UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
UNIDAD DE POST GRADO

Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de Minthostachys mollis "muña"

Tesis para optar el grado académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos

AUTOR:
Carlos Alfredo Cano Pérez

LIMA – PERÚ 2007

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre, que con sus consejos y dedicación logro fortalecer mi espíritu para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

A los distinguidos miembros del jurado por sus sugerencias
y aportes al trabajo de investigación realizado.

Dra. Luisa Negrón Ballarte

Dr. Julio López Castillo

Dr. Jorge Arroyo Acevedo

Dr. Pablo E. Bonilla Rivera

Mg. Luís M. Félix Véliz

AGRADECIMIENTOS:

A mi madre por su apoyo incondicional por los logros obtenidos en mi vida profesional y personal.

A la Dra. Bertha Pareja Pareja; quien me inculcó, incursionar en el difícil arte de la Docencia Universitaria.

Al Dr. Pablo E. Bonilla Rivera; amigo y asesor por guiarme en el derrotero de la culminación de mi tesis.

A mis colegas Mg. Mirtha Roque A., y Julio Ruiz Quiroz por su apoyo académico y técnico en el área del análisis microbiológico.

A la Dra. Vilma Bejar y a la Srta. Patricia Abanto del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM,por la colaboración en la donación de las cepas.

A mi colega Ralph Rack, y a mis amigos los doctores Richard J. Sherins y Roberto Ayres por la amistad brindada que transciende fronteras.

Y a todos los que de una u otra manera han colaborado en la realización de está tesis.

SUMARIO

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN 01

II. GENERALIDADES 03

2.1 Estudio de la Especie 03

2.1.1. Estudio Botánico 03

2.1.2. Ubicación sistemática 04

2.1.3. Sinonimia Popular 04

2.1.4. Distribución Geográfica 04

2.1.5. Antecedentes de Uso. 05

2.2 Micosis 06

2.3 Aceites Esenciales 09

2.3.1 Definición 09

2.3.2 Propiedades Físicas de los Aceites esenciales 10

2.3.3 Mecanismo de Acción de los aceites esenciales. 11

2.3.4 Aplicaciones de los Aceites esenciales 12

2.3.5 Fuentes de moléculas con Actividad antimicótico 12

III. PARTE EXPERIMENTAL 14

3.1 Equipos y Materiales 14

3.2 Procedimiento Experimental 14

3.2.1 Recolección de la Muestra. 14

3.2.2 Extracción del Aceite Esencial. 16

3.2.3 Análisis Físico-químico del aceite esencial. 16

3.2.4 Análisis Cromatográfico de Gases 17

3.3 Determinación In Vitro de Evaluación de la Actividad Antifúngica del Aceite Esencial

de Minthostachys mollis 18
3.3.1 Método de Agar en difusión 18
3.3.2 Método de dilución en tubo. 19

IV. RESULTADOS 21
4.1. Estudio Histológico de la Hoja 21
4.2. Extracción del Aceite Esencial 22
4.3. Lectura de Resultados de pruebas in Vitro 23

V. DISCUSIÓN 34

VI. CONCLUSIONES 38

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 39

VIII. ANEXOS 42

ANEXO N° 1 43
ANEXO N° 2 45
ANEXO N° 3 46
ANEXO N° 4 47

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 m.s.n.m), Provincia de Tarma. El aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* se ha obtenido por el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Este fue sometido a análisis físico-químico y determinación de la composición química (elucidación) mediante cromatografía de gases (CG), determinándose los siguientes monoterpenos: Pulegona, Limoneno, Mentona y Mirceno, como responsables de la actividad funguicida-fungistática. Mediante el método de agar en difusión, se determinó la actividad antimicòtica, frente a las cepas de: *Candida albicans y por el* método de dilución en tubo la inhibición del crecimiento fúngico de: *Trichophytun tonsurans, Trichophytun 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 y los dermatofitos (*Trichophytun tonsurans, Trichophytun mentagophytus, Microsporun canis.),* su crecimiento fue inhibido por el aceite esencial.

PALABRAS CLAVES: Minthostachys mollis, aceite esencial, actividad antimicótica, in vitro, cromatografía de gases.

SUMMARY/ABSTRACT

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 *Trichophytun tonsurans, Trichophytun mentagophytus, Microsporun canis.* For the diffusion in Agar test the diameters were as follows: 30 mm for the 100% concentration of the essential Muna oil and 35 mm for the 50% concentration of the same oil. The essential oil of Muna inhibited growth of *Trichophytun tonsurans, Trichophytun mentagophytus, Microsporun canis.*

Key words: Minthostachys mollis, essential oil, antimycotic activity, in vitro, gas chromatography

I. INTRODUCCIÓN

Nuestro país presenta una riqu y mega diversidad de plantas nativas, es uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional, desde la época del Incario hasta la actualidad. Siendo estas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud.

Dentro de este contexto, los aceites esenciales que son productos naturales de gran valor e importancia económica hoy en día, son utilizados como materias primas en áreas tales como: perfumería, aromaterapia, fitoterapia, especies y nutrición.

Actualmente en el campo referente a los aceites esenciales ha focalizado la atención de muchas áreas científicas, lo que permite en el estudio de plantas nativas investigar las actividades biológicas de estos. La Bioactividad de los mismos se investiga a partir de los efectos farmacológicos que son producidos por sus metabolitos (chemicals). Esto nos permitirá nueva información sobre estos productos, los cuales son obtenidos por diferentes técnicas fisicoquímicas a partir de las hojas.

Estos compuestos son mezclas complejas de muchos metabolitos secundarios; cada uno de los cuales contribuye al beneficio o efecto adverso en la salud del paciente. Es por esto que se debe profundizar la elucidación (composición) para permitir un mejor entendimiento de su mecanismo de acción.

En la actualidad el interés comercial por los aceites esenciales en nuestro país va en aumento en forma considerable, dando lugar a una recolección que amenaza con la depredación y hasta la extinción de muchas especies vegetales, que muchas veces se sacan del Perú, en forma indiscriminada y sin permiso de los organismos gubernamentales

correspondientes (INRENA).Con la firma del Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos, nuestro patrimonio de las plantas medicinales, se halla en situación crítica al ser estas recolectadas y posteriormente estudiadas con tecnología de punta, carentes en nuestros países.

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 determinadas perfectamente en nuestro medio tal es el caso del *Minthostachys mollis*, muy usada en la Medicina Tradicional, para el tratamiento de diversas dolencias de las vías respiratorias, digestivas, etc.

Con respecto a lo anterior se planteó la siguiente hipótesis: el aceite esencial de la hojas en la especie *Minthostachys mollis* “muña” posee actividad antimicótica.

El objetivo del presente trabajo de investigación es analizar y determinar los metabolitos secundarios del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) mediante el análisis instrumental (CG) y los objetivos específicos fueron:

1. Realizar el estudio botánico de las hojas de la citada especie y su ubicación sistemática.
2. Determinar las constantes físicoquímicas del (AE)
3. Determinar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de la muña frente a cepas de *Candida albicans y dermatofitos.*
4. Determinar los metabolitos responsables de esta actividad terapéutica.

II. GENERALIDADES

2.1. ESTUDIO DE LA ESPECIE

2.1.1. ESTUDIO BOTÁNICO

DESCRIPCIÓN:

Es una planta de 0.9 a 1.5 m de altura, frondosa en la parte superior, de aspecto bien tupido en hojas, las mismas que son opuestas y aserradas presentando pelos en los peciolos y en la cara inferior de las hojas, en las cuales se deposita la mayor cantidad de (AE). El tallo es ramificado desde la base, que también presenta pelos, tiene forma prismático cuadrilátero y propenso a la lignificación. Las flores se encuentran en la parte superior de las ramas reunidas en verticilios. Presenta la siguiente fórmula floral:

K(5),C(5),A(4) y G(4)



FIG. N° 1. MINTHOSTACHYS MOLLIS (KUNT/GRISEB) “MUÑA”

Las flores son pequeñas y blancas; irregulares o zigomorfas. Se encuentran reunidas en seudo verticilos axilares, formados por cuatro pequeñas cimas, brevemente pedunculadas, dos en cada axila y situadas en la parte superior de las ramas. (1,2)

2.1.2. UBICACIÓN SISTEMÁTICA

La muestra vegetal en estudio fue clasificada en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el Biólogo Hamilton Beltrán S., según el sistema de clasificación de Engler & Prantil, modificado por Melchor en 1964 (1):

DIVISIÓN	: Angiospermae
CLASE	: Dicotyledoneae
SUB CLASE	: Simpetaleae
ORDEN	: Tubiflorales
FAMILIA	: Lamiaceae
GÉNERO	: Minthostachys
ESPECIE	: Minthostachys mollis (Kunt/Griseb)
NOMBRE COMUN	: “MUÑA”

2.1.3. SINONIMIA POPULAR

Se denomina en lengua quechua Muña y en aymará tiene dos nombres Coa y Huaycha, debido a sus características semejantes al poleo y al orégano, los españoles lo llamaban poleo silvestre siendo este de diferente especie. (2)

2.1.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La muña es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre 2.500 y 3.500 msnm. Habita en los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía.

