

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes elliptica* SMITH “CHINCHO” Y ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA

Chemical composition of essential oil from *Tagetes elliptica* Smith “chincho” and antioxidant, antibacterial and antifungal activities

Ingrid K. Segovia B.¹, Lucybel L. Suárez de la Cruz¹, Américo J. Castro L.¹, Silvia Suárez C.², Julio R. Ruiz Q.³,

¹ Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” Facultad de Farmacia y Bioquímica.

² Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” – Facultad de Medicina. ³ Instituto de Microbiología y Parasitología “Simón Pérez Alva” Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad determinar cualitativamente los componentes químicos, así como las actividades antibacteriana, antifúngica y antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Tagetes elliptica* Smith “chincho”, oriundo de la provincia de Huaraz, región Ancash; el cual se obtuvo por el método de destilación por arrastre con vapor de agua. Posteriormente se determinaron las constantes fisicoquímicas, y luego se hizo la determinación de su composición química por cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/EM). Por los métodos de difusión en agar y dilución en agar se determinaron las actividades antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria (CMI), respectivamente, frente a los siguientes microorganismos: *S. aureus* ATCC 25933, *S. epidermidis* (cepa clínica), *B. subtilis* (cepa ambiental), *E. coli* (cepa clínica), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* (cepa clínica) y *C. albicans* ATCC 10231. En las pruebas realizadas, el aceite esencial evidenció actividad antibacteriana frente a cinco cepas, mostrándose *Klebsiella* resistente debido a que presentó un halo de inhibición menor de 18 mm; frente a *Candida albicans* ATCC 10231, demostró actividad antifúngica significativa. La CMI frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* fue de $7,62 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$; para *S. epidermidis* $97,5 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$; para *B. subtilis* $390 \mu\text{g/mL} \times 10^{-1}$ y para *C. albicans* $780 \mu\text{g/mL} \times 10^{-1}$. Respecto a la actividad antioxidante, se realizaron dos pruebas de captación de radicales libres denominadas: captación del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) y captación del radical superóxido producido por pirogalol; obteniéndose los siguientes resultados: $\text{IC}_{50}=97,5 \mu\text{g/mL}$ e $\text{IC}_{50}= 47,5 \mu\text{g/mL}$; respectivamente, los cuales no fueron significativos, teniendo en cuenta los patrones de Trolox y Vitamina C, respectivamente.

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

SUMMARY

The present research was aimed to determine qualitatively the chemical constituents and antibacterial, antifungal and antioxidant activity of essential oil from leaves of *Tagetes elliptica* Smith “chincho”, native of the province of Huaraz, Ancash region, which was obtained by the method of distillation with water vapor. Later physicochemical constants were determined, and then made the determination of chemical composition by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC/MS). By the methods of agar diffusion and agar dilution were determined antimicrobial activities and minimum inhibitory concentration (MIC), respectively, against the following microorganisms: *S. aureus* ATCC 25933, *S. epidermidis* (clinical isolate), *B. subtilis* (environmental strain), *E. coli* (clinical isolate), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* (clinical isolate) and *C. albicans* ATCC 10231. In tests, the essential oil evidenced antibacterial activity against five strains, being resistant *Klebsiella* because it showed an inhibition zone <18 mm; against *Candida albicans* ATCC 10231, showed significant antifungal activity. The MIC against *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* was $7,62 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ and *S. epidermidis*, $97,5 \mu\text{g/mL}$; to *B. subtilis* $390 \mu\text{g/mL}$ and *C. albicans* $780 \mu\text{g/mL}$. With regard to antioxidant activity, there were two tests known as free radical scavenging: Capturing the difenilpicrilhidrazil radical (DPPH) and superoxide radical uptake produced by pyrogallol, with the following results: $\text{IC}_{50} = 97,5 \mu\text{g/mL}$ and $\text{IC}_{50} = 47,5 \mu\text{g/mL}$; respectively, which were not significant, taking into account patterns of Trolox and Vitamin C, respectively.

Keyword: *Tagetes elliptica*, essential oils, antimicrobial activity, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Perú posee una rica variedad en especies vegetales, debido a las condiciones geográficas favorables de la Cordillera de

los Andes, la existencia de tres regiones geográficas y la diversidad de pisos ecológicos ⁽¹⁾.

