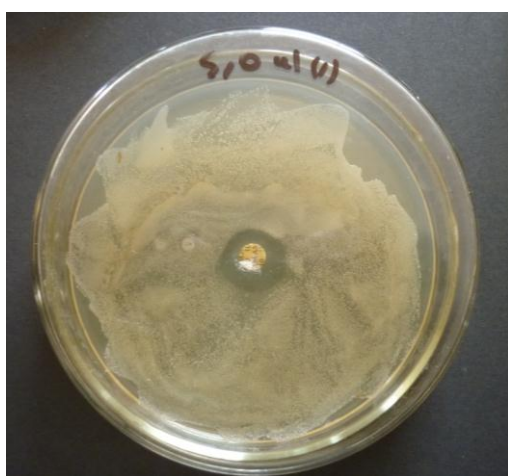
**ANEXO 8.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. "huacatay" de 4,5  $\mu$ l por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).



a) 16,0 mm;      b) 16,0 mm;      c) 17,0 mm;      d) 16,0 mm.

**Fuente.** Elaboración propia

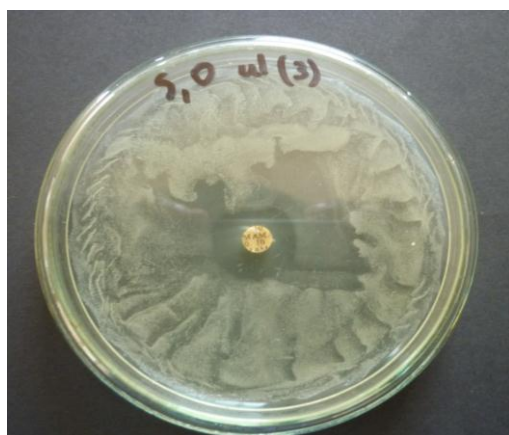
**ANEXO 9.** Susceptibilidad de *Candida albicans* frente al aceite de *Tagetes minuta* L. "huacatay" de 5,0 µl por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).



**a)**



**b)**



**c)**

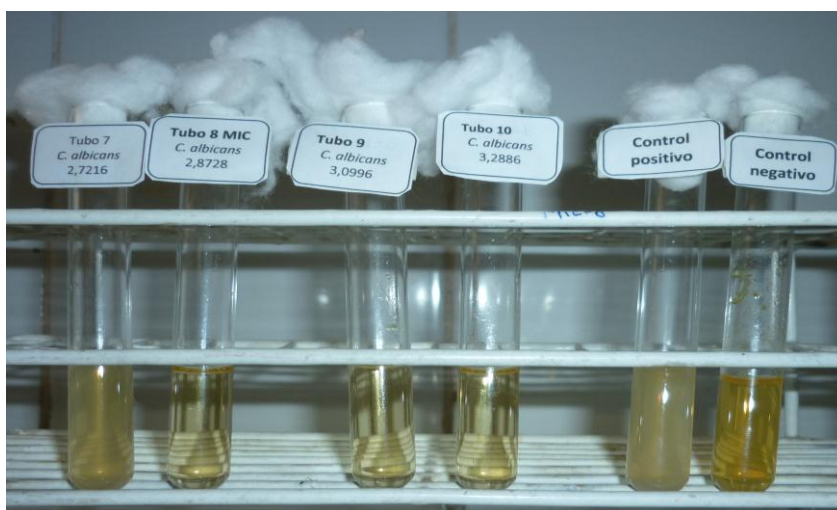
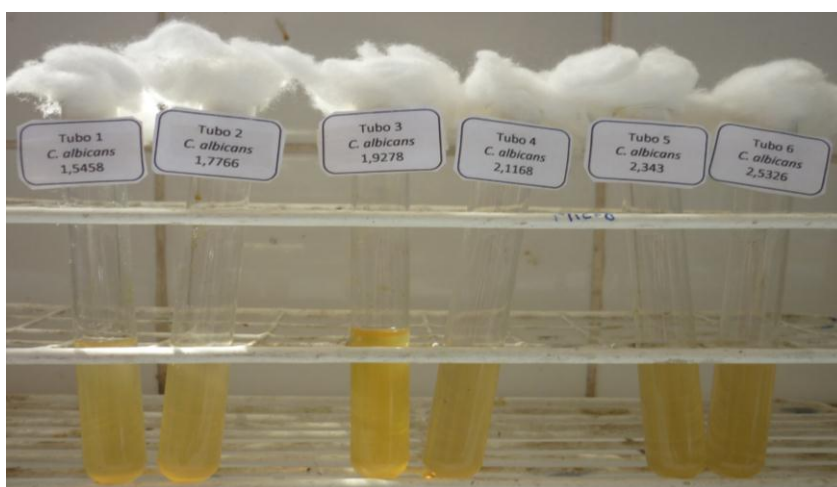