El clima más apropiado es aquel con abundante lluvias y elevada luminosidad. Los fertilizantes más recomendados son los ricos en contenido de potasio y fosfato, siendo fundamental el abono orgánico ya que influyen favorablemente en la síntesis de la esencia. (2)

2.1.5. ANTECEDENTES DE USO

Se le conoce de tiempos preincaico por sus propiedades medicinales, comestibles y para preservar los tubérculos de plagas durante su almacenamiento.

Se señala que sus hojas actúan como resolutivas de tumores y en mezcla con clara de huevo la emplearon en fracturas de huesos. Su cocimiento se aplicaba como antinflamatorio y antireumático. Su cocimiento con miel limpia la flema en el pecho y llagas del pulmón, riñones, vejiga. Lastres la definia como febrífugo. Valdizán y Maldonado la definen como carminativa.

La muña se emplea en infusión para curar cólicos de gases, diarreas, tiene acción carminativa, para curar heridas y tumores, úlceras, sarna y rasca - rasca, el pie de atleta y además por limpiar la flema del pecho (expectorante).

Además, por sus propiedades aromáticas se emplea como un condimento en muchos platos típicos de la sierra central en especial la llamada sopa verde en Junín.

El genero *Minthostachys* es utilizado por el campesino de los Andes Peruanos para preservar la papa y otros tubérculos menores contra el ataque de insectos en condiciones de almacenamiento, esto deja entrever que se trata de una planta con singulares propiedades, se considera que esta planta permitió en épocas prehispánicas; conservar en perfectas condiciones los alimentos de origen vegetal. (1,2)

2.2. MICOSIS

La dermatofitosis es una infección de la piel, el pelo o las uñas causadas por un grupo de hongos queratofilos denominados dermatofitos. Los cuales parasitan la piel cornificada y sin vida. Secretan queratinasas, que son enzimas proteolíticas que digieren la queratina que es la proteína estructural del pelo, las uñas y epidermis.

La dermatofitosis se encuentra entre las infecciones de mayor prevalencia en el mundo. Si bien son extremadamente molestas y su tratamiento implica un gasto anual de millones de dólares, salvo raras excepciones no son debilitantes ni potencialmente letales. Su incidencia varía de forma considerable.

Los dermatofitos son hongos altamente especializados en la infección de la piel. (3,4,6).

La mayoría de los especialistas en taxonomía reconocen tres géneros y 42 especies de dermatófitos: 22 especies del género *Trichophyton*, 18 especies del género *Microsporum* y 2 especies del género *Epidermophyton*. (4).

Este grupo de hongos comúnmente llamados dermatofitos degradan y utilizan la queratina como fuente de nitrógeno, pero usualmente son incapaces de penetrar en tejido subcutáneo. El género *Trichophyton* es capaz de invadir piel, pelos y uñas, mientras que el género *Microsporum* afecta sólo piel y pelos; el género *Epidermophyto*n afecta piel y uñas (Finegold y col., 1992) (3).

Se conocen miles de especies de levaduras y mohos, pero sólo alrededor de 100 de éstas son patógenas para el hombre o los animales (algunas otras causa enfermedades en vegetales). Los dermatofitos y especies de *Candida* son los únicos que se transmiten en forma común de un ser humano a otro. (5,6).

TABLA N° 1: Tipos de Micosis

Tipo de Micosis	Hongo	Forma de adquirirlo
Pitiriasis versicolor	Levadura	Endógeno
Candidiasis cutáneas	Levadura	Endógeno / Exógeno
Candidiasis mucosa	Levadura	Endógeno / Exógeno
Onicomicosis o infecciones de las uñas	Dermatofitos, levaduras, otros mohos	Exógeno
Tiñas o dermatofitosis	Dermatofitos	Exógeno

Estos microorganismos están limitados a ciertas regiones geográficas, donde muchas personas adquieren la micosis, pero la mayoría sólo desarrollan síntomas menores o ninguno; sólo una minoría de los enfermos progresan a la enfermedad completamente desarrollada y grave o mortal. (5,6)

TABLA N° 2: Infecciones micóticas principales y microorganismos causales.

Tipo de Infección	Microorganismo causal	Enfermedad
Superficial	*Malassezia furfur*	Pitiriasis versicolor
Cutánea	*Trichophyton, Epidermophyton y especies de Microsporum* *Candida albicans*	Dermatofitosis (tiña de piel, cuero cabelludo y uñas) Candidiasis cutánea y candidiasis bucal (algodoncillo) de membranas mucosas.
Subcutánea	*Sporothrix schenkii*	esporotricosis
Profunda	*Blastomyces dermatitidis* *Coccidioides inmitis* *Histoplasma capsulatum* *Paracoccidioides brasilensis*	Blastomicosis Coccidioidomicosis Histoplasmosis paracoccidioidomicosis
Profunda oportunista	*Aspergillus fumigatus y otras especies de Aspergillus* *Candida albicans y otras especies de Candida*	Aspergilosis Candidiasis
	Cryptococus neoformans *Especies de mucor Rhysopus*	Criptococosis Cigomicosis

Las reacciones inmunitarias mediadas por las células del huésped son de importancia capital en la determinación del resultado de estas infecciones.

Los hongos patógenos, por lo general, no producen toxinas, generalmente la patología se produce por las reacciones de hipersensibilidad que se generan en el huésped por sus constituyentes químicos.

Las micosis superficiales constituyen un grupo heterogéneo de afecciones muy frecuentes en la práctica clínica diaria y cuyos grupos son los siguientes:

- Por hongos filamentosos dermatofitos (*epidermophyton, tricophyton y microsporun*).
- Por hongos levadoriformes (*candida o Monilia*). (3,5).

Susceptibilidad de los microorganismos a los aceites esenciales (AE).

Los dermatofitos se encuentran entre los microorganismos más resistentes, aunque algunos (AE) demuestran ser altamente efectivos contra ciertos dermatofitos como: *Microsporun canis, trichophyton mentagrophytes, así como también Candida albicans* (9).

2.3. ACEITES ESENCIALES

2.3.1. DEFINICIÓN

Son llamados así los constituyentes odoríferos o “esencias” de una planta. El término aceite, probablemente, se origina del hecho que el aroma de una planta existe en las glándulas o entre las células en forma liquida, el cual al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua. La palabra esencial fue derivada del latín “quinta essentia” que significaba el quinto elemento, asignado a estos aceites, ya que la tierra, el fuego, el viento y el agua, fueron considerados los cuatro primeros elementos.

Químicamente están formados por monoterpenos y algunos sesquiterpenos, y compuestos aromáticos.

Son biosintetizados a partir de los pirofosfatos de geraniol y de farnesilo respectivamente. (7,15).

Los aceites esenciales son obtenidos del material fresco que los contiene utilizando principalmente el clásico procedimiento de destilación por arrastre de vapor; obtenido el aceite esencial éste es secado con sulfato de sodio anhidro. Otros métodos usuales son de: expresión, extracción con solventes lipofílicos y el enflorado; este último bastante usado en perfumería, consiste en que los pétalos de una flor, por ejemplo, se colocan y presionan entre dos láminas impregnadas de grasa en las cuales se absorbe el aceite, el que luego es extraído con alcohol. (7).

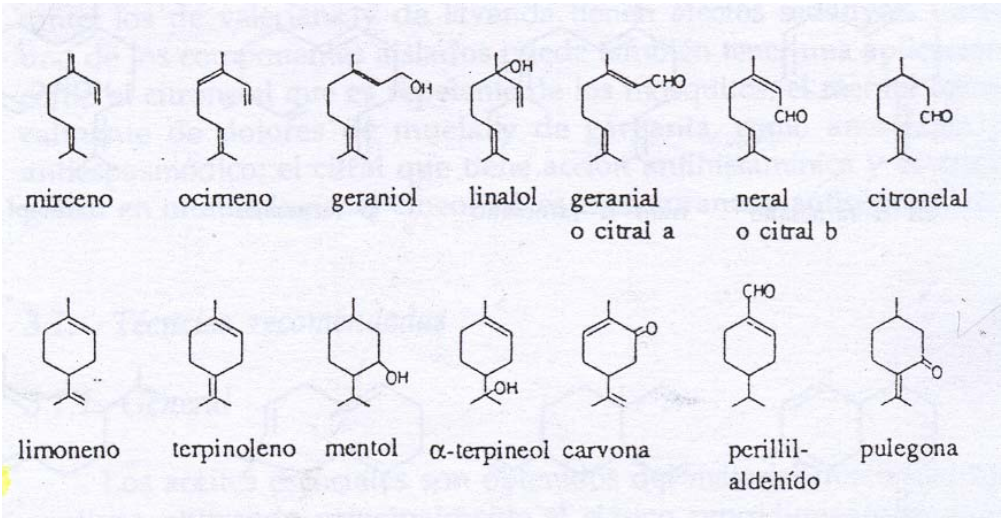


FIG. N° 2. MONOTERPENOS

2.3.2. PROPIEDADES FISICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Propiedades Generales de los aceites esenciales

- Líquidos a temperatura ambiente.
- Volátiles.
- Aromáticos.
- Incoloros o amarillentos.
- Menos densos que el agua (canela y clavo: más densos que el agua)
- Insolubles en agua.

