

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, ANTIESPASMÓDICA Y ACCIÓN SOBRE HORMONAS SEXUALES EN RATAS HEMBRAS, DE LOS COMPONENTES DE *Tagetes pusilla* (ANISILLO)

Antimicrobial and antispasmodic activities and effect on sexual hormones of chemical substances of *Tagetes pusilla* ("anisillo") on female rats

Pablo Bonilla R.¹, Nancy Lozano R.¹, Jorge Arroyo A.², Mirtha Roque A.³, Augusta Córdova R.¹, Eleycy Pérez T.⁴, Domingo Iparraguirre L.⁴, Hamilton Beltrán S.⁵

RESUMEN

En la presente investigación se detectó e identificó los tipos de metabolitos secundarios predominantes en el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes pusilla* "anisillo" "anís serrano", que fueron compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides. Se determinó la actividad antibacteriana comparativa entre el aceite esencial y el extracto etanólico de anisillo, encontrándose que ambos mostraron una actividad antibacteriana significativa. Comprobándose la actividad de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de hojas de *Tagetes pusilla* sobre el músculo liso gastrointestinal, mediante los métodos de Chidume *et al* 2002 con modificaciones; y el de Akah *et al* 1998; así como la determinación del nivel de prolactina en ratas según Di Carlo *et al* 2005 con modificaciones, encontrándose que el extracto etanólico de *Tagetes pusilla* en las condiciones experimentales aumentó los niveles de prolactina, estrógenos, progesterona, LH, FSH en ratas normales; habiéndose evidenciado relajación del duodeno aislado de rata, y se observó un incremento de la actividad del ileon de rata, que probablemente se deba a la presencia de alcaloides.

Palabras clave: *Tagetes*, anisillo, flavonoides, prolactina.

SUMMARY

There was studied the specie *Tagetes pusilla* "anisillo" "saw anise's", which is a medicine original Asteraceae of use medical of our country, which grows abundant in Ayacucho's department, Tambillo's locality, between 2800 to 3000 msnm and which according to the information provided by the ethnobotanic, popular medicine, anthropologic information, they indicate its uses as infusions of the air part and its essential oil, for to relieve affections of the digestive tract and for the lactic secretion, besides diuretic. In the present investigation the types detected and identified of secondary metabolits predominant in the extract etanólico of leaves of anisillo, that were fenolics compounds, flavonoids and alkaloids. The antibacterial comparative activity decided between the essential oil and the etanólico extract of anisillo, thinking that both showed an antibacterial significant activity. Being verified the activity of the metabolits secondary present in the etanólico extract of *Tagetes's pusilla* leaves on the smooth gastrointestinal muscle, by means of Chidume's *et al.* methods 2002 with modifications; and that of Akah *et al.* 1998; as well as the determination of the level of prolactine in rates according to Di Carlo *et al.* 2005 with modifications, being that the etanólico extract of *Tagetes pusilla* in the experimental conditions increased the levels of prolactine, estrogens, progesterone, LH, FSH in normal rates; having been demonstrated easing of the duodenum isolated of rat, and was observed an increase of the activity of the ileon of rat, which probably should to the presence of alkaloids.

Key words: *Tagetes pusilla*, anisillo, flavonoids, prolactine.

¹ Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", Facultad de Farmacia y Bioquímica; ²Laboratorio de Farmatología, Facultad de Medicina; ³Instituto de Química Biológica y Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica; ⁴Instituto Antonio Raimondi, Facultad de Ciencias Biológicas; ⁵Museo de Historia Natural "Javier Prado" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INTRODUCCIÓN

Los recursos vegetales son y siguen siendo de gran importancia, dentro de la investigación científica, lo que se va reflejando en la gran cantidad de trabajos de investigación que se están desarrollando actualmente, donde su uso se va orientando a la atención primaria de salud de nuestro país. Por tal motivo y teniendo en cuenta que dichas investigaciones básicas orientadas a la aplicación de los conocimientos científicos que se adquieren para solucionar en nuestro caso problemas de salud.

En la presente investigación se estudió la especie *Tagetes pusilla* "anisillo" "anís serrano", Asteraceae de uso medicinal originaria de nuestro país, que abunda en el Departamento de Ayacucho, en la localidad de Tambillo, entre 2800 a 3000 msnm y que según los datos proporcionados por la etnobotánica, la medicina tradicional peruana y datos antropológicos, indican sus usos como infusiones de la parte aérea y su aceite esencial, para aliviar afecciones de las vías digestivas, para la secreción láctica y es diurética¹⁻³.

El objetivo del presente trabajo fue validar estos usos tradicionales mediante tecnologías químicas y biológicas experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material básico de vidrio, solventes orgánicos Q.P., Reactivos Químicos varios.

Agar, Microorganismos: bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), cepas ATCC.

Ratas hembras cepa Holtzmann de 150 ± 20 gramos, del Instituto Nacional de Salud MINSa. Hormonas: Prolactina, estradiol, progesterona, LH, FSH.

Marcha fitoquímica y ensayos cromatográficos⁴⁻⁶

Determinación de la actividad antimicrobiana. De los metabolitos secundarios contenidos en el extracto alcohólico de hojas de anisillo.

Método. Difusión en agar. Según Rojas R. *et al.*⁷

Microorganismos. Se utilizaron las bacterias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), cepas ATCC

Muestras. Extracto etanólico E1 de anisillo y aceite esencial de anisillo.

Preparación de la suspensión del inóculo. Los cultivos de cada uno de los microorganismos de prueba fueron reactivados en caldo Mueller Hinton.

Se toma una asada de colonias procedente del cultivo fresco (24 h) de la bacteria y se suspende en 5 mL de caldo Mueller Hinton y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica hasta alcanzar la turbidez del tubo N° 1 de la escala de McFarland equivalente a una concentración aproximada de 3×10^8 UFC/mL.

Preparación de las placas. Para la preparación de las placas se utilizó el agar Mueller Hinton; previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C, posteriormente se le agregó 1 mL de suspensión del inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo, mezclados asépticamente, se agitó suavemente y se repartió en placas Petri a razón de 20 mL por placa, se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo testigo. Luego se hizo pozos con la ayuda de un sacabocado de acero de 10 mm de diámetro, en el centro de cada placa.

Inoculación e incubación de las muestras. Se procede a colocar 0,1 mL de los extractos a las concentraciones deseadas y del aceite esencial en los respectivos pozos hechos previamente. Para lograr una mayor difusión de las muestras se dejó reposar por 1 hora a temperatura ambiente y luego se lleva a una temperatura de incubación de 37 °C por 24 horas.

Determinación de la acción sobre la prolactina y de la actividad antiespasmódica. De los metabolitos secundarios contenidos en el extracto alcohólico de hojas de anisillo.

Nivel de prolactina. Según Di Carlo *et al* 2005¹², y con modificaciones. Se postula que el producto incrementa la secreción láctea. Así como evaluar la seguridad de la planta a nivel de variables bioquímicas.

Material. Ratas hembras cepa Holtzmann de 150 ± 20 gramos al inicio del experimento, adquiridas del Instituto Nacional de Salud MINSa, con agua y alimento a libertad.

Extracto etanólico de hojas de anisillo E₁

Procedimiento de la determinación de hormonas. Prolactina, estradiol, progesterona, LH, FSH. Treinta

ratas fueron agrupadas aleatoriamente en cinco grupos de seis cada uno, el primer grupo recibió suero fisiológico 5 mL/kg (normal), al segundo grupo se administró E1 de *Tagetes pusilla* (*T. filifolia*) 50 mg/kg; al tercer grupo E1 *Tagetes pusilla* (*T. filifolia*) 250 mg/kg; al cuarto grupo E1 *Tagetes pusilla* (*T. filifolia*) 500 mg/kg; al quinto grupo Metoclopramida 15 mg/kg. La administración fue vía oral una vez por día durante 30 días. Luego se procedió a extraer muestras de sangre por punción cardiaca para determinación de hormonas: prolactina, estradiol, progesterona, LH (hormona luteinizante), FSH (hormona folículo estimulante), se sacrificaron los animales administrando 100 mg/kg de pentobarbital vía intraperitoneal.

Determinación de la actividad antiespasmódica, sobre el músculo liso gastrointestinal *in vitro*, mediante los métodos, según Chidume *et al.* 2002 con modificaciones⁸⁻¹⁰; y el de Akah *et al.* 1998¹¹.

RESULTADOS

La muestra vegetal de anisillo fue ubicada y recolectada en el departamento de Ayacucho, localidad de Tambillo, fue clasificada, por el Biólogo-Magíster en Botánica Tropical Hamilton W. Beltrán S. como *Tagetes pusilla* "anisillo" "anís serrano", es sinónimo de *Tagetes filifolia*, de la familia Asteraceae.

Obtención de extractos. Se hicieron extracciones por maceración alcohólica de 200 g de polvo de hojas de anisillo en un litro de etanol, durante siete días, al cabo de este tiempo se filtró y concentró a sequedad en una estufa de aire circulante a 38°C, se obtuvo E₁.

Mediante la marcha fitoquímica del extracto alcohólico de hojas de anisillo E1 con reactivos químicos de coloración y precipitación, se detectaron compuestos fenólicos, flavonoides y glicósidos en mayor cantidad y menos cantidad de alcaloides.

Con el extracto alcohólico E₁ se realizaron estudios cromatográficos para detectar y visualizar el número de los metabolitos secundarios presentes. Mediante cromatografía en capa delgada analítica utilizando como fase fija silicagel G 60 y como fase móvil diclorometano : metanol 3:1, se observó que las cromatoplasmas al ser reveladas a la luz UV a 366 nm, luz UV a 254 nm, tricoloruro de fierro, ácido sulfúrico al 50% y con reactivo de Dragendorff arrojó los siguientes resultados: compuestos fenólicos (flavonoides, fenilpropanoides, taninos, etc.), glicósidos y alcaloides⁴⁻⁶.

Determinación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios contenidos en el extracto alcohólico de hojas de anisillo.

Muestras. Extracto etanólico E1 de anisillo y aceite esencial de anisillo. **Método.** Difusión en agar. **Procedimiento.** Según Rojas R. *et al.*⁷ Inoculación e incubación de las muestras. Control negativo. Se utilizó el solvente usado en la preparación de los extractos. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura correspondiente con la observación de las zonas claras de inhibición del crecimiento, mediante el registro de los diámetros en mm de estas zonas (tabla 1).

Tabla 1. Actividad antibacteriana del aceite esencial y extracto etanólico de hojas de *Tagetes pusilla* "anisillo"

MUESTRAS	Conc.	Gram positivas	Gram negativas	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ACEITE	100 %	23 mm	16 mm	20 mm
	50 %	22 mm	15 mm	18 mm
EXTRACTO	50 mg/ml	25 mm	-	18 mm
	25 mg/ml	18 mm	-	17 mm

Preparación de extractos. 50 mg/ml en DMSO, 25 mg/ml en DMSO; Preparación del aceite. 100% y 50% (diluido en etanol 96%).

Determinación de la acción sobre la prolactina y de la actividad antiespasmódica de los metabolitos secundarios contenidos en el extracto alcohólico de hojas de anisillo.

Nivel de prolactina según Di Carlo *et al* 2005¹² con modificaciones.

Sobre el músculo liso gastrointestinal *in vitro*, mediante los métodos, según Chidume *et al.* 2002 con modificaciones⁸⁻¹⁰; y el de Akah *et al.* 1998¹¹.

Se observa un incremento del nivel de prolactina, estradiol, progesterona, LH, FSH en sangre de ratas (tabla 2 y Fig. 1-5), siendo significativos estadísticamente (tabla 3).

A nivel del duodeno la acetilcolina incrementa la actividad intestinal (Fig. 6) y del íleon (Fig. 8), en tanto que el anisillo tiende a disminuir ese efecto

en el duodeno (Fig. 7) y lo incrementa ligeramente en el íleon de rata (Fig. 9)

Tabla 2. Valores medios del nivel de hormonas en ratas normales, por administración vía oral una vez al día durante 30 días, de extractos de anisillo y fármacos.

Hormona	Tratamiento (mg/kg)	Media	Error Estándar	Intervalo confianza 95%	
				Inferior	Superior
Prolactina (µg/L)	Normal	153.0	27.0	83.5	222.5
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 50	171.2	25.0	106.9	235.4
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 250	244.0	24.5	175.9	312.1
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 500	262.7	29.7	189.9	335.5
	Metoclopramida 15	206.8	11.7	174.2	239.4
Estradiol (µg/L)	Normal	271.2	24.2	209.0	333.3
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 50	252.3	57.5	104.6	400.0
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 250	334.8	86.6	94.3	575.3
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 500	349.4	53.9	217.4	481.4
	Metoclopramida 15	108.8	7.4	88.2	129.4
Progesterona (µg/L)	Normal	5.9	1.6	1.9	10.0
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 50	11.4	1.5	7.5	15.3
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 250	13.8	3.6	3.8	23.9
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 500	15.7	1.0	13.3	18.0
	Metoclopramida 15	11.7	1.8	6.8	16.7
LH (UI/L)	Normal	2.8	0.5	1.6	4.1
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 50	6.0	1.3	2.7	9.3
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 250	4.7	1.1	1.6	7.8
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 500	8.3	2.3	2.8	13.8
	Metoclopramida 15	7.2	1.3	3.7	10.7
FSH (UI/L)	Normal	3.8	0.5	2.4	5.1
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 50	6.4	1.3	3.1	9.8
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 250	5.0	1.0	2.2	7.8
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 500	6.9	1.4	3.6	10.2
	Metoclopramida 15	5.0	1.2	1.7	8.4
Testosterona (µg/L)	Normal	0.1	0.0	0.1	0.2
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 50	0.4	0.1	0.0	0.8
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 250	0.2	0.1	0.0	0.4
	<i>Tagetes pusilla</i> (<i>T. filifolia</i>) 500	0.4	0.1	0.2	0.6
	Metoclopramida 15	0.2	0.0	0.1	0.2

Tabla 3. Análisis de varianza de los niveles de hormonas en ratas normales por administración de *Tagetes pusilla* (anisillo) y metoclopramida.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Prolactina (µg/L)	Between Groups	53731.7	4.0	13432.9	3.5	0.022
	Within Groups	92619.1	24.0	3859.1		
Estradiol (µg/L)	Between Groups	196944.0	4.0	49236.0	3.0	0.037
	Within Groups	389897.5	24.0	16245.7		
Progesterona (µg/L)	Between Groups	331.0	4.0	82.8	3.9	0.014
	Within Groups	509.7	24.0	21.2		
LH (UI/L)	Between Groups	103.3	4.0	25.8	1.8	0.155
	Within Groups	322.5	23.0	14.0		
FSH (UI/L)	Between Groups	38.6	4.0	9.6	1.2	0.319
	Within Groups	186.0	24.0	7.7		
Testosterona (µg/L)	Between Groups	0.4	4.0	0.1	2.5	0.073
	Within Groups	1.1	24.0	0.0		

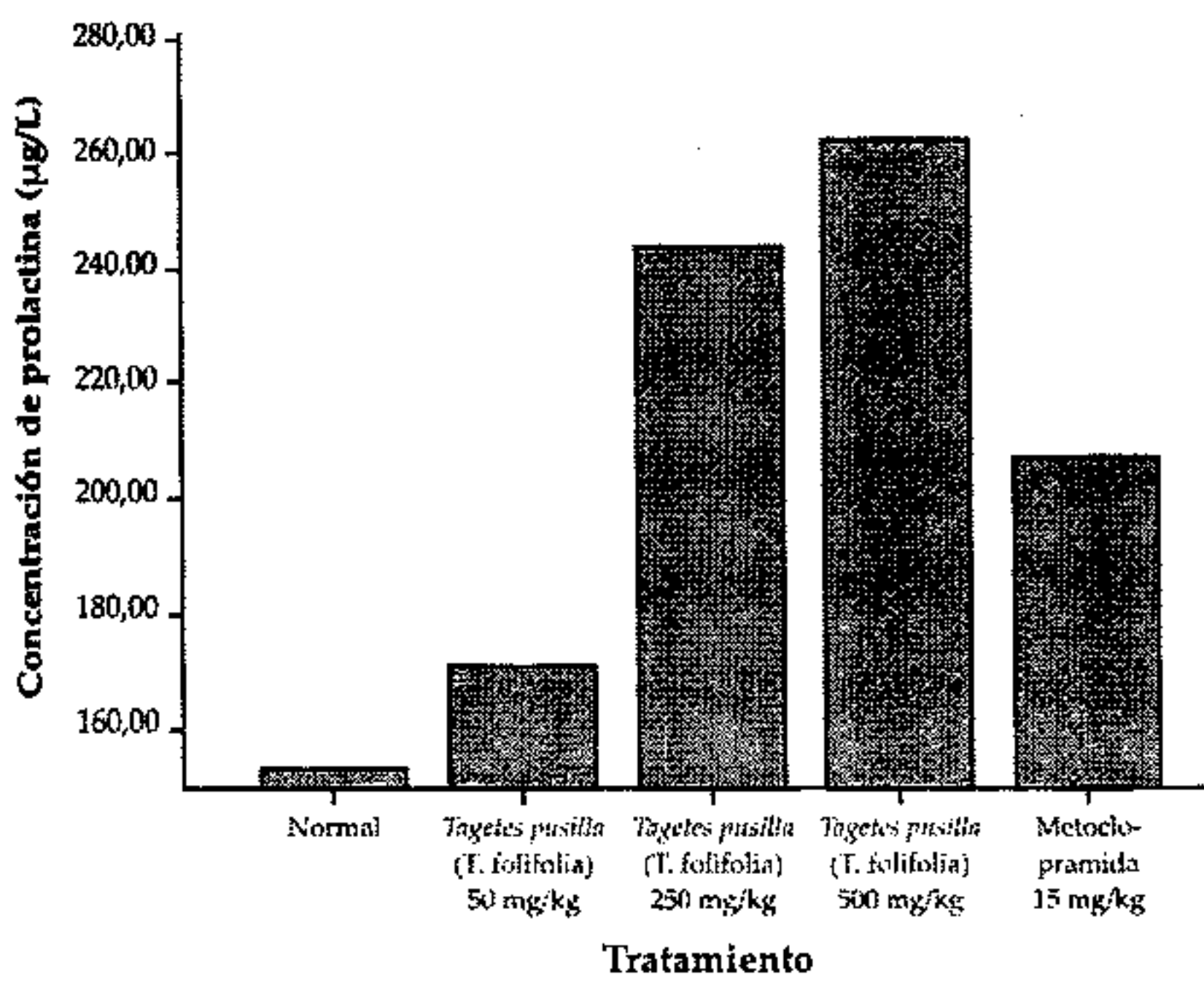


Figura 1. Efecto por administración oral durante 30 días en ratas sobre la concentración de prolactina. *Tagetes pusilla* en dosis de 500 mg/kg aumenta el nivel de prolactina en sangre.

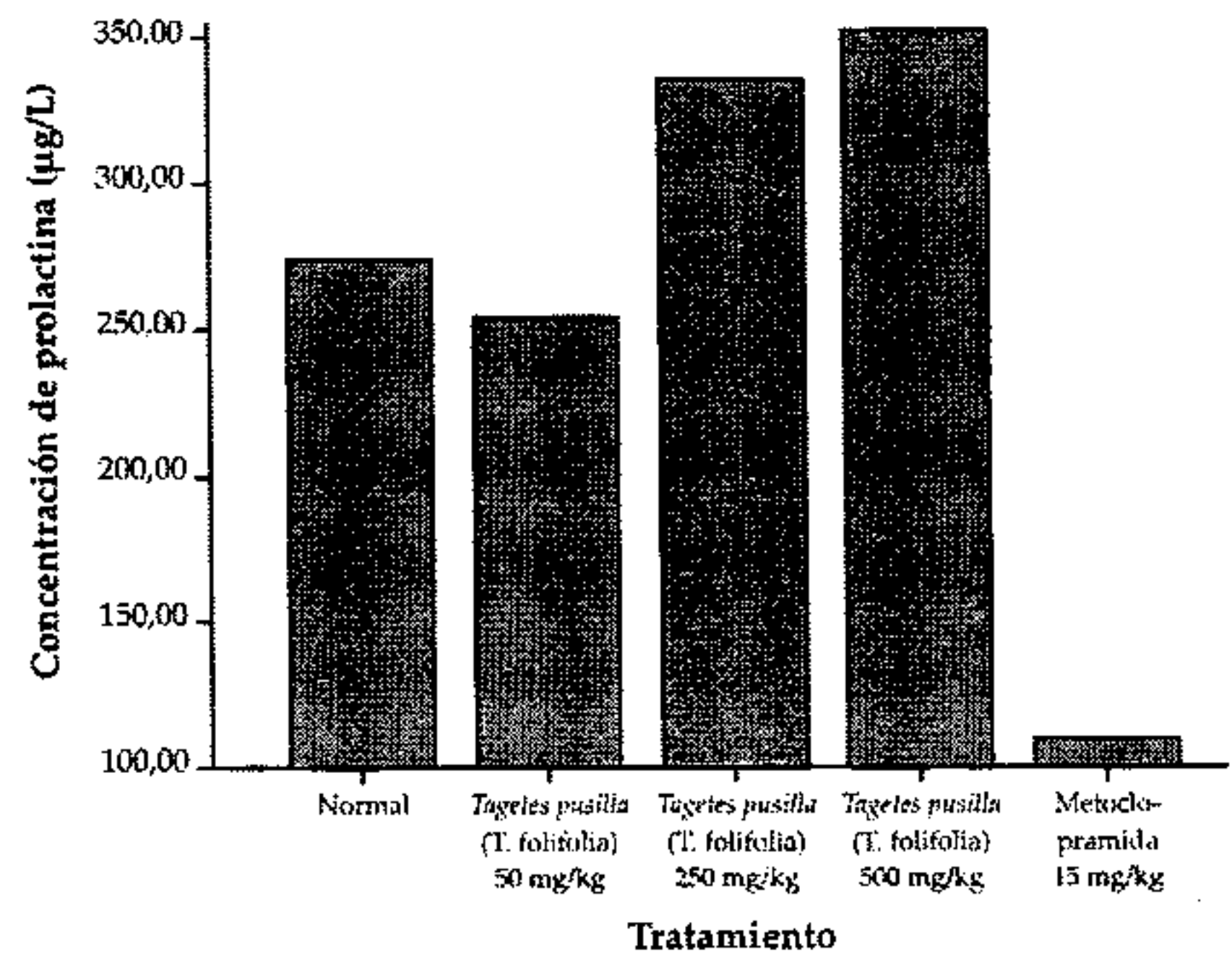


Figura 2. Efecto por administración oral durante 30 días en ratas sobre la concentración de estradiol. *Tagetes pusilla* en dosis de 500 mg/kg aumenta el nivel de estradiol en sangre.

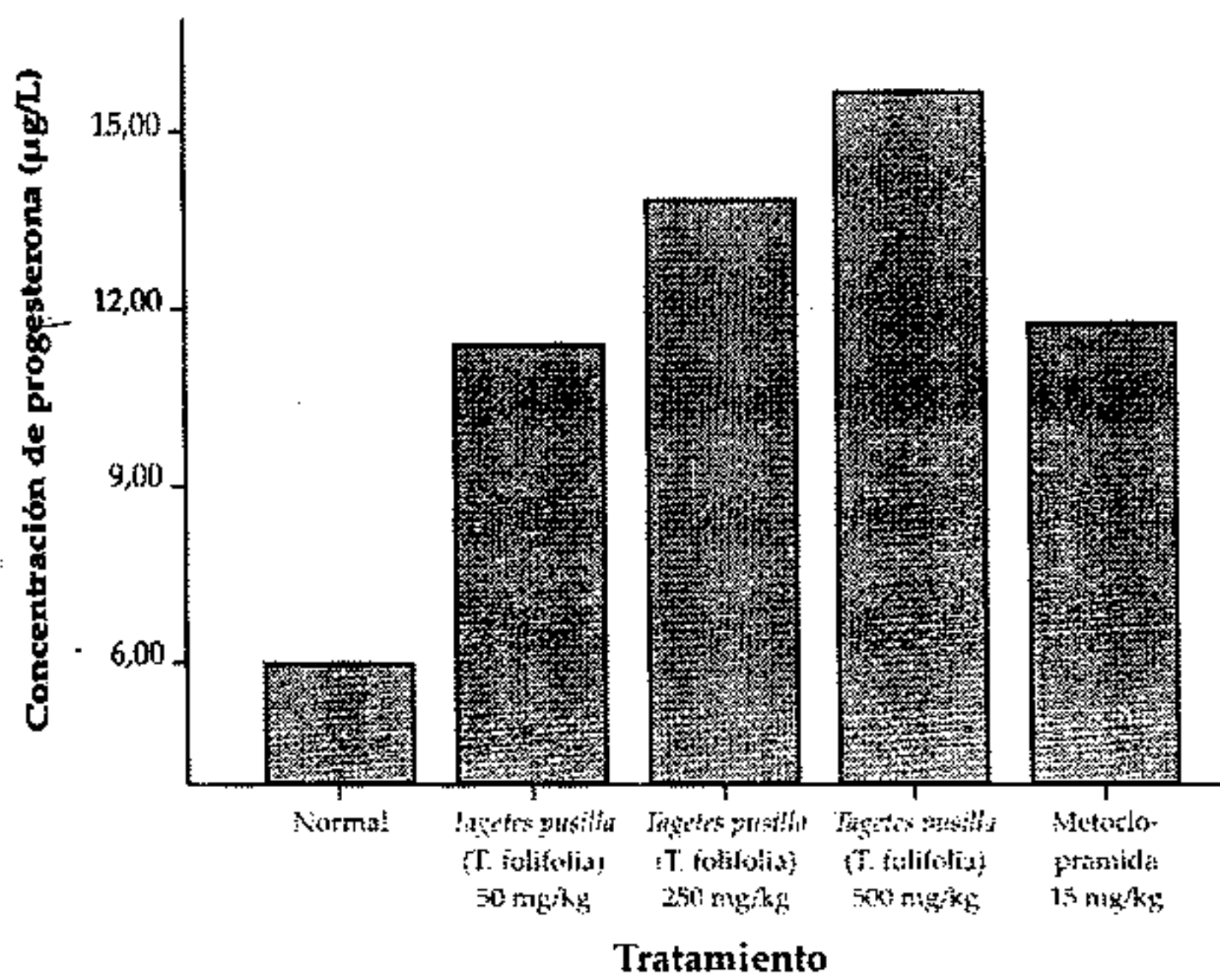


Figura 3. Efecto por administración oral durante 30 días en ratas sobre la concentración de progesterona. *Tagetes pusilla* en dosis de 500 mg/kg aumenta el nivel de progesterona en sangre.

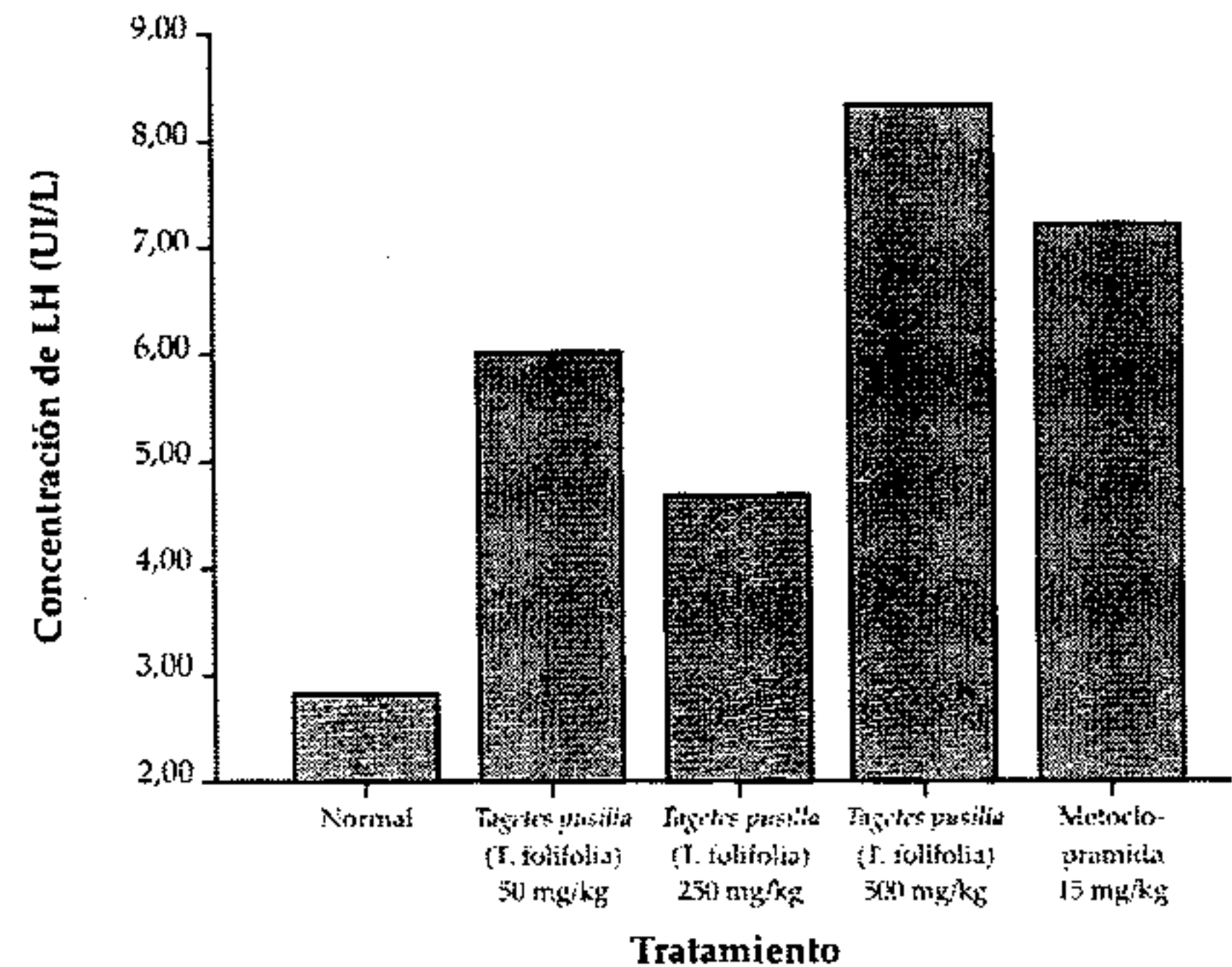


Figura 4. Efecto por administración oral durante 30 días en ratas sobre la concentración de LH. *Tagetes pusilla* en dosis de 500 mg/kg aumenta el nivel de LH en sangre.

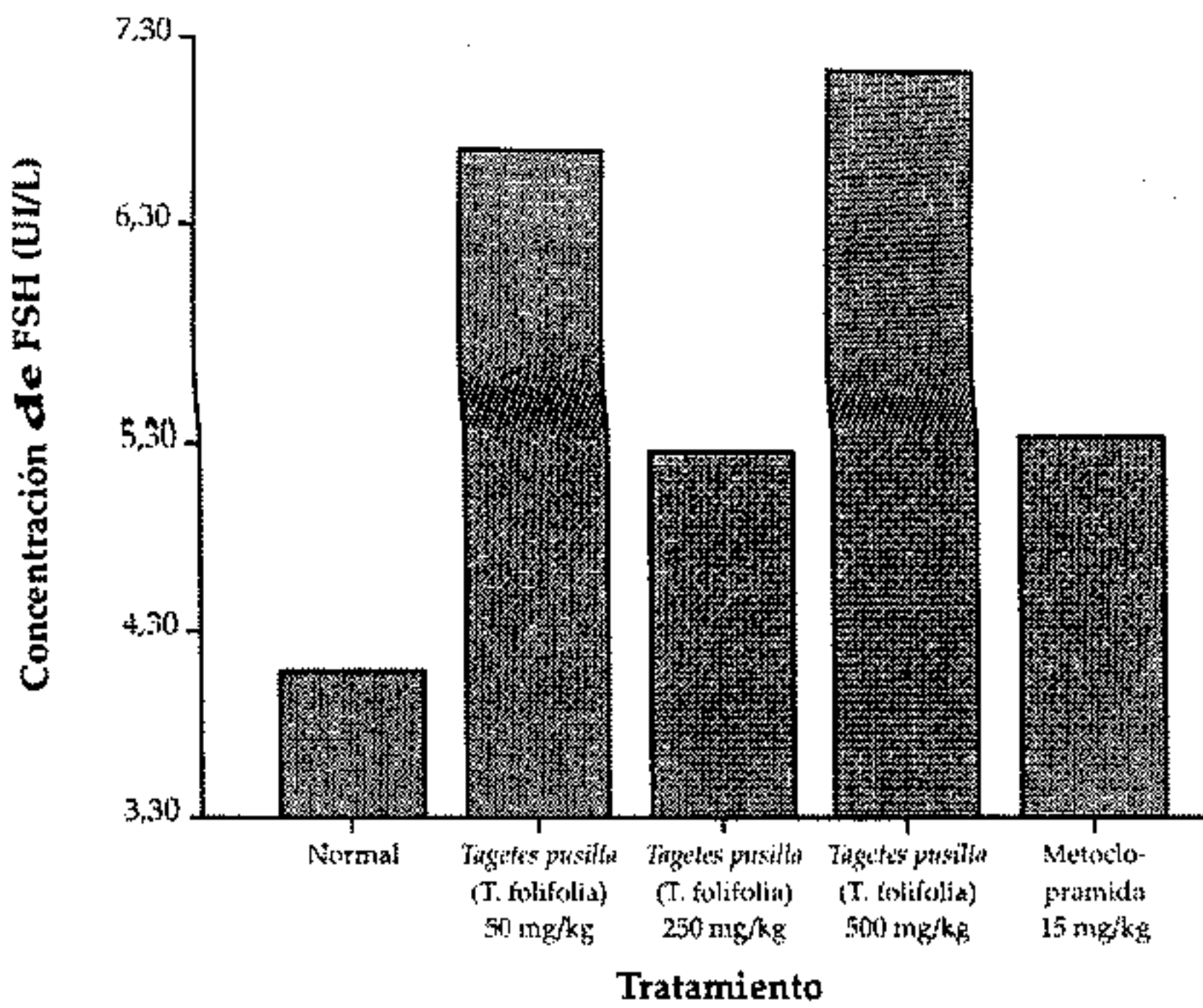


Figura 5. Efecto por administración oral durante 30 días en ratas sobre la concentración de FSH. *Tagetes pusilla* en dosis de 500 mg/kg aumenta el nivel de FSH en sangre.

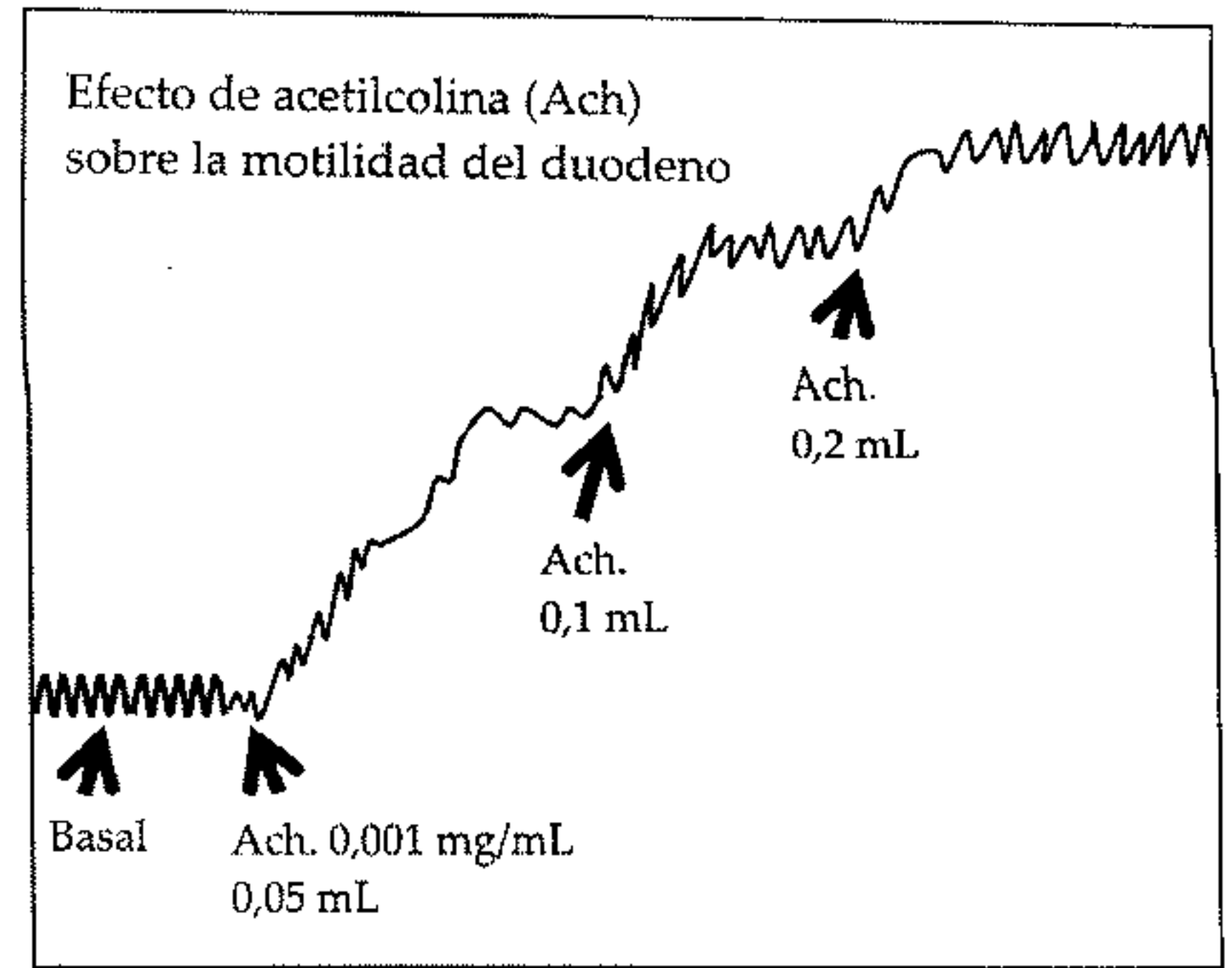


Figura 6. Efecto de acetilcolina sobre la motilidad del duodeno. La acetilcolina incrementa la actividad del músculo liso del duodeno de rata.

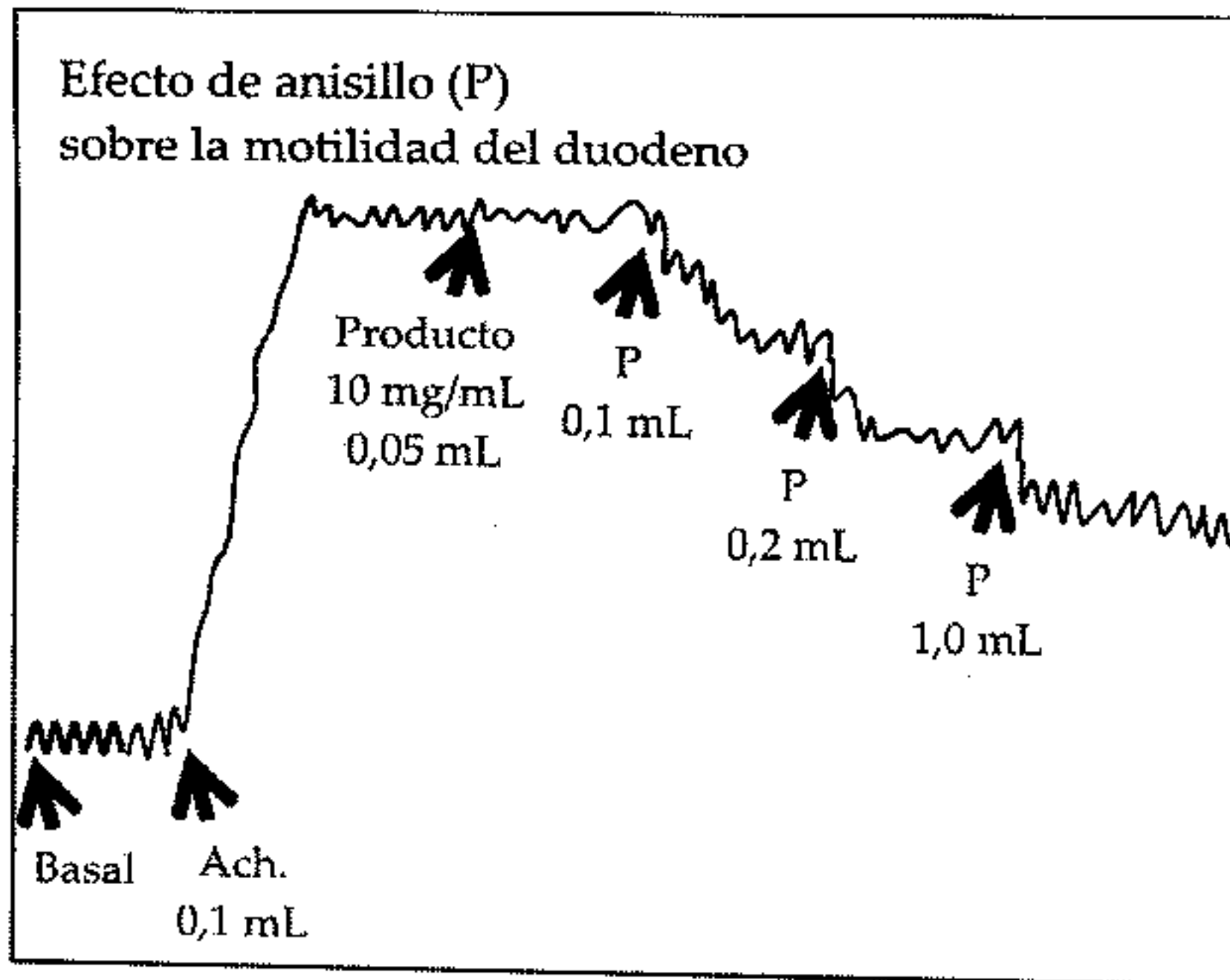


Figura 7. Efecto del extracto de anisillo sobre la motilidad del duodeno. El anisillo disminuye el efecto de la acetilcolina en el duodeno de rata

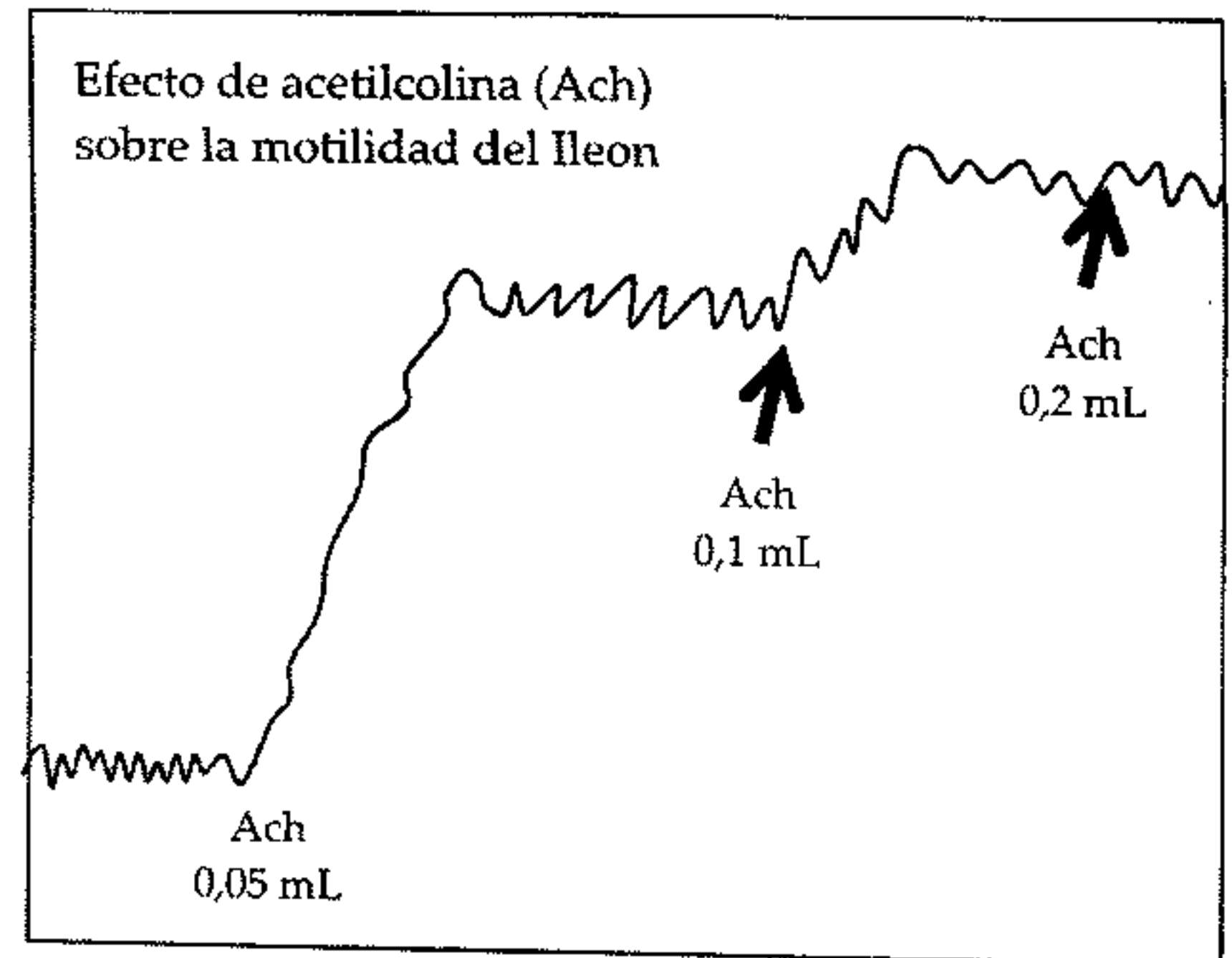


Figura 8. Efecto de acetilcolina sobre la motilidad del ileon. La acetilcolina incrementa la actividad del ileon de rata.

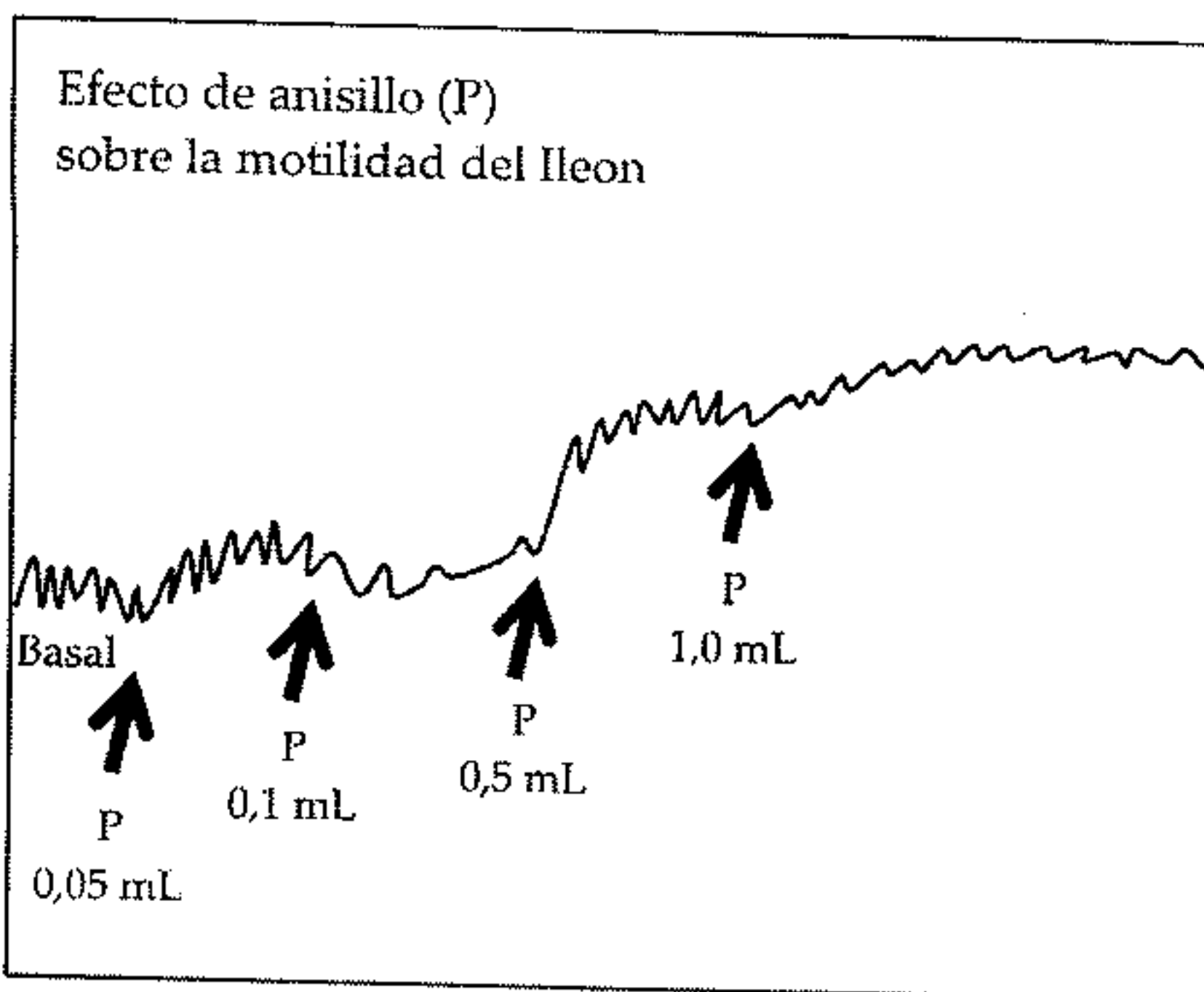


Figura 9. Efecto del extracto de anisillo sobre la motilidad del ileon. Se observa un incremento de la actividad del ileon de rata.

DISCUSIÓN

Se obtuvo el extracto E1 por maceración alcohólica de 200 g de polvo de hojas de anisillo en un litro de etanol. De acuerdo a la marcha de solubilidad realizada, se observó que los componentes químicos mayoritarios del extracto etanólico E1 son de mediana y alta polaridad. Por la marcha fitoquímica, se evidenció la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos, flavonoides, glicósidos y también alcaloides, los que fueron confirmados mediante cromatografía en capa delgada analítica y a escala preparativa.

Se determinó la actividad antibacteriana⁷ comparativa entre el aceite esencial y el extracto etanólico de anisillo, encontrándose que el aceite esencial mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylo-*

coccus aureus, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones evaluadas 50 % y 100 %; en tanto que el extracto etanólico mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y fue inactivo frente a *Escherichia coli* a las concentraciones evaluadas 25 mg/mL y 50 mg/mL (tabla 1).

Se realizó la evaluación farmacológica del extracto etanólico E1 de hojas de anisillo, determinándose el nivel de prolactina según Di Carlo *et al.* 2005⁽¹²⁾ con modificaciones, y la actividad de los metabolitos secundarios presentes en hojas de *Tagetes pusilla*, sobre el músculo liso gastrointestinal *in vitro*, mediante los métodos, según Chidume *et al.* 2002 con modificaciones⁸⁻¹⁰, y el de Akah *et al.* 1998¹¹.

La administración del extracto E1 de anisillo a varias dosis, durante 30 días vía oral una vez al día en ratas hembras, ha permitido observar un incremento de los niveles de prolactina, siendo indicador de que el producto podría aumentar la secreción de leche (tablas 2 y 3; Figs. 1 y 2)

Por otro lado, al administrar el extracto E1 de anisillo a varias dosis, a ratas normales hembras aumentó los niveles de LH y FSH comparativamente al grupo control (Figs. 4 y 5), la FSH induce mayor producción de estrógenos y al endometrio lo torna proliferativo. Pero se puede observar que la planta favorecería la ovulación porque la progesterona se incrementa (Fig. 3, tabla 2).

El estudio *in vitro* ha mostrado que la acetilcolina aumenta la contracción intestinal y en este caso del duodeno de rata (Fig. 6) lo que es disminuida por el anisillo (Fig. 7).

La acetilcolina incrementa la actividad del ileon (Fig. 8), al igual que el extracto de anisillo en donde se observó un incremento de la actividad del ileon de rata (Fig. 9), que probablemente se deba a la presencia de alcaloides.

Se concluye que el extracto etanólico y el aceite esencial de hojas de *Tagetes pusilla* presentan significativa actividad antibacteriana.

El extracto etanólico de *Tagetes pusilla* en las condiciones experimentales aumentó los niveles de prolactina, estrógenos, progesterona, LH, FSH en ratas normales lo que indicaría el aumento de la producción láctea.

Asimismo, se ha evidenciado la actividad antiespasmódica por la relajación del duodeno aislado de rata.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Brack Egg A.** *Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú*, PNUD, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cuzco, 1999.
2. **Soukup J.** *Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros*. Editorial Salesiana. Lima, 1987.
3. **Brako I., Zaruchi JL.** *Catalogue of Flowering Plants and Gymnosperm of Perú*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 1993.
4. **Lock de Ugaz O.** *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. Fondo Editorial PUCP. 2ª Edición, Lima, 1994, p.5
5. **CYTED.** *Manual de Técnicas de Investigación*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Bogotá. 1995.
6. **Sharapin Nikolai.** *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoquímicos*. Convenio Andrés Bello. Santa Fé. 2000.
7. **Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernandez I, Albán J, Lock O.** *Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants*. J. Ethnopharmacol. 2003; 88 (2-3): 199-204.
8. **CYTED.** *Manual de Técnicas Farmacológicas*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1999.
9. **Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J.** *Manual de Modelos Experimentales de Farmacología*. Lima, 2004.
10. **Chidume F, Kwanashie H, Adekeye J, Wambebe C, Gamaniel K.** *Antinociceptive and smooth muscle contracting activities of the methanolic extract of Cassia tora leaf*. Journal of Ethnopharmacology 2002, 81: 205-209.
11. **Akah P, Orisakwe O, Gamaniel K, Shittu A.** *Evaluation of Nigerian Traditional Medicines; 11 Effects of some Nigerian folk remedies on peptic ulcer*. Journal of Ethnopharmacology 1998, 62:123-127.
12. **Di Carlo G, Pacilio G, Capasso R, Di Carlo R.** *Effect on prolactin secretion of Echinacea purpurea, Hypericum perforatum and Eleutherococcus senticosus*. Phytomedicine 12 (2005): 644-647.