**d)**

**a)** 21,0 mm;    **b)** 22,0 mm;    **c)** 16,0 mm;    **d)** 17,0 mm.

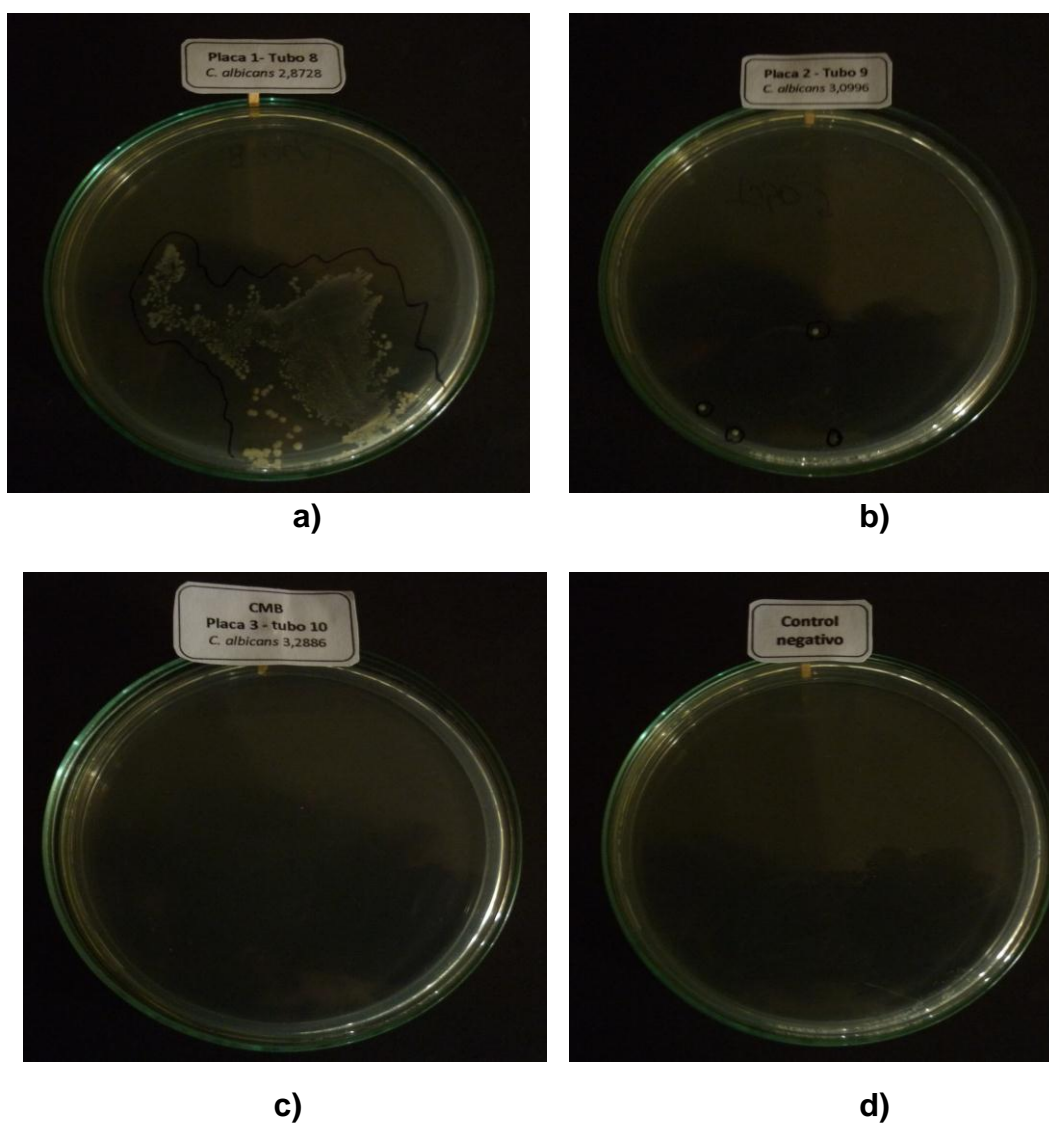
**Fuente.** Elaboración propia

**ANEXO 10.** Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. para *Candida albicans* con sus respectivos controles.