Los aceites esenciales son una compleja mezcla natural de metabolitos secundarios volátiles, aislados

de plantas mediante métodos como destilación, extracción con solventes, etc. Los principales constituyentes de los aceites esenciales son mono y sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos, éteres, aldehídos y cetonas, los que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de las plantas medicinales. Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades farmacológicas, demostrando propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes y anticancerígenas. Otras cumplen actividad biocida contra diversos organismos como virus, protozoos, insectos y plantas. Durante mucho tiempo se han utilizado en el campo de la cosmética, en la elaboración de perfumes, la conservación de alimentos y aromaterapia ^(2,3).

T. elliptica Smith “chincho” es empleada, por su agradable aroma, en potajes locales como pachamancas y algunos aderezos, y como paliativo en el síndrome menstrual). Gran parte de su utilidad proviene de su contenido en aceites esenciales, los cuales le brindan el aroma característico.

El presente estudio se orienta a determinar la composición química, la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *T. elliptica* Smith, debido a hipótesis e investigaciones anteriores realizadas sobre aceites esenciales y su potencial efecto y de esta manera brindar información para futuros estudios y aplicaciones de la mencionada especie con el fin de aprovechar nuestros recursos naturales como alternativa de salud frente a los antibióticos convencionales y a los antioxidantes artificiales, cuyos efectos secundarios han producido diversos problemas en pacientes y consumidores, tales como resistencia bacteriana, reacciones adversas y predisposición a enfermedades oncológicas ^(4,5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Colección de la Muestra

La planta en estudio fue colectada en el poblado Monterrey, a orillas del río Santa, en la provincia de Huaraz, región Ancash, a 2700 msnm. Posteriormente las hojas fueron separadas del tallo y de las inflorescencias, y pesadas en una balanza común para continuar con la extracción del aceite esencial. La identificación taxonómica de la especie se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Extracción del aceite esencial

Se aplicó el método por arrastre con vapor de

Tabla 1. Características organolépticas del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith.

Olor	<i>Sui generis</i>
Color	Amarillo
Sabor	Picante-astringente
Aspecto general	Líquido transparente y fluido

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de *Tagetes elliptica*.

Propiedades fisicoquímicas	Valores
Densidad relativa	0,78 g/mL
Índice de refracción	1,448
Rotación específica	(-) 3° 25'
Índice de acidez	1,8424 mg/mL

Tabla 3. Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas CG/EM

Componentes químicos	Tiempo de Retención (minutos)
2-Metil-1-butil acetato	2,51
2(10)- pineno, (1S, 5S)-(-)-	4,37
1r- α -pineno	5,47
4-etil-4 metil-1-hexeno	6,41
1-pentanol, 5-(ciclopropil metileno)-	7,13
3-t-butil-6-metil-2H-pirano	8,8
l-verbenona	11,05
Metoxicitronelal	12,6
Isocariofileno	15,4
τ - cadineno	16,97
Cadina-3,9-dieno	17,9
α - cadinol	21,23
Ácido ciclopropanocarboxílico, 2-metil-2, 6-di-t-butil-4-metilfenil éster	32,41
Forbol	34,15
Ambrosin	38,72
Butanimida	49,41

agua. Se utilizaron 5,75 kg de hojas frescas, que se colocaron en la tolva del destilador, procediéndose a la destilación y posterior decantación del aceite. Se eliminó todo rastro de agua con sulfato de sodio anhidro, guardándose el aceite en un frasco de vidrio color ámbar y conservándolo en refrigeración a 4 °C ⁽⁶⁾.

Análisis fisicoquímico del aceite esencial

Densidad relativa

Se realizó en un picnómetro aforado a un volumen fijo.

Índice de refracción

Se efectuó con un refractómetro, empleándose

aproximadamente 0,5 mL del aceite esencial.

Rotación óptica

Se realizó en un polarímetro “Carl Zeiss”.

Índice de acidez

En un frasco Erlenmeyer se colocaron 1 mL de muestra con 20 mL de una solución 1:1 de alcohol etílico de 96° y éter; luego se tituló con hidróxido de potasio 0,025 N.

Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas

Se obtuvieron los espectros por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas luego comparar con estándares almacenados en “librerías virtuales” y así determinar la composición cualitativa del aceite esencial.

Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica por el método de difusión en agar y dilución en agar para la CMI

Método de difusión en agar

En esta prueba se enfrenta la bacteria o la levadura contra una muestra de aceite esencial, en medio de crecimiento sólido Agar Müeller Hinton o Agar Dextrosa Sabouraud, según sea el caso. La actividad antibacteriana y antifúngica se expresa por la formación de un halo de inhibición⁽⁷⁾.

Método de dilución en agar (Concentración Mínima Inhibitoria)

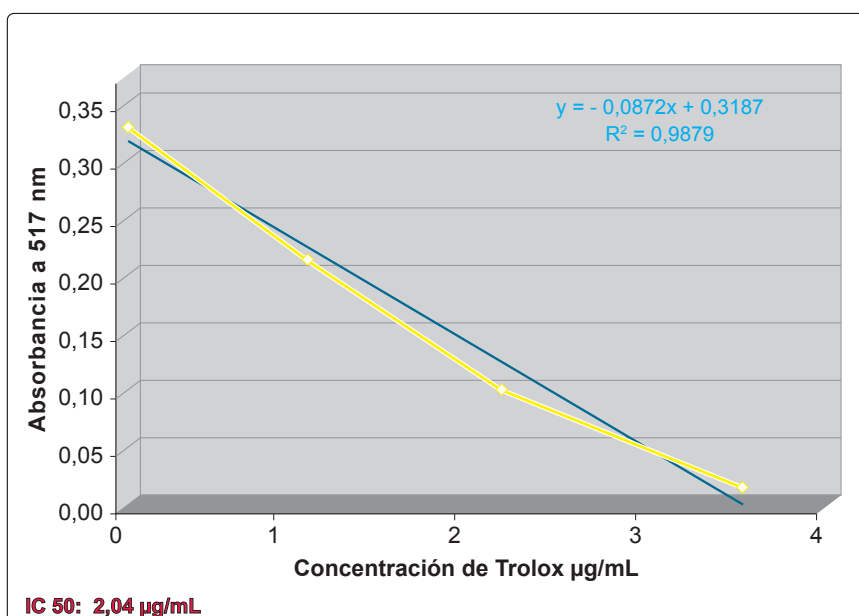
Utilizado para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. Esta prueba se basa en la ausencia de crecimiento bacteriano o fúngico a una determinada concentración del aceite esencial, para ello se enfrentan diluciones dobles seriadas del aceite esencial, preparado en el medio de cultivo, versus inóculos bacterianos y fúngicos. La menor concentración de aceite que inhibe el crecimiento de la bacteria o levadura se

conoce como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)⁽⁷⁾.

Determinación de la actividad antioxidante

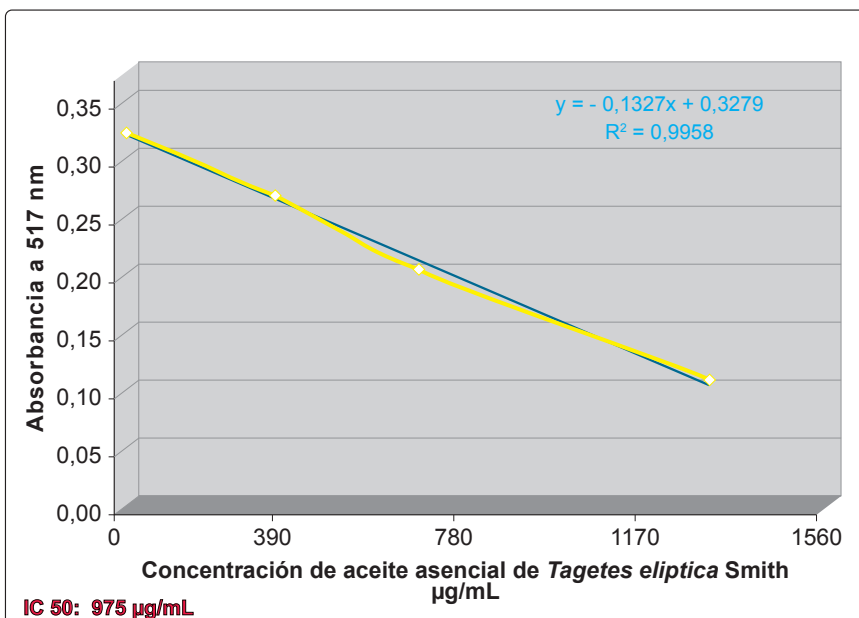
Captación del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH)

Se basa en la reducción del radical libre estable, 2,2 - difenil picril hidrazilo, mediante la captación de un átomo de hidrógeno que dona el antioxidante



IC 50: 2,04 µg/mL

Figura 1. Curva de captación de DPPH del Trolox



IC 50: 975 µg/mL

Figura 2. Curva de captación de DPPH del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

Tabla 4. Actividad Antibacteriana y Antifúngica del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

Microorganismo	Halo de inhibición (mm)			Fármaco antibióticos (mm)			Fármacos Antifúngicos (mm)	
	100%	50%	10%	Oxa	Clor	Cipro	Nist	Keto
<i>S. aureus</i> (ATCC5933)	65 ± 5,56	46 ± 2,82	25 ± 3	25	20	NSP	-	-
<i>S. epidermidis</i> (cepa clínica)	56	42,67 ± 7,37	19,33 ± 2,52	14	R	NSP	-	-
<i>B. subtilis</i> (cepa ambiental)	33,67 ± 0,58	27,2 ± 3,83	17 ± 1,41	23	18	NSP	-	-
<i>E. coli</i> (cepa clínica)	25 ± 1,41	21 ± 1,41	14,5 ± 0,71	NSP	19	R	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	32 ± 6,93	27 ± 4,58	20,25 ± 5,56	NSP	R	30	-	-
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	47,5 ± 0,71	44 ± 2,83	28 ± 2,83	-	-	-	38	25

(sustancia atrapadora de radicales libres). Se cuantifica midiendo la reducción de la absorbancia a 517 nm^(8,9).

Captación del radical superóxido producido por pirogalol

Se basa en la autooxidación espontánea del pirogalol en medio básico. Al generarse el radical O²⁻ en el medio de reacción se acelerará la autooxidación del pirogalol. La presencia de un secuestrador del radical anión superóxido O²⁻ inhibirá la reacción de autooxidación del pirogalol⁽¹⁰⁾.

RESULTADOS

Los valores obtenidos de las pruebas fisicoquímicas, instrumentales y microbiológicas se muestran en las tablas 1, 2, 3, 4 y 5.

Determinación de la actividad antioxidante

Captación del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH)

Los resultados obtenidos de la capacidad de captación del radical DPPH del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith comparado con el Trolox se presentan en las Figuras 1 y 2.

DISCUSIÓN

Las características del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith “chincho” se determinaron a través de las pruebas de densidad relativa,

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith (chincho).

Microorganismo	Concentración mínima Inhibitoria (CMI)		
	V/V(µL/mL)	P/V(µL/mL)	%(V/V)
<i>S. aureus</i> (ATCC5933)	< 9,76 x 10 ⁻⁴	< 7,62 x 10 ⁻¹	< 9,76 x 10 ⁻⁵
<i>S. epidermidis</i> (cepa clínica)	0,125	97,5	0,0125
<i>B. subtilis</i> (cepa ambiental)	0,5	390	0,05
<i>E. coli</i> (cepa clínica)	< 9,76 x 10 ⁻⁴	< 7,62 x 10 ⁻¹	< 9,76 x 10 ⁻⁵
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	< 9,76 x 10 ⁻⁴	< 7,62 x 10 ⁻¹	< 9,76 x 10 ⁻⁵
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	1	780	0,1

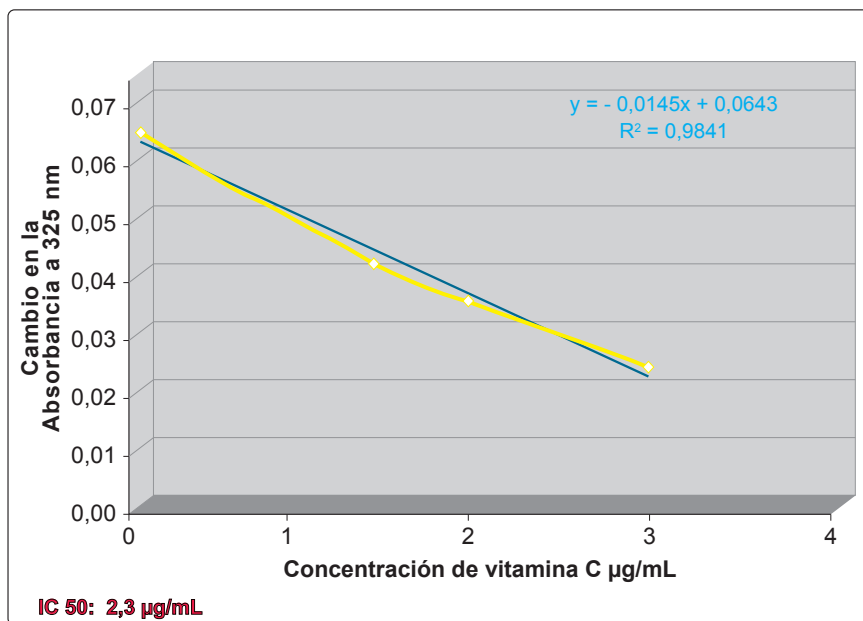


Figura 3. Curva de captación del radical superóxido producido por pirogalol de la vitamina C

índice de refracción, rotación específica e índice de acidez⁽¹¹⁾.

La composición química cualitativa determinada por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masa (CG/EM) en base al tiempo de retención (RT) del aceite esencial, nos indica que está conformado por componentes con actividad

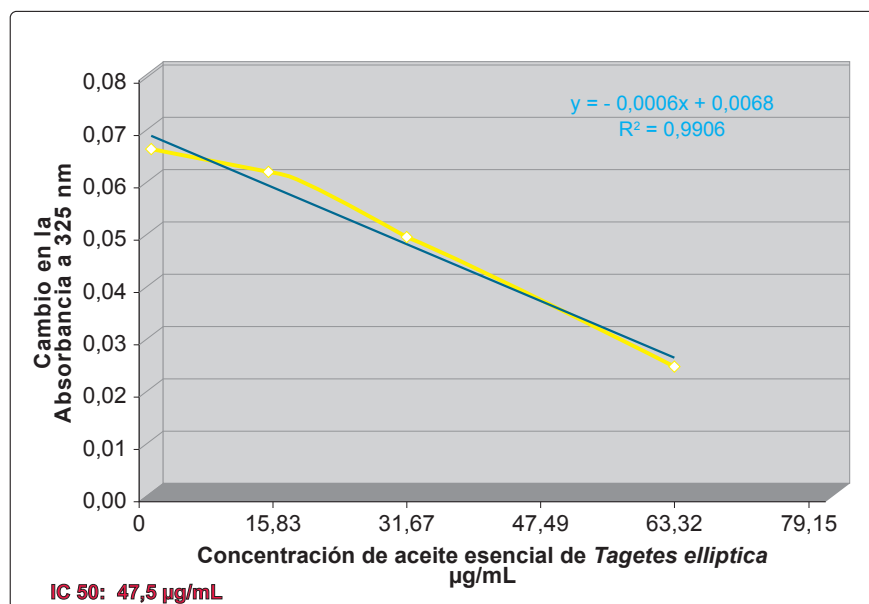


Figura 4. Curva de captación del radical superóxido del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

biológica tipo α -pineno y l-verbenona, α -cadinol, τ -cadineno, isocariofileno, forbol y ambrosin. Otros estudios publicados revelan similares resultados estableciendo que los aceites esenciales están conformados principalmente por compuestos alifáticos, monoterpenos y sesquiterpenos con actividad biológica⁽¹²⁾.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith para *Staphylococcus aureus* fue significativa con un halo de inhibición de $65 \pm 15,56$ mm al 100%; mientras que en otros estudios como el de Alzamora y col., la actividad fue inferior⁽¹³⁾.

Esta mayor actividad se debería a la presencia de: Isocariofileno, l-verbenona y α -pineno^(14,15).

La actividad antibacteriana para *Staphylococcus epidermidis* fue significativa con un halo de inhibición de 56 mm al 100%; mientras que en los estudios de Sarac y col.⁽¹⁶⁾ se encontró que el aceite esencial de *Thymbra spicata* var. *Intricata*, produjo halos de inhibición de 17-18 mm para esta misma especie, oxacilina resistente.

Para *Bacillus subtilis* la actividad fue significativa con un halo de inhibición de $33,67 \pm 0,58$ mm; mientras que en otros estudios fue inferior^(17,18).

Para *Escherichia coli* la actividad fue significativa con un halo de inhibición de $25 \pm 1,41$

mm; mientras que en otros estudios fue inferior^(19,20).

Para *Pseudomonas aeruginosa* la actividad fue significativa con un halo de inhibición de $32 \pm 6,93$ mm; mientras que en otros estudios reportan menor actividad⁽²¹⁾.

Para *Candida albicans* (levadura) la actividad antifúngica fue significativa con un halo de inhibición de $47,5 \pm 0,71$ mm; siendo inferior a la reportada en otros estudios⁽²²⁾.

CONCLUSIONES

Los componentes químicos que se elucidaron del aceite esencial de las hojas de *Tagetes elliptica* Smith fueron: 2-metil-1-butil acetato; 2(10)-pineno, (1S,5S)-(-); 1R- α -pineno; 4-etil-4-metil-1-hexeno; 1-pentanol, 5-(ciclopropil metileno)-; 3-t-butil-6-metil-2H-pirano; l-verbenona; metoxicitronelal; isocariofileno; τ -cadineno; cadina-3,9-dieno; α -cadinol; ácido ciclopropanocarboxílico 2-metil-2,6-di-t-butil-4-metilfenil éster; forbol; ambrosin y butanimida.

El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presentó actividad antibacteriana significativa frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo presentó actividad antifúngica significativa frente a *Cándida albicans*.

El aceite esencial no presentó actividad antioxidante significativa en comparación a las sustancias de referencia: Trolox y vitamina C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pulgar VJ. Geografía del Perú - Las ocho regiones naturales del Perú. Editorial Universo. Lima 1981.
2. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10: 813-29.
3. Contreras N, Martínez J, Stashenko E. Determinación de la Actividad antioxidante *in vitro* de los aceites volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. *Scientia et Technica* 2006 Mayo; 30: 365-70.

4. Maguiña-Vargas C, Ugarte-Gil C, Montiel M. Uso adecuado y racional de los antibióticos. Acta Med Per 2006; 23 (1): 15-20.
5. Bueno CM. Aditivos antioxidantes (monografía en internet). BIOSALUD –Instituto de Medicina Biológica y Antienvjecimiento [en línea] citado el 30 de Julio de 2008. Disponible en: <http://www.biosalud.org/es/uploads/File/articulos/pdf16.pdf>
6. San Martín R. Tratado de Farmacognosia. 1ra Ed. Editorial Científico Médica. Barcelona, 1997.
7. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual Práctico de Microbiología. 3ra Ed. Masson. Barcelona, 2005.
8. Kuskoski EM, Asuero AG y Troncoso AM. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc Tecnol Aliment Campinas 2005; 25(4): 726-32.
9. Ugartondo Casadevall V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenido de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. [Tesis de Doctorado]; Universitat de Barcelona. Barcelona, 2009.
10. Marklund S, Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a convenient assay for Superoxide Dismutase. Eur J Biochem 1974; 47: 469-74.
11. Munguia Ch. Y., Fuertes R. C. Estudio Comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (kunth) Griseb “Muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2000.
12. Lock de Ugaz O. Investigación fotoquímica. 2da Ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 1994.
13. Alzamora L, Morales L, Armas L. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales. Anales de la Facultad de Medicina 2001; 62 (2): 156-61.
14. Cha J-D, Eun-Kyung J, Bong-Seop K *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. J Microbiol Biotechnol 2007; 17(12): 2061-65.
15. Stojanovic G, Palic I y Ursic-Jankovic J. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Micromeria crista ta* and *Micromeria juliana*. Flavour Fragr J 2006; 21: 77-79.
16. Sarac N, Ugur A, Duru E. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of *Thymbra spicata* var. *intricata*. International Journal of Green Pharmacy 2008; 24-28
17. Senatore F, Napolitano F. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. Flavour Fragr J 2004; 19: 574-78.
18. Tomczykowa M, Tomczyk M, Jakoniuk P *et al.* Antimicrobial and antifungal activities of the extracts and essential oils of *Bidens tripartite* L. Folia Histochemica et cytobiologica 2008; 46 (3): 389-93.
19. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essentials oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 1999; 86:985-90
20. Seenivasan Prabuseenivasan, Manickkam Jayakumar, Savarimuthu Ignacimuthu. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine 2006; 6(39): 1 - 8.
21. Unlu M, Vardar-Unlu G, Vural N *et al.* Composition and antimicrobial activity of *Juniperus excelsa* essential oil. Chemistry of Natural Compounds 2008; 44(1):129-31.
22. Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007; 59: 934-40.

Manuscrito recibido el: 15/11/2010

Aceptado para su publicación el: 18/02/2011

Correspondencia:

Nombre: Américo Jorge Castro Luna
 Dirección: Jr. Puno 1002 – Lima 1 – Perú.
 e-mail: caslasha3@hotmail.com