- Lipófilos.
- Solubles en disolventes orgánicos.
- Solubles en alcoholes de alta graduación.
- Índice de refracción elevado.
- Extraíbles por arrastre de vapor de agua o expresión.
- Poder rotatorio (quirales). (8)

2.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL SOBRE LOS MICROORGANISMOS

Este mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y aún no ha sido del todo entendido y explicado.

El modo de acción de los (AE) también dependerá del tipo de microorganismos y esta principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos.

La acción de los (AE) sobre los dermatofitos es destruir la pared celular y la membrana citoplasmática; lo cual resulta ser un rompimiento del citoplasma y su coagulación. (9,10)

Las plantas demuestran cambios diversos, inducidos, en sus metabolitos secundarios tras la alimentación de insectos herbívoros a partir de ella. Los cuales difieren en su comportamiento alimenticio, fisiológico y modo de adherirse a la superficie de una hoja, y estas variaciones podrían reflejarse en las respuestas inducidas en plantas dañadas.

Cambios inducidos fueron analizados para M. mollis, una Lamiaceae con usos aromáticos y medicinales, y cuatro especies de insectos “hojivoros” con diferentes hábitos alimenticios (masticación, rascado o laceración, succión y punción). En las hojas de M. mollis expuestas experimentalmente a estos insectos, los niveles de dos monoterpenos dominantes (pulegona y mentona) fueron evaluados tras 24 y 48 horas de exposición. El contenido general de

mentona decreció en el aceite esencial de las hojas dañadas, mientras que las concentraciones de pulegona incrementaron a su vez.

Estos cambios ocurrieron también en hojas adyacentes no expuestas y sanas, sugiriendo una respuesta sistémica. La respuesta relativamente uniforme a diferentes tipos de daños podría atribuirse a la presencia de compuestos muy activos en el aceite esencial de M. mollis, como la pulegona. Por ende los efectos de estos tipos de daños en las hojas; las concentraciones de diferentes componentes del aceite esencial podrían ser significativos desde un punto de vista comercial. (11).

2.3.4. APLICACIONES DE ACEITES ESENCIALES.

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy variadas: son ampliamente utilizados en perfumería, como saborizantes de alimentos y en medicina. Ejemplo: los aceites esenciales de anís, menta y canela son carminativos y soporíferas; el de clavo de olor es analgésico. (7,8).

2.3.5. FUENTES DE MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA

Las especies de plantas conocidas oscilan entre 250.000 y 500.000. Esta riqueza es un recurso que no se aprovecha totalmente, a pesar de que su uso en el tratamiento de diversas enfermedades es ancestral. Dicha costumbre se ha conservado hasta nuestros días, principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido acumular un amplio conocimiento etnofarmacológico, punto importante de partida en las investigaciones dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad biológica. Los vegetales sintetizan metabolitos secundarios, como las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos. Por esta razón, dichas moléculas pueden ser candidatas para estudios in vitro contra agentes micóticos implicados en infecciones en humanos. En la actualidad se dispone de variados agentes antimicóticos obtenidos de plantas que se han probado tanto in vitro como in vivo con buenos resultados. De la destilación de las hojas de la planta australiana *Melaleuca alternifolia* se obtiene el aceite esencial del árbol del té (TeaTree Oil), un fitofármaco que ha

mostrado actividad antimicótica por la acción directa de los componentes activos, terpinen-4-ol y 1,8-cineol, a una concentración que varía del 29% al 45% y del 4,5% al 16,5%, respectivamente, contra las estructuras de las membranas celulares, no sólo en hongos sino también en bacterias. El aceite se utiliza para el tratamiento de infecciones en la piel por hongos de los géneros Candida y Malassezia, y en las onicomicosis causadas por dermatofitos. Con la aplicación tópica del aceite no se han descrito reacciones adversas; sin embargo, la administración oral accidental produjo toxicidad sistémica. En los extractos alcohólicos, los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los bulbos del ajo (*Allium sativum*) se ha demostrado un importante efecto antimicótico, atribuido a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros Candida, Malassezia, Cryptococcus y Aspergilllus, así como contra especies de dermatofitos y el hongo *Paracoccidioides brasiliensis*. La alicina, aunque es efectiva, ve limitado su uso por su inestabilidad; en contraste, el ajoeno, producto de la degradación de la alicina, es un compuesto más estable y la formulación tópica para el tratamiento de tineapedis, cruris y corporis ha mostrado resultados considerables. Así mismo, de la planta *Eucalyptus globuluse* obtienen aceites esenciales, extractos e infusiones con actividad antimicótica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol. El uso tópico del extracto crudo y el aceite esencial producen irritación dérmica y dermatitis de contacto. Las plantas *Thymus vulgaris y Thymus zygis* son fuente de las moléculas timol y carvacrol, ambas con reconocido efecto desinfectante en heridas y componentes de enjuagues bucales. Asimismo, es reconocida su actividad principalmente contra *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida, Aspergillus, Saprolegnia y Zygorhynchus* .Otras moléculas producidas por las plantas son las fitodefensinas, de naturaleza peptídica y ricas en cisteína, con capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios morfológicos y daño en algunas de sus estructuras celulares. En las semillas de la planta *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 el patógeno humano *Candida albicans*, la molécula impide el crecimiento a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,5 mg/l. (9,10).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPOS Y MATERIALES

Material Botánico: Aceite Esencial deshidratado, obtenido del *Minthostachys mollis.*

Cromatógrafo de Gases:

- Equipo Shimadzu GC 17
- Columna capilar: Supellco Wax 10
- Detector FIP
- Volumen de Muestra 1 Ul
- Gas de arrastre: Helio
- Temperatura de inyección: 250 ºC.
- Temperatura de detector: 220 ºC.

Medios de Cultivo:

- Agar Saboraud
- Caldo nutritivo
- Caldo Saboraud

Microorganismos de Prueba

- *Candida albicans ATCC*
- *Trichophyton tonsurans*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Microsporun canis*

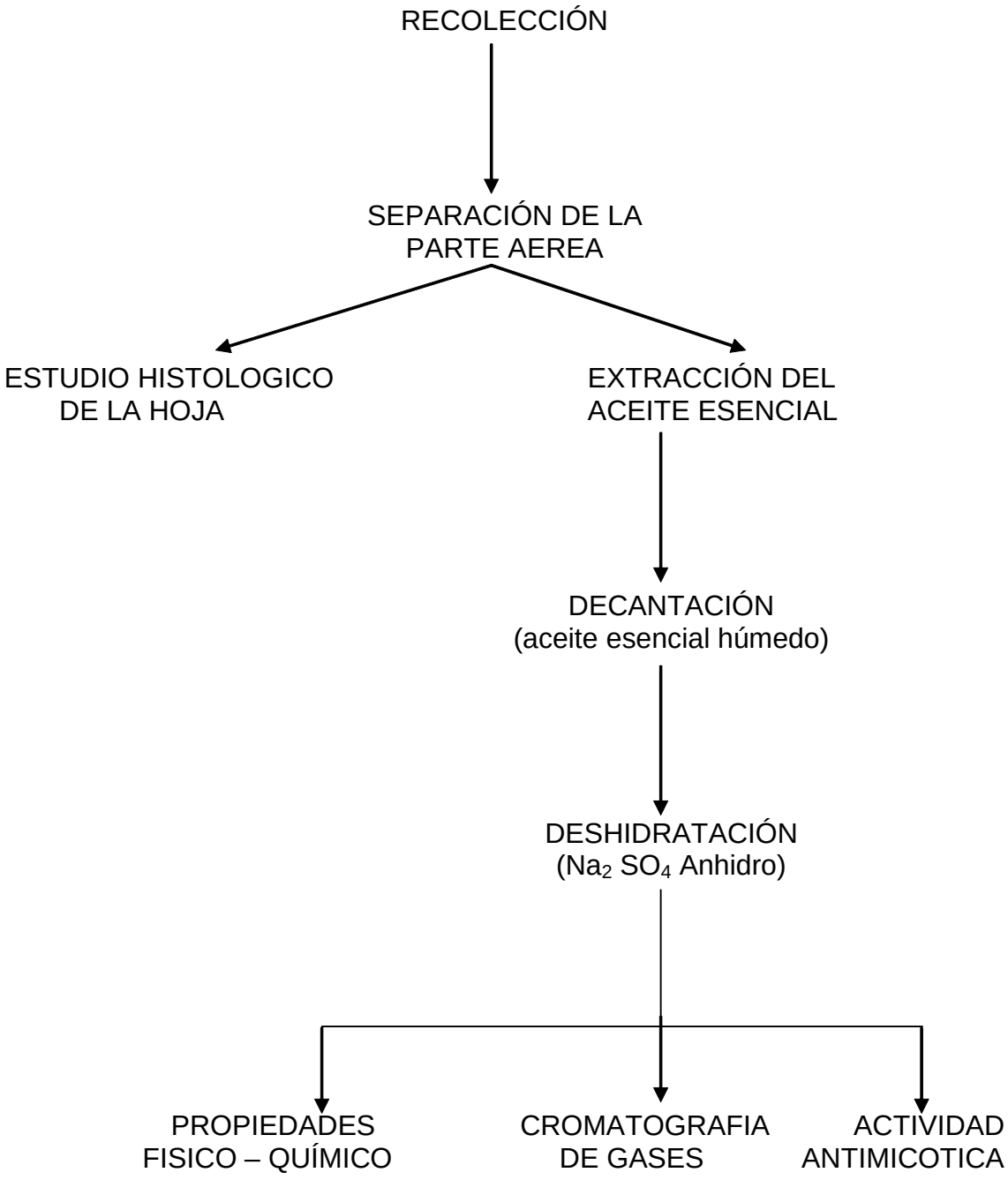
3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La planta fue recolectada en el distrito de Huacrapuquio (2.700 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 (parte aérea).

DIAGRAMA N° 1

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ESTUDIO FISICO – QUIMICO Y MICROBIOLOGICO



3.2.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Para realizar la extracción del aceite esencial de “muña” se utilizó el método de arrastre con vapor de agua y se siguió las pautas indicadas por Morales (1,23).

Se utilizo 10 kg de “muña” fresca, estabilizada, obteniéndose al final un total de 21 mL de aceite esencial. El proceso se realizo 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.(1).

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.

3.2.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial fue sometido a las siguientes pruebas

Características Organolépticas

A través de este análisis se confirmó las características propias del aceite esencial en cuanto a su aspecto, color, sabor.y olor.

Ensayos Físicos

Determinación de densidad

Se determinó la densidad por el método del picnómetro.

Determinación del índice de refracción

Índice de refracción (n) de una sustancia es el cociente entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. En importante para la identificación de sustancias y la detección de impurezas.

Aunque la temperatura estándar para las mediciones farmacopeicas es 25 ºC, muchas de las especificaciones de índice de refracción en las monografías individuales requieren la determinación de este valor a 20 ºC (1,12).

Rotación óptica

Es la medida de rotación de plano de polarización de la luz, a una longitud de onda definida, al atravesar un espesor determinado de aceite esencial. La longitud de onda es generalmente aquella correspondiente a la línea del sodio. (12,16)

Solubilidad

Para las determinaciones usuales de solubilidad de esencia se empleó alcohol etílico de 96º (12).

3.2.4. 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 Ing. Química de la Universidad Nacional de Ingeniería. Este ensayo se fundamente en el tiempo de retención de algunos de los componentes mediante un detector FID; luego mediante estándares conocidos se determino la composición cuali-cuanti centesimal de 4 monoterpenos del aceite esencial. (Ver anexo 4)

3.3. DETERMINACIÓN IN VITRO DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*

Se trabajó con el aceite esencial de especie *Minthostachys mollis* (Muña).

3.3.1. METODO DE AGAR EN DIFUSIÓN (Rojas R. et al., 2003)[21]

Fundamento

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.

Microorganismos

- *Candida albicans*
- *Microsporum canis*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Trichophyton tonsurans*

Preparación de las placas

Se utilizará 20 mL del medio agar dextrosa Sabouraud, fundido a 45 ºC que serán asépticamente mezclados con 1 mL de la suspensión fúngica (1 x 10^4 UFC/mL) en placas petri de 100 mm x 15 mm se deja solidificar y se rotula con el nombre del microorganismo testigo. Luego se hizo pozos con la ayuda de un sacabocado (tapón horadador) de 11 mm de diámetro.

Preparación de la suspensión del inóculo

Las soluciones de hongos se suspenden en solución salina estéril ajustado a 0,5 de la escala de McFarland para *Candida albicans* y por cámara contadora de células hemacitómetro para otros hongos (se corrobora por conteo de diluciones seriales en placa).

Inoculación de las muestras

Se procederá a colocar 0,1 mL del aceite esencial al 100 %, y 50 %, en los pozos previamente hechos. Se deja reposar por un periodo de 30 minutos a

temperatura ambiente y luego se llevó a una temperatura de incubación de 28 ºC de 14 a 21 dias dependiendo del hongo.

Las pruebas se realizaron por triplicado.

Lectura e interpretación de los resultados

Luego de transcurrir 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.

3.3.2. METODO DE DILUCION EN TUBO

Se empleo la técnica de agar en dilución **(Fenner R et al 2005)**[22] modificada.

Fundamento

Esta prueba se basa 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.

Microorganismos

- *Microsporum canis*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Trichophyton tonsurans*

Cepas clinicas

Agar usado

Agar selectivo para dermatofitos (DTM) según Taplin

Preparación de los extractos de prueba

Las diluciones se prepararon usando 5 y 50 uL del aceite esencial tal cual, diluido en 10 mL del agar DTM fundido e inoculado con el dermatofito de prueba. (1,9)

Preparación del Inóculo

Para Dermatofitos (Fernández-Torres B. et al., 2002)[23]

La preparación de las suspensiones de inóculo fue basada principalmente en las directrices NCCLS y el descrito previamente.

1. Los aislados fueron subcultivados en placas de agar DTM a 28 °C.
2. Las suspensiones del inóculo stock de cada uno de los aislados fueron preparadas para cada experimento de cultivos de 7 a 14 días en DTM. Las colonias fúngicas fueron cubiertas con 10 mL de agua destilada, y las suspensiones fueron hechas por sondeo cuidadoso de la superficie con la punta de una pipeta de Pasteur.
3. La mezcla resultante de conidias y de fragmentos hifales fueron retirados y transferidos a un tubo estéril. Las partículas pesadas fueron dejadas sedimentar por 5 a 20 minutos, y las suspensiones superiores homogéneas fueron recogidas y mezcladas con un mezclador de vórtice. La densidad de estas suspensiones fueron ajustados con un espectrofotómetro en una longitud de onda de 530 nm para obtener inóculos estandartizados % Transmisión (T) del 65 a 70 %.(0.6×10^6 a 3×10^6 UFC/mL)

IV. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA HOJA

Las hojas de Muña poseen un pecíolo corto; su limbo es de 2 a 3 cm de longitud, aovado, lanceolado, irregularmente aserrado con dientes agudos y nervio medio grueso. (1,2 y 8).

Al hacer un corte transversal se ha observado los siguientes caracteres anatómicos de la estructura bifacial de la hoja de *Minthostachys mollis*:

1. Epidermis superior, formada por células onduladas, que no poseen clorofila y con algunos pelos.
2. Mesófilo, con su parénquima en empalizada, que contiene células con muchos cloroplastos y solo consta de una sola capa.
3. Parénquima esponjoso, formado de varias capas y muy laxos.
4. Epidermis inferior, cuyas células son también onduladas, como las de la epidermis superior, aquí se encuentran en más cantidad tricomas glandulosos. (1,2)

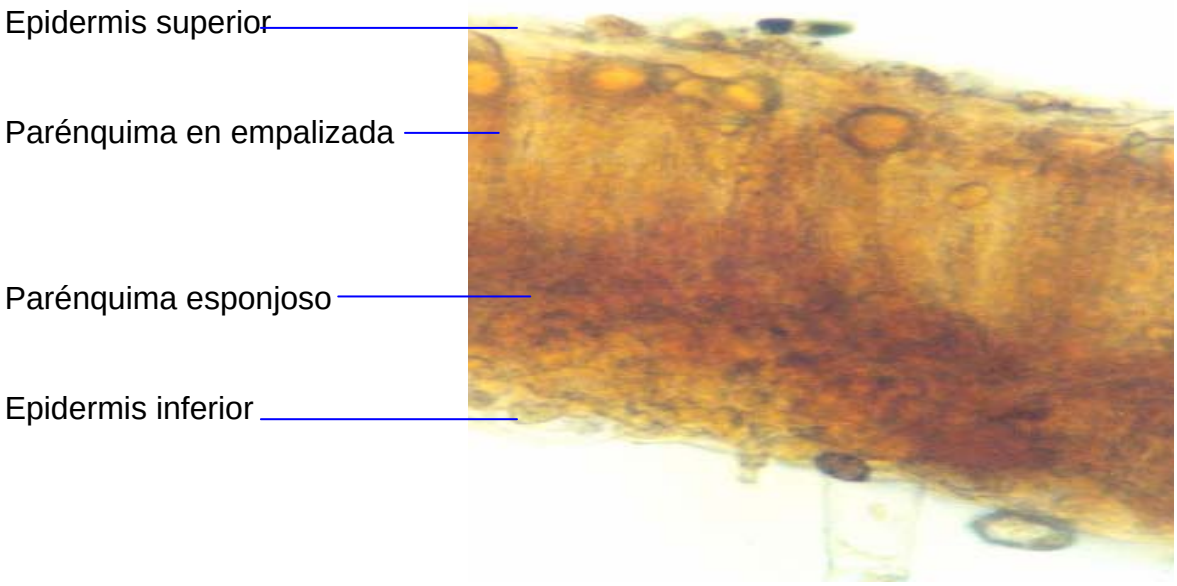


FIG. N° 3. CORTE TRANSVERSAL DE LA HOJA DE *M. MOLLIS.*

PELOS:

Los pelos de las partes aéreas o sea de las hojas parece que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial de aquí que al estrujarlo dejan sentir su aroma y el sabor picante que da una impresión de frío que es característico.

Pelos

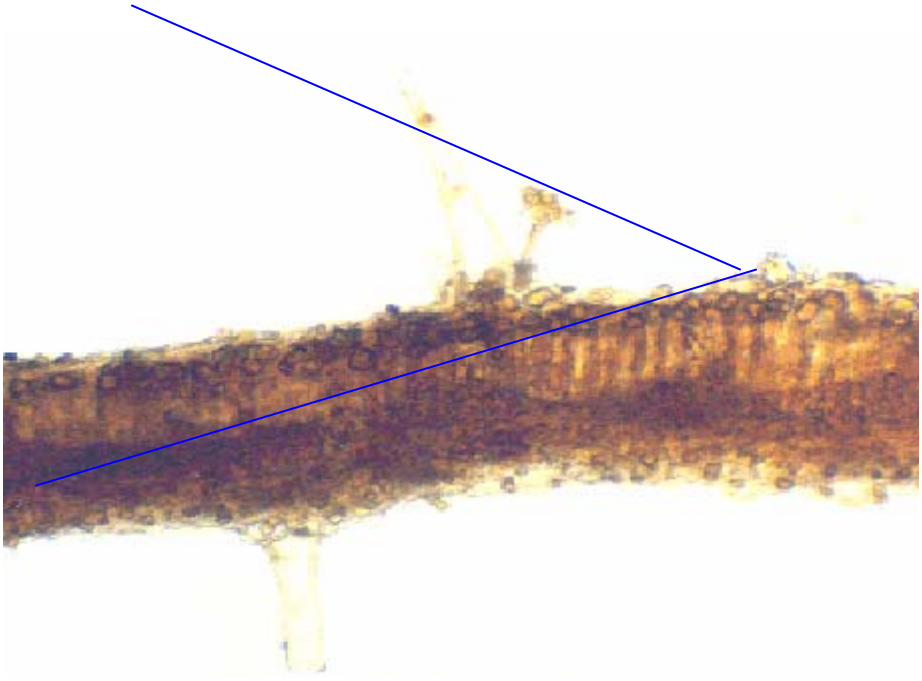


FIG. N° 4. CORTE TRANSVERSAL DE LA HOJA A MENOR AUMENTO DE *M. MOLLIS*

4.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El rendimiento, luego de la extracción del aceite esencial de “muña” por el método de arrastre con vapor de agua, fue de 0,19% p/p.

Características organolépticas y físico-químicas del aceite esencial de “muña” (1,12)

Las características organolépticas del aceite esencial son las siguientes:

- Color : Ligeramente verde amarillento
- Olor : Aromático agradable (parecido al mentol)
- Sabor : Picante – Fresco no persistente
- Aspecto general : Líquido fluido y transparente

Con respecto a la composición química del aceite esencial de “muña”, existen pocos trabajos de investigación por lo que se tiene poca información; el aceite esencial de “muña”, al igual que otros aceites esenciales, presenta una estructura aldehídica, cetónica, alcohólica (mentol y mentona), ésteres, éteres y terpenos en mayor porcentaje.

PROPIEDADES FÍSICO – QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE “MUÑA” (12)

Densidad relativa (25 ºC)	0,9189
Rotación específica (20 ºC)	+3° 45
Índice refracción (20 ºC)	1,4727
Solubilidad en etanol	95%

TABLA N°. 3: Porcentaje de terpenoides obtenidos en la muestra del Aceite Esencial-

TR	Analito	Composición
5,32	Limoneno	0,7699
11,094	Mentona	24,24
13,198	Pulegona	36,68
12,8	Mentol	No detectable

4.3. LECTURA DE RESULTADOS DE PRUEBAS IN VITRO

Ninguna de las placas inoculadas con la muestra al 100% y 50%, muestra crecimiento alguno.

Las placas control sin (AE), muestran crecimiento.

Resultados de la prueba de difusión en Agar

Microorganismo: *Candida albicans* cepa clínica

Muestra:

- Aceite de muña 100%
- Aceite de muña 50%

TABLA N°. 4: Halos de Inhibición (Diámetros)

	Candida albicans	***Trichophyton mentagrophytes***
Aceite de “muña” 100%	30 mm	> 90 mm (todo el diámetro de la placa)
Aceite de “muña” 50%	35 mm	> 90 mm
Alcohol (control neg.)	0 mm	0 mm

Promedio de lectura (triplicado)

Tanto para Trichophyton tonsurans como para *Microsporum canis* se evidencio el mismo resultado que *Trichophyton mentagrophytes.*

METODO DE DILUCION EN TUBO

Lectura de resultados

- **Para dermatofitos**

Los tubos fueron determinadas por inspección visual de la inhibición de crecimiento de cada uno de los tubos comparado con el tubo control de crecimiento (libre de muestra).

Los tres microorganismos (*Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton tonsurans*) son sensibles a las concentraciones ensayadas al aceite esencial de *Minthostachys mollis* tanto en los tubos con 5 y 50 uL de muestra; esto se evidencia en las respectivas fotos.

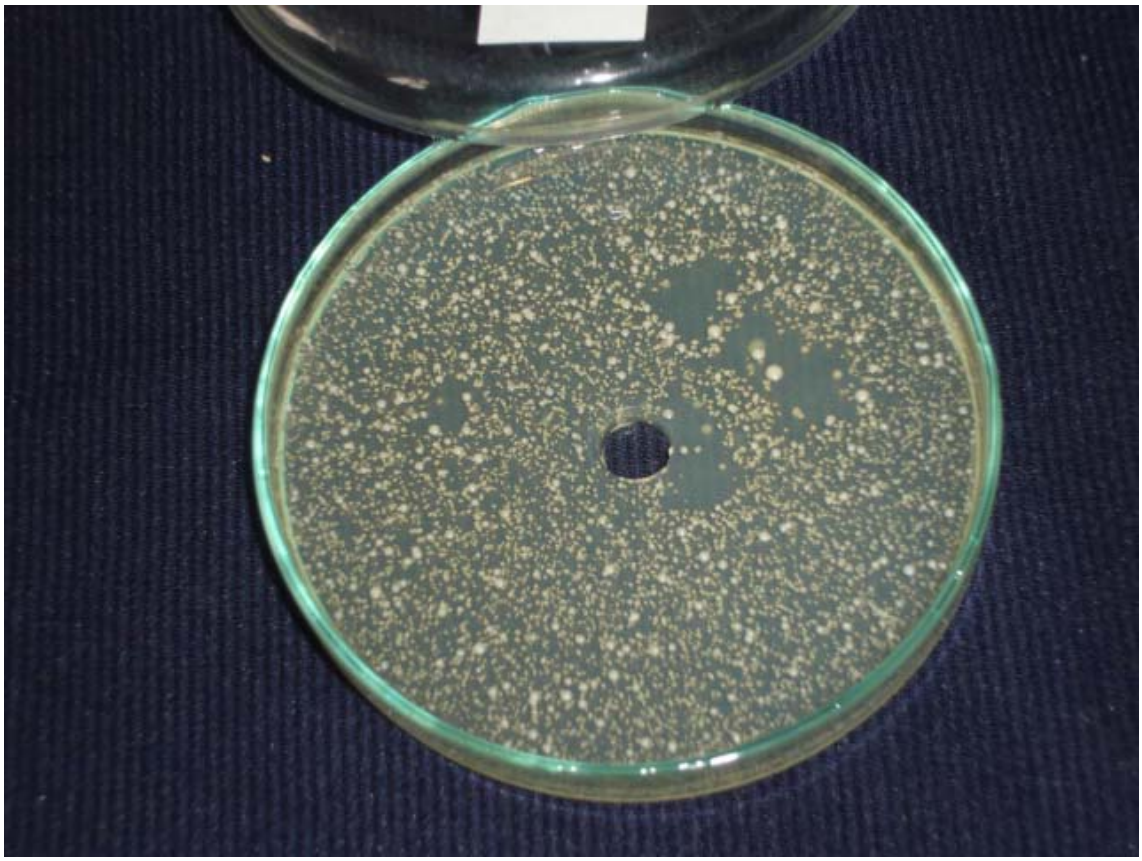


FIGURA N° 5: METODO DE AGAR EN DIFUSIÓN

Cepa Candida albicans ATCC 32148, proporcionada por el Instituto de Microbiologia "Simon Perez Alva" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM

Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Minthostachys mollis*

Prueba de control negativo con etanol al 95%.

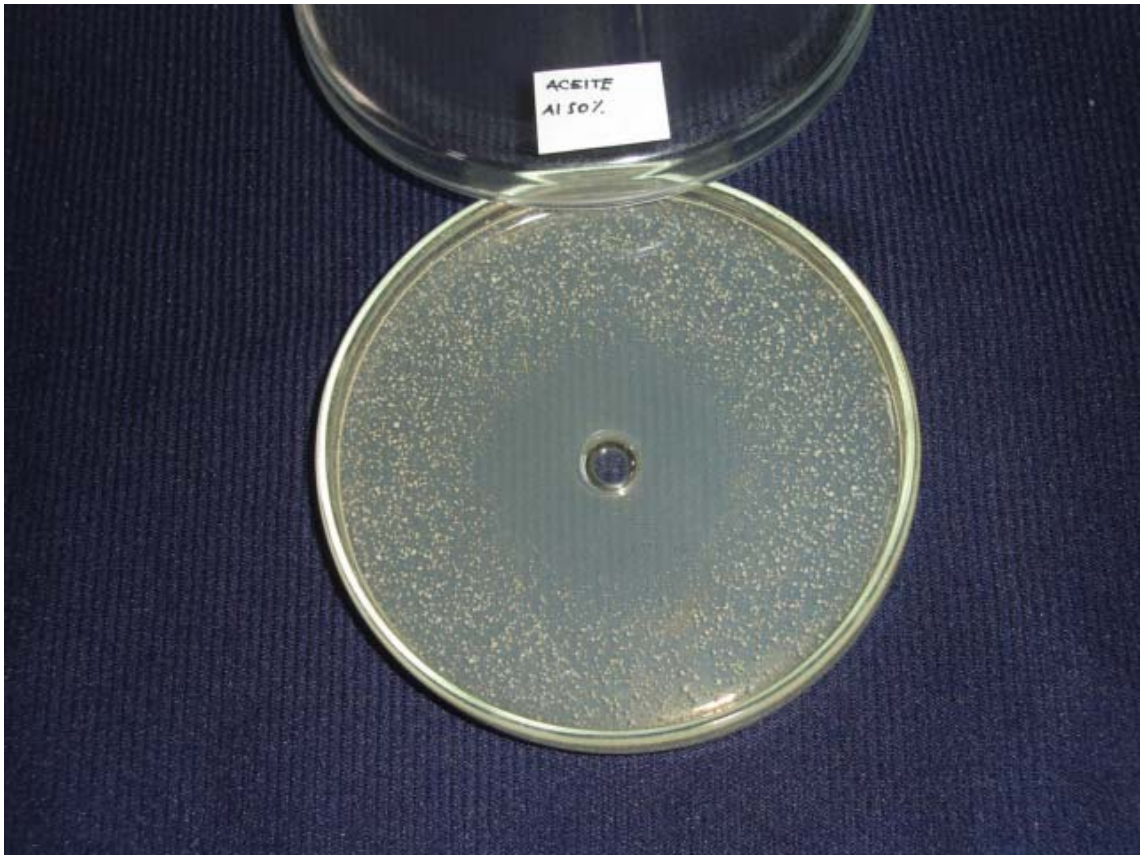


FIGURA N° 6: METODO DE AGAR EN DIFUSIÓN

Cepa Candida albicans ATCC 32148, proporcionada por la Facultad por el Instituto de Microbiologia "Simon Perez Alva" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM

Concentración del Aceite esencial 50%

Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Minthostachys mollis*

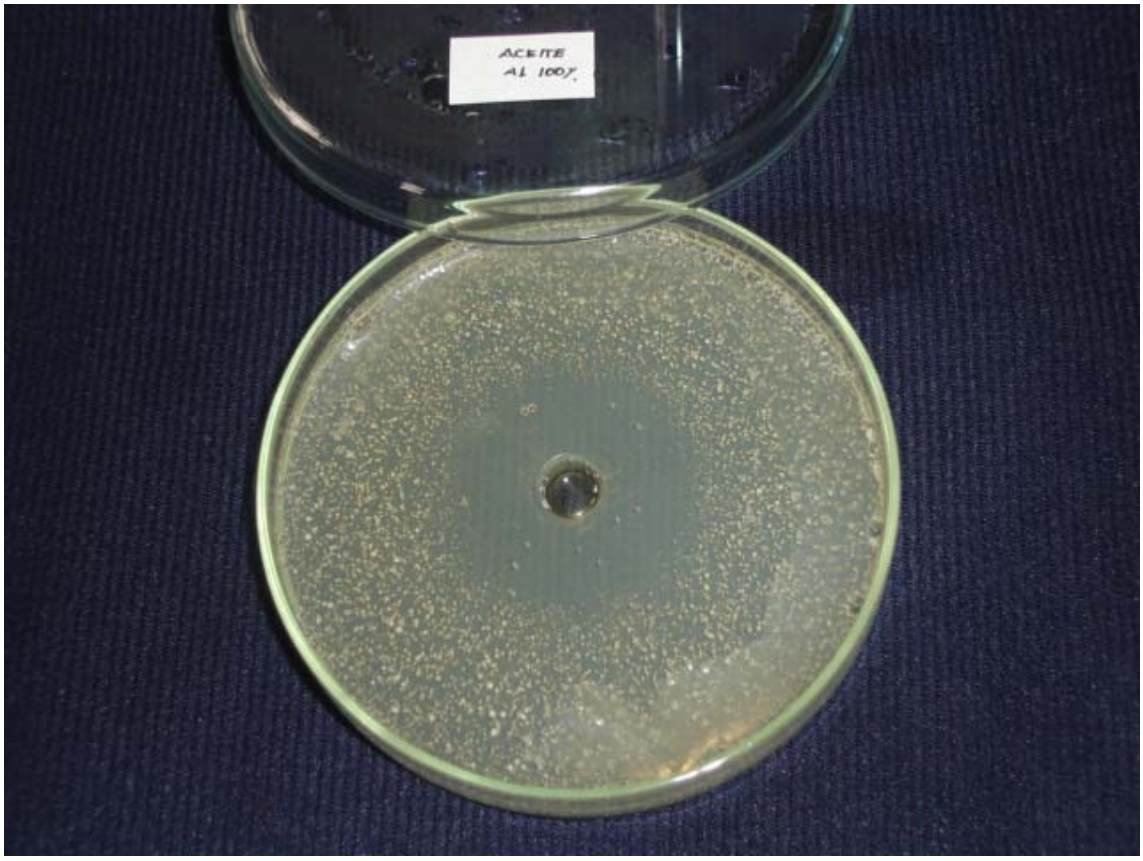


FIGURA N° 7: METODO DE AGAR EN DIFUSIÓN

Cepa Candida albicans ATCC 32148, proporcionada por el Instituto de Microbiologia "Simon Perez Alva" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM

Concentración del Aceite esencial 100%

Evaluación de la antifúngica del aceite esencial de *Minthostachys mollis*



FIGURA N° 8: MÉTODO DE DILUCIÓN EN TUBO

Cepa Mycrosporum canis, proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical (Departamento de Micología) de la UNMSM.

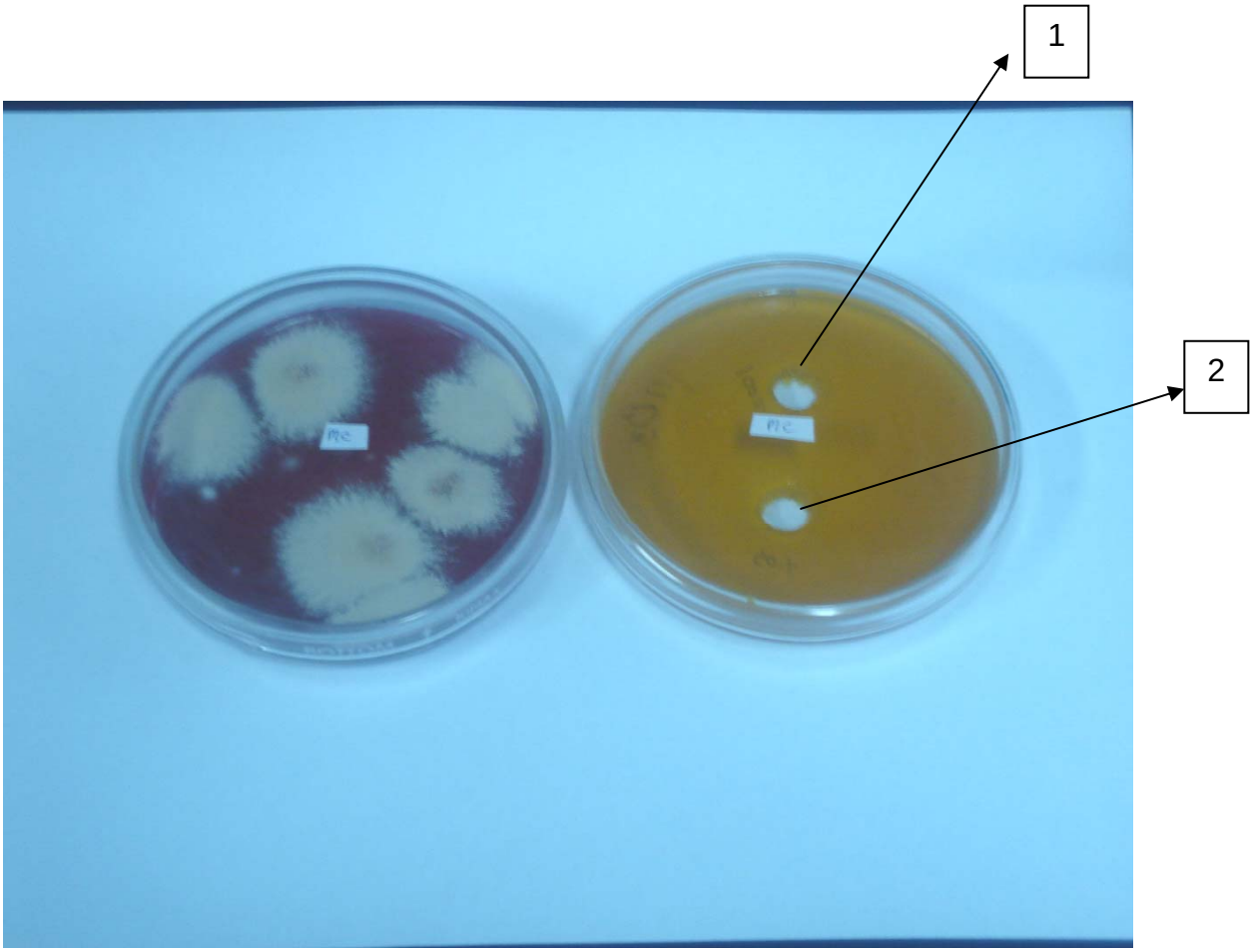


FIGURA N° 9: MÉTODO DE AGAR EN DIFUSIÓN

Cepa Mycrosporum canis, proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical (Departamento de Micología) de la UNMSM.

1) **Concentración del aceite esencial al 50%**
2) **Concentración del aceite esencial al 100%**



FIGURA N° 10: MÉTODO DE DILUCIÓN EN TUBO

Cepa Trichophyton tonsurans, proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical (Departamento de Micología) de la UNMSM.

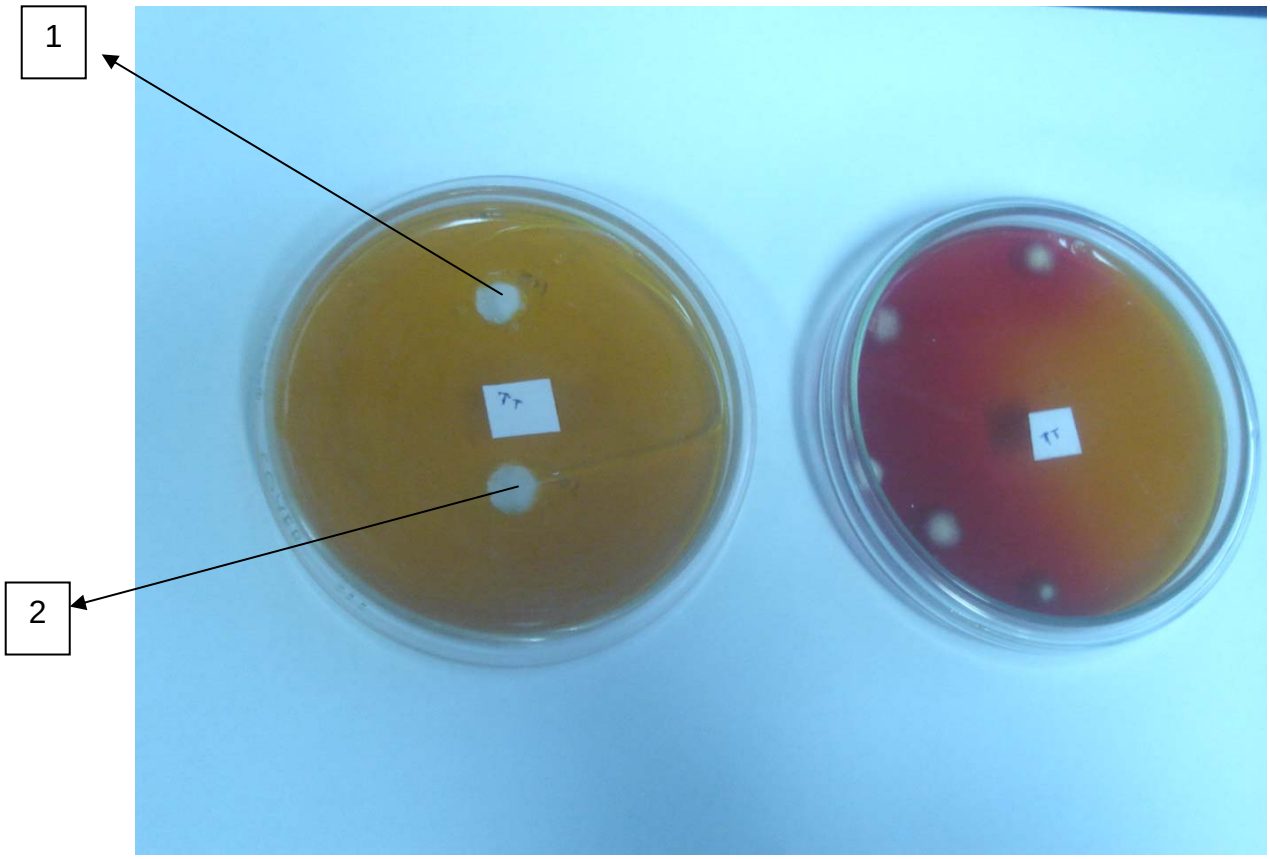


FIGURA N° 11: MÉTODO DE AGAR EN DIFUSIÓN

Cepa Trichophyton tonsurans, proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical (Departamento de Micología) de la UNMSM.

1) **Concentración del aceite esencial al 50%**
2) **Concentración del aceite esencial al 100%**



FIGURA N° 12: MÉTODO DE DILUCIÓN EN TUBO

Cepa Trichophyton mentagrophytes, proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical (Departamento de Micología) de la UNMSM.



FIGURA N° 13: MÉTODO DE AGAR EN DIFUSIÓN

Cepa Trichophyton mentagrophytes, proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical (Departamento de Micología) de la UNMSM

Concentración de aceite esencial al 100%

V. DISCUSIÓN

En la destilación de las partes aéreas de la planta: *Minthostachys mollis,* se obtuvo un rendimiento del aceite esencial de 0,19%(p/p).

En cuanto a los Ensayos Físicos tales como la densidad e índice de refracción, se pueden hacer deducciones sobre sus componentes: en nuestro caso el aceite esencial de muña presenta una densidad de: 0,9189 e índice de refracción 1,4727; lo que nos indica que la muestra esta conformada posiblemente por sustancias oxigenadas aromáticas ó alicíclicas.(7,12).

El análisis mediante Cromatografía de Gases que se fundamenta en el tiempo de retención a una temperatura y presión determinadas, luego mediante la biblioteca de estándares se informó de la presencia de 4 metabolitos en mayor proporción: Pulegona (36,68%), Mentona (24,24%), Limoneno (0,7699%) y Mentol en trazas. (Ver Anexo).

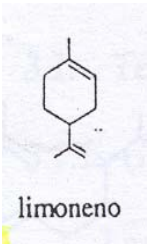
En el presente estudio se demuestra la gran utilidad de los ensayos in vitro, tales como: el método de agar en difusión, que se fundamenta en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros. y el método de dilución en tubo, que se basa 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. (9,16).

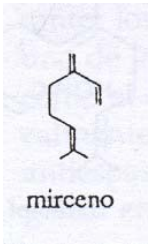
Un aspecto que ha complicado la situación es el desarrollo de mecanismos de resistencia a los antimicóticos sintéticos por algunas especies, se explica en parte porque la mayoría de fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, lo cual permite la aparición de clones resistentes. Por tanto ante este aumento de infecciones por hongos, se lleva a cabo una constante búsqueda de alternativas terapéuticas

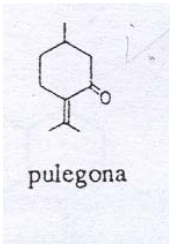
eficaces entre las plantas medicinales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos. (9,10).

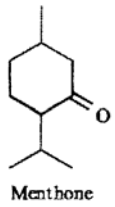
Se reconoce que la actividad antimicótica del Aceite Esencial (AE), dependen de sus propiedades lipofilicas o hidrofilicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana, por ej. ciertos componentes de (AE) pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP. (9)

Para demostrar la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* de compuestos de monoterpenos de diversas estructuras químicas y una compleja composición química. Estas mezclas de metabolitos secundarios mostraron un amplio espectro fungicida-fungistático frente a cepas tales como: *Candida* albicans, dermatofitos: *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton tonsurans* y *Mycrosporum canis*. Los analitos responsables de estas actividades son: Pulegona, Mirceno, Limoneno y Mentona.(14).









En cuanto a las pruebas in vitro, estas han demostrado una gran ayuda en años recientes, a la búsqueda de nuevas drogas para combatir las infecciones es de absoluta necesidad y en cuanto a los aceites esenciales se consideran una gran alternativa de esperanza para las infecciones. (9, 10,14 y 16).

En los estudios de las actividades farmacológicas de los aceites esenciales debe tenerse en consideración diferentes factores, los cuales pueden afectar los resultados de estos estudios (especies, factores ecológicos y condiciones ambientales). Como así también: el porcentaje de humedad del material recolectado, y los métodos de extracción han sido identificados como

posibles fuentes de variación de la composición química, toxicidad y bioactividad de los aceites esenciales. (16)

Es por esta razón que pocos estudios de aceites esenciales se han publicado a elucidar el grado de especificidad del efecto de estos compuestos frente a las diferentes actividades de su bioactividad. (9,16).

En cuanto al mecanismo de acción del aceite esencial de las hojas de la muña, se fundamenta en: la destrucción de la pared del hongo y la membrana citoplasmática los cuáles resultan en el rompimiento de la membrana y coagulación del citoplasma. El aceite esencial también inhibe la síntesis de DNA, RNA, proteínas y polisacaridos en los hongos, evocando cambios similares a los obtenidos a los antimicóticos de acción tópica (clotrimazol, miconazol etc). (9,6).

Se han reportado en trabajos de investigación en los cuales los aceites esenciales son más efectivos que los agentes sintéticos (antimicóticos).

En las semillas de la planta *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 el patógeno humano *Candida albicans*, la molécula impide el crecimiento a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,5 mg/l. (10).

Timol, carvacrol inhibieron el crecimiento de un gran número de microorganismos, y su eficacia contra: *Phytophora capsicii*, fue mayor que al de los antimicóticos de patente. (9 y 10)

En la acción antimicótico de estos componentes (metabolitos secundarios) el carácter lipofílico e hidrofílico de sus grupos funcionales son de gran importancia, debido a la polaridad que poseen tiene propiedades antisépticas, antimicrobianos y antimicóticos, siendo esta actividad biológica de mayor a menor: fenoles, aldehidos, cetonas y alcoholes. Los esfuerzos para encontrar una correlación entre la composición y bioactividad de los aceites

esenciales no ha sido totalmente dilucidada. Se presume que la actividad biológica de estos (AE) no esta determinada por la cantidad de los monoterpenos, sino más por tasa de proporcionalidad de los mismos. (9 y 16).

Existe pues una razón primordial para que el análisis de la composición y bioactividad del aceite esencial de las hojas de: *Minthostacys mollis*, debe ser estudiado e investigado intensivamente en la actualidad, debido a que la drogas obtenidas por síntesis química, así como los conservadores son considerados carcinogenéticos y teratogénicos. (10).

Por lo antes 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.

VI. CONCLUSIONES

1. La muestra botánica de Minthostachys mollis (muña), recolectada en la Provincia de Tarma, Junin tuvo un rendimiento de: 0,19% de aceite esencial,el cual contiene:Pulegona,Mentona y Limoneno identificados por CG.

2. El aceite esencial de “muña” presenta y muestra efectos antimicóticos frente a cepas de *Candida albicans a las concentraciones de 50 % y 100 % y* frente a los dermatofitos: (*Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton tonsurans*) son sensibles en los volumenes ensayados de:5 y 50 uL.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Inga BA., Guerra MB. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la Salud [Tesis de Licenciatura]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.

2. Palacios Vaccaro. Plantas Nativas Medicinales. 1ª ed. Lima: Concytec. 1997.

3. Flores Jesús. Farmacología Humana. México: Ediciones Científicas y Técnicas. 1992.

4. Hernández Díaz L, Rodríguez Jorge M. Actividad Antimicrobiana de Plantas que crecen en Cuba. Rev cubana plant med. 2001; 2:44-47.

5. Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 7ª ed. Buenos Aires: El Ateneo. 1986.

6. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 6ª ed. México: Interamericana. 1985.

7. Lock Olga. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo Editorial PUCP. 1994. p. 23-34.

8. Kuklinski Claudia, Farmacognosia, Editorial Omega, 2003, Barcelona, España.

9. 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. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils Current Medicinal Chemistry, 2003, 10, 813-829

10. Mesa Arango AC, Bueno Sánchez JG, Betancur Galvis LA. Productos naturales con actividad antimicótica. Rev Esp Quimioterap. 2004; 17(4):325-331.

11. Banchio E, Zygadlo J, Valladares GR. Quantitative variations in the essential oil of Minthostachys mollis (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits. J Agric Food Chem. 2005 Aug 24;53(17):6903-6.

12. Fuertes RC, Munguía SY. 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. 2001; 4(1):23-39.

13. M. S. Ali-Shtayeh and Suheil I. Abu Ghdeib, mycoses 42, 665–672 (1999) Accepted: July 22, 1998. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes.

14. Dr. Duke's Phytohemical 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.

15. Domínguez X. Métodos de Investigación Fitoquímica. 3ª ed. México: Limusa S.A. 1985. p. 229-238.

16. Mouhssen Lahlou. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. Phytother. Res. 2004; 18:435–448.

17. Douglas AS. Análisis Instrumental. 4ª ed. Madrid: Mc.Graw Hill. 1980.

18. Cabieses F. Apuntes de Medicina Tradicional. 1ª ed. Lima: A&B S.A. 1993. p. 316-360.

19. Castro AG, Lema MN. Determinación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales de Huancayo y Huarochirí [Tesis de Licenciatura]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1993.

20. Schauenberg P, Paris F. Guía de las Plantas Medicinales. Barcelona: Omega S.A. 1992. p. 239.

21. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants J Ethnopharmacol. 2003; 88 (2-3): 199–204

22. Fenner R, Sortino M, Rates SM, Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nor C, von Poser G, Schapoval E, Zacchino S. Antifungal activity of some Brazilian Hypericum species. Phytomedicine. 2005 Mar;12(3):236-40.

23. Fernández-Torres B, Cabañes FJ, Carrillo-Muñoz A, Esteban A, Inza I, Abarca L, Guarro J. Collaborative evalluation of optimal Antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes J Clin Microbiol 2002; 40(11): 3999-4003

24. Wagner H, Bladt E. Plant Drug Análisis. Munich: Springer. 1995. p. 134-35.

25. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima: Disponible en: www.upch.edu.pe/upchvi/viceinv/sidisi/verresumen.asp
Acceso el 12 de Julio de 2005.

26. Brunetton,J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. España: Acribia S.A. 1996. p. 230 - 45.

27. Larrondo MR, González AA, Hernández GL. Micosis Superficiales. Dermatofitosis. Rev Cubