

ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *in vitro* Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Minthostachys mollis* "MUÑA"

Carlos Cano Pérez¹, Pablo Bonilla Rivera¹, Mirtha Roque A², Julio Ruiz Quiroz²

¹Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

²Instituto en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo"
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

RESUMEN

El presente trabajo tiene por finalidad demostrar la actividad antimicótica *in vitro* y la elucidación de algunos de los metabolitos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) proveniente del distrito de Huacrapuquio (2700 msnm), Provincia de Tarma. El aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* obtenido por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, fue sometido a análisis físico-químico y elucidación de composición química mediante cromatografía de gases (CG), se determinó los siguientes monoterpenos: Pulegona, Limoneno, Mentona y Mirceno. Mediante el método de agar en difusión, se determinó la actividad antimicótica, frente a las cepas de *Candida albicans* y por el método de dilución en tubo la inhibición del crecimiento fúngico de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagophytus*, *Microsporun canis*. Los diámetros de la prueba de difusión en agar de *Candida albicans* fueron de 30 mm al 100% del aceite esencial de muña y 35 mm al 50% del aceite esencial de muña. El crecimiento de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagophytus*, *Microsporun canis*, fue inhibido por el aceite esencial de muña, probablemente por la acción de los monoterpenos.

Palabras clave: *Minthostachys mollis*, aceite esencial, actividad antimicótica, cromatografía de gases, monoterpenos.

SUMMARY

The objective of this paper is to demonstrate the *in vitro* antimycotic activity and elucidation of some metabolites of the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) that comes from the district of Huacrapuquio (2700 m. altitude) in the province of Tarma. The essential oil of the leaves of *Minthostachys mollis* (muña) has been extracted by hydrodistillation method. This was subjected to Physical-Chemical analysis, Gas Chromatography (GC) to determine the chemical composition and then determining that fungicidal and fungistatic activity to be due to the following Monoterpenes: Pulegone, Limoneno, Menthone and also Myrcene. The antimycotic activity for *Candida albicans* was determined by the Agar-well diffusion assay and the method of dilution in tubes, the inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagophytus*, *Microsporun canis*. For the diffusion in Agar test the diameters were as follows 30 mm for the 100% concentration of the essential muña oil and 35 mm for the 50% concentration of the same oil. The essential oil of muña inhibited growth of *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagophytus*, *Microsporun canis*, probably by monoterpenes pharmacological action.

Key words: *Minthostachys mollis*, essential oil, antimycotic activity, gas chromatography, monoterpenes.

INTRODUCCIÓN

El Perú presenta una riqueza y megadiversidad de plantas nativas, que es uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional, desde la época del Incario hasta la actualidad. Éstas son utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud. Dentro de este contexto, los aceites esenciales son productos naturales de gran valor e importancia económica.

La bioactividad de los aceites esenciales se investiga a partir de los efectos farmacológicos que son producidos por sus metabolitos. Ello permite nueva información sobre estos productos, los cuales son obtenidos por diferentes técnicas fisicoquímicas a partir de las hojas.

En la actualidad, el interés comercial por los aceites esenciales en el Perú se ha incrementado en forma considerable, dando lugar a una recolección permanente de plantas, que amenaza con la depre-

dación y hasta la extinción de especies vegetales, que algunas veces se llevan del Perú, en forma indiscriminada y sin permiso de los organismos gubernamentales como el INRENA. Con la firma del Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos, las plantas medicinales nativas, estarán en situación crítica al ser recolectadas masivamente y posteriormente estudiadas con tecnología de punta (4, 12, 14, 18).

La importancia de la fitoterapia en nuestros días pone de manifiesto la necesidad de investigar sobre las propiedades farmacológicas de numerosas plantas que aún no han sido del todo estudiadas e investigadas en extenso como es el caso del *Minthostachys mollis*, muy usada en la Medicina Tradicional, para el tratamiento de diversas dolencias de las vías respiratorias, digestivas, etc. (7, 19).