**Fuente.** Elaboración propia

**ANEXO 11.** Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. para *Candida albicans*.



\* Obsérvese ausencia de UFC a partir de la placa N° 3 (c).

**Fuente.** Elaboración propia



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 251210 ANEXO 1166  
 ✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
 AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA19H14.001338**

<b>Nombre del Cliente</b>	: LUIS ANDRE TUYO LLIPITA
<b>Dirección del Cliente</b>	: CALLE PIZARRO 943 PARA CHICO TACNA
<b>RUC</b>	: NO CORRESPONDE
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: ACEITE ESENCIAL DE HUATACAY <i>Tagetes minuta</i>
<b>Tamaño de muestra</b>	: 5 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 19/08/2014
<b>Fecha de Ejecución del ensayo</b>	: 19/08/2014
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 25/08/2014
<b>Página</b>	: 1 de 2

**I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO																																						
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS (DENOMINACION NIST)	.beta.-Pinene 1-Decene Undecane Limonene Undecane 2-Phenylpropyl butyrate Undecane 1-Octanol, 2-methyl- 4-Octyne-3,6-diol Nonane, 5-butyl- 1-Dodecene Dodecane Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6, 2-Decenal, (E)- Tridecane 2-Undecenal 1-Tridecene																																						
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (ÁREA)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>.beta.-Pinene</td><td>1,54</td></tr> <tr><td>1-Decene</td><td>4,25</td></tr> <tr><td>Undecane</td><td>3,8</td></tr> <tr><td>Limonene</td><td>3,47</td></tr> <tr><td>Undecane</td><td>2,33</td></tr> <tr><td>2-Phenylpropyl butyrate</td><td>1,7</td></tr> <tr><td>Undecane</td><td>6,27</td></tr> <tr><td>1-Octanol, 2-methyl-</td><td>1,37</td></tr> <tr><td>4-Octyne-3,6-diol</td><td>1,68</td></tr> <tr><td>Nonane, 5-butyl-</td><td>1,38</td></tr> <tr><td>1-Dodecene</td><td>17,76</td></tr> <tr><td>Dodecane</td><td>3,09</td></tr> <tr><td>Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,</td><td>5,31</td></tr> <tr><td>2-Decenal, (E)-</td><td>1,2</td></tr> <tr><td>Tridecane</td><td>1,54</td></tr> <tr><td>2-Undecenal</td><td>1,93</td></tr> <tr><td>1-Tridecene</td><td>41,4</td></tr> <tr><td></td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Name	%	.beta.-Pinene	1,54	1-Decene	4,25	Undecane	3,8	Limonene	3,47	Undecane	2,33	2-Phenylpropyl butyrate	1,7	Undecane	6,27	1-Octanol, 2-methyl-	1,37	4-Octyne-3,6-diol	1,68	Nonane, 5-butyl-	1,38	1-Dodecene	17,76	Dodecane	3,09	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,	5,31	2-Decenal, (E)-	1,2	Tridecane	1,54	2-Undecenal	1,93	1-Tridecene	41,4		100
Name	%																																						
.beta.-Pinene	1,54																																						
1-Decene	4,25																																						
Undecane	3,8																																						
Limonene	3,47																																						
Undecane	2,33																																						
2-Phenylpropyl butyrate	1,7																																						
Undecane	6,27																																						
1-Octanol, 2-methyl-	1,37																																						
4-Octyne-3,6-diol	1,68																																						
Nonane, 5-butyl-	1,38																																						
1-Dodecene	17,76																																						
Dodecane	3,09																																						
Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,	5,31																																						
2-Decenal, (E)-	1,2																																						
Tridecane	1,54																																						
2-Undecenal	1,93																																						
1-Tridecene	41,4																																						
	100																																						





**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

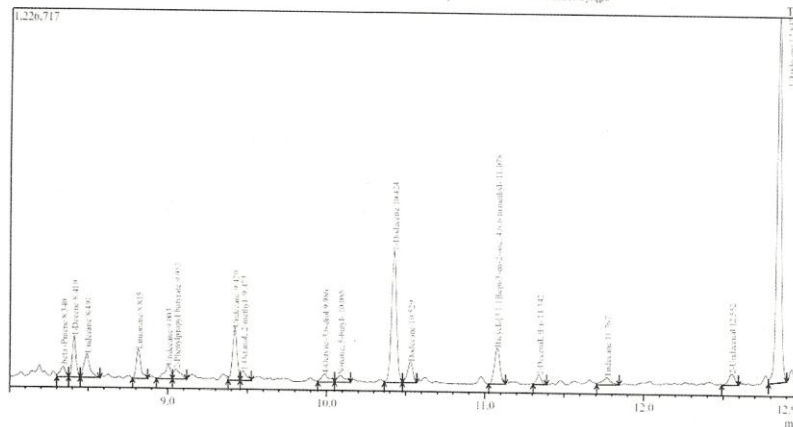
Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 251210 ANEXO 1166  
 ✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
 AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA19H14.001338**

**Nombre del Cliente** : LUIS ANDRE TUYO LLIPITA  
**Dirección del Cliente** : CALLE PIZARRO 943 PARA CHICO TACNA  
**RUC** : NO CORRESPONDE  
**Condición del Muestreado** : POR EL CLIENTE  
**Descripción** : ACEITES ESENCIAL DE HUATACAY  
*Tagetes minuta*  
**Tamaño de muestra** : 5 mL  
**Fecha de Recepción** : 19/08/2014  
**Fecha de Ejecución del ensayo** : 19/08/2014  
**Fecha de Emisión de Informe** : 25/08/2014  
**Página** : 2 de 2

Chromatogram huatcacay C:\GCMSolution\Data\Project1\muestras control huatcacay.gcd



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	8.340	8.309	8.375	82795	1.54	34769	1.36	2.38	V	beta-Pinene
2	8.410	8.375	8.450	228718	4.25	124547	5.26	1.70	V	1-Decene
3	8.491	8.450	8.575	204657	3.89	77218	3.02	2.65	V	Undecane
4	8.815	8.780	8.875	186879	3.47	95740	3.74	1.95	V	Limonene
5	9.003	8.930	9.030	125343	2.33	45047	1.76	2.78	V	Undecane
6	9.053	9.030	9.120	91522	1.70	32083	1.25	2.85	V	2-Phenylpropyl butyrate
7	9.420	9.380	9.455	337581	6.27	171529	6.71	1.97	V	Undecane
8	9.473	9.455	9.525	73566	1.37	30905	1.21	2.38	V	1-Octanol, 2-methyl-
9	9.980	9.945	10.050	69335	1.08	26284	1.03	3.44	V	4-Octyne-3,6-diol
10	10.085	10.050	10.150	74547	1.38	21741	0.85	3.43	V	Nonane, 5-butyl-
11	10.424	10.365	10.480	956419	17.76	430109	16.82	2.22	V	1-Dodecene
12	10.529	10.480	10.570	166161	3.09	68688	2.69	2.42	V	Dodecane
13	11.078	11.025	11.130	285653	5.31	118298	4.63	2.41	V	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6
14	11.342	11.305	11.290	64433	1.20	29298	1.15	2.20	V	2-Decenal, (E)-
15	11.767	11.705	11.845	82649	1.54	22548	0.88	3.67	V	Tridecane
16	12.552	12.490	12.595	103992	1.93	35555	1.39	2.92	V	2-Undecenal
17	12.847	12.785	12.900	2229018	41.40	1182263	46.24	1.89	V	1-Tridecene
				5384268	100.00	2556613	100.00			

**OBSERVACIONES:**

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-SNA

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez  
 COFDA 00624  
 JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

## CONSTANCIA


EL JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL “HIPÓLITO UNANUE” DE TACNA

HACE CONSTANCIA:


Que al **SR. LUIS ANDRE TUYO LLIPITA**, en el mes de Setiembre del 2013, se le proporciono una CEPA de *Candida albicans* para realizar su Tesis denominada “ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TAGETES MINUTA (HUACATAY) FRENTE A CANDIDA ALBICANS”.

SE EXPIDE DICHA CONSTANCIA A SOLICITUD DEL INTERESADO.

TACNA, 17 DE SETIEMBRE DEL 2015

  
GOBIERNO REGIONAL TACNA  
DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD  
HOSPITAL HIPÓLITO UNANUE DE TACNA  
PABLO CORONADO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

CWRA/PACC/Bárbara



---

Asesor  
Dr. César Julio Cáceda Quiróz



---

Tesista  
Bach. Luis André Tuyo Llipita