MATERIAL Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA. La planta fue recolectada en el distrito de Huacrapuquio (2700 msnm), ubicado a 10 km al sur de la provincia de Tarma, departamento de Junín; de las laderas de los cerros, zonas pedregosas, fueron cortadas con una hoz a unos 10 cm por encima de la superficie del suelo. Luego se separaron las hojas de la parte aérea.

MICROORGANISMOS. Se utilizaron los siguientes hongos: *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*.

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL. Para realizar la extracción del aceite esencial de "muña" se utilizó el método de arrastre con vapor de agua. El proceso se realizó con 10 kg de "muña" fresca y estabilizada, en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Ingeniería.

El método consistió en colocar 1,5 kg de "muña" en cada canastilla de un autoclave, de tal modo que el material no esté en contacto directo con el agua; luego se calienta hasta el desprendimiento de vapor de agua conteniendo el aceite esencial a través de los refrigerantes de vidrio, siendo recolectados en una pera de decantación; se deja en reposo hasta observar la separación del agua y del aceite, procediéndose luego a su decantación.

El aceite obtenido fue sometido a desecación con sulfato de sodio anhidro; luego fue filtrado, con ayuda de una bomba de vacío, el aceite se deposita en frasco oscuro y se cierra herméticamente; luego se almacena en refrigeración para su uso.

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE GASES.

Para realizar este ensayo, el aceite esencial fue analizado por cromatografía de gases, en el Laboratorio de Investigación y Química Aplicada de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Ingeniería. Este ensayo se fundamenta en el tiempo de retención de algunos de los componentes mediante un detector FID; luego, mediante estándares conocidos, se determinó la composición cuali-cuanti centesimal de 4 monoterpenos del aceite esencial de la muña.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Mediante el método de agar en difusión (según Rojas R. *et al.* 2003) (2). Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido, y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros.

Mediante el método de dilución en tubo (según Fenner R. *et al.* 2005) (3) modificada. Basada en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la dilución del aceite esencial en tubos con agar y se evidencia por la ausencia de crecimiento en los tubos.

RESULTADOS

Luego de la extracción del aceite esencial de 10 kg de *Minthostachys mollis* (muña) por el método de arrastre con vapor de agua, se obtuvo 21 mL de aceite esencial, que corresponde a un rendimiento de 0,19% p/p.

Características organolépticas del aceite esencial de "muña" (4): presentó un color ligeramente verde amarillento, un olor aromático agradable parecido al mentol, sabor picante fresco no persistente y aspecto general líquido fluido y transparente.

Propiedades físico-químicas del aceite esencial de "muña": presentó una densidad relativa (25 °C) de

0,9189, una rotación específica (20 °C) de +3° 45, un índice de refracción (20 °C) de 1,4727 y una solubilidad en etanol de 95%.

Tabla N.º 1. Porcentaje de terpenoides obtenidos de la muestra del aceite esencial en hojas de *Minthostachys mollis* (muña) por Cromatografía de Gases

Tiempo de Retención (min)	Analito	Composición (%)
5,32	Limoneno	0,7699
11,094	Mentona	24,24
13,198	Pulegona	36,68
12,8	Mentol	No detectable

Prueba de difusión en Agar: Se encontraron los diámetros de los halos de inhibición como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla N.º 2. Diámetros de los halos de Inhibición del aceite esencial en hojas de *Minthostachys mollis* (muña)

Muestras y control	<i>Candida albicans</i> (mm)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (mm)
Aceite de "muña" 100%	30	> 90
Aceite de "muña" 50%	35	> 90
Alcohol (control neg.)	0	0

Tanto para *Trichophyton tonsurans* como para *Microsporium canis* se evidenció el mismo resultado que *Trichophyton mentagrophytes*, el halo de inhibición fue mayor de 90 mm, es decir, el aceite esencial de muña inhibió el crecimiento de los microorganismos.

Prueba de dilución en tubo

Por inspección visual se determinó la inhibición de crecimiento de cada uno de los tubos comparado con el control de crecimiento libre de muestra.

Microsporium canis, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton tonsurans* son sensibles a las concentraciones ensayadas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* tanto en los tubos con 5 y 50 uL de muestra.

El aceite esencial de "muña" muestra efectos antimicóticos frente a cepas de *Candida albicans* a las

concentraciones de 50% y 100% y frente a los dermatofitos *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton tonsurans* son sensibles en los volúmenes ensayados de 5 y 50 uL.

DISCUSIÓN

La naturaleza es fuente de una amplia variedad de moléculas bioactivas que podrían ser utilizadas como base para el diseño y la formulación de nuevas generaciones de medicamentos con el fin de solucionar diversos problemas de salud. El objetivo de esta búsqueda debe ser el descubrimiento de fármacos con mayor espectro, menos efectos adversos y menor costo que los existentes.

En cuanto a los ensayos físicos tales como la densidad e índice de refracción, se pueden hacer deducciones sobre sus componentes. En este estudio el (AE) de aceite esencial de muña presenta una densidad de 0,9189 e índice de refracción de 1,4727; lo que indicaría que la muestra está conformada posiblemente por sustancias oxigenadas aromáticas o alicíclicas (4, 5, 11, 12, 15, 17, 18).

La presencia de pulegona, mentona, limoneno y mentol en trazas en el aceite esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) permitieron obtener un amplio espectro fungicida-fungistático frente a cepas de hongos tales como *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporium canis*.

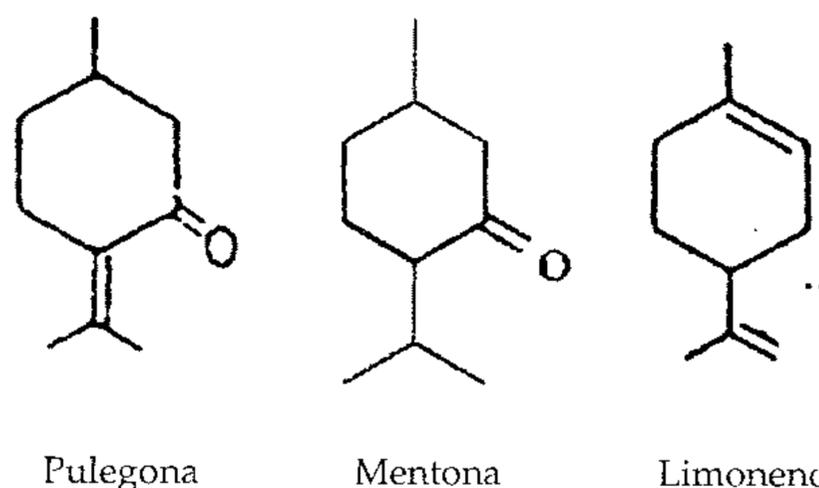


Figura N.º 1. Estructuras de monoterpenos presentes en hojas de *Minthostachys mollis* (muña).

El efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña), se explica por la destrucción de la pared del hongo y la membrana citoplasmática los cuáles resultan en el rom-

pimiento de la membrana y coagulación del citoplasma. El aceite esencial también inhibe la síntesis de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos en los hongos, evocando cambios similares a los obtenidos a los antimicóticos de acción tópica como clotrimazol, miconazol, ketoconazol, etc.; estos dos últimos, en su estructura química, poseen grupos éteres con los cuales potencializan su acción antimicótica (5, 9).

Se reconoce que las actividades antimicóticas del AE dependen de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana, por ejemplo: ciertos componentes del AE pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP5.

Se han reportado que los aceites esenciales son más efectivos que los agentes antimicóticos sintéticos. Así, en las semillas de *Zea mays* se encuentra la proteína zeamatina, que tiene como función proteger a la planta de hongos patógenos por la capacidad de producir lisis osmótica. En *Candida albicans*, la zeamatina impide el crecimiento a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,5 mg (16, 13, 16, 19, 20).

En la acción antimicótica de estos metabolitos secundarios presentes en el AE, el carácter lipofílico e hidrofílico de sus grupos funcionales son de gran importancia; debido a la polaridad que poseen, tienen propiedades antisépticas, antimicrobianas y antimicóticas, siendo esta actividad biológica de mayor a menor: fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes y éteres. Los esfuerzos para encontrar una correlación entre la composición y bioactividad de los aceites esenciales no han sido totalmente dilucidados. Se presume que la actividad biológica de estos AE no está determinada por la cantidad de los monoterpenos, sino más por la tasa de proporcionalidad de los mismos (5, 6, 10, 14, 21).

En los últimos años, las micosis se han convertido en un problema importante de salud, que afecta a gran parte de la población mundial. Después de conocer el potencial de algunos metabolitos secundarios con actividad antimicótica en diversos organismos, se debe elaborar programas de

bioprospección que a largo plazo contribuirán al mejoramiento del arsenal de fármacos antimicóticos disponibles en el Perú.

Por lo mencionado anteriormente, este aporte etnofarmacológico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña), permitirá que la población disponga de un producto galénico natural para las micosis externas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Inga BA, Guerra MB. 2000. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la Salud [Tesis de Q.F.]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; FFB.
2. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 88(2-3): 199-204.
3. Fenner R, Sortino M, Rates SM, Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nor C, von Poser G, Schapoval E, Zacchino S. Mar 2005. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine.* 12(3): 236-40.
4. Fuertes RC, Munguía SY. 2001. Estudio Comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb muña de tres regiones peruanas pro cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación.* 4(1): 23-39.
5. D. Kalemba and A. Kunicka, Institute of General Food Chemistry, Technical University of Lodz, Poland Institute of Fermentation Technology & Microbiology, Technical University of Lodz, Poland. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils *Current Medicinal Chemistry.* 10: 813-829.
6. Mesa Arango AC, Bueno Sánchez JG, Betancur Galvis LA. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimioterap.* 17(4): 325-331.
7. Mouhssen Lahlou. 2004. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytother. Res.* 18: 435-448.
8. Dr. Duke's. Phytochemical and Ethnobotanical Database. A phytochemical and ethnobotanical

- database compiled by Dr. Jim Duke of the Agricultural Research Service/USDA. (Disponible en: www.ars.grin.gov/duke/8k. Acceso el 7 de febrero de 2006).
9. Goodman y Gilman. 1985. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 6.ª ed. México DF. Interamericana.
 10. Hernández Díaz L, Rodríguez Jorge M. 2001. Actividad Antimicrobiana de Plantas que crecen en Cuba. *Rev cubana plant med.* 2: 44-47.
 11. Kuklinski Claudia. 2003. Farmacognosia. Edit. Omega, Barcelona.
 12. Banchio E, Zygadlo J, Valladares GR. 2005 Aug 24. Quantitative variations in the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits. *J Agric Food Chem.* 53(17): 6903-6.
 13. M. S. Ali-Shtayeh and Suheil I. 1999. Abu Ghdeib mycoses. 42, 665-672. Accepted: July 22, 1998. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes.
 14. Castro AG, Lema MN. 1993. Determinación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales de Huancayo y Huarochirí [Tesis de Q.F.]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; FFB.
 15. Schauenberg P, Paris F. 1992. Guía de las Plantas Medicinales. Barcelona: Omega S.A. p. 239.
 16. Fernández-Torres B, Cabañes FJ, Carrillo-Muñoz A, Esteban A, Inza I, Abarca L, Guarro J. 2002. Collaborative evaluation of optimal Antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes *J Clin Microbiol.* 40(11): 3999-4003.
 17. Wagner H, Bladt E. 1995. *Plant Drug Analysis.* Munich: Springer. p. 134-35.
 18. Brunetton, J. 1996. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Acribia S.A. p. 230-45.
 19. Larrondo MR, González AA, Hernández GL. 2001. Micosis Superficiales. Dermatofitosis. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 17(6):559-64. (Acceso el 20 de Julio de 2005).
 20. Rodríguez Pargas A, Del Carmen León M, Hernández Rodríguez A, Lunco Barranco J. 1996. Actividad Antifúngica in vitro de una crema de *Plantago major* L. *Rev cubana plant med.* 13:9-12.
 21. Guerra Ordóñez M, Mayra Rodríguez J, Gastón García S, Llerena Range C. 2004. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Staff. Rev Cubana Plant Med.* 9(2): 44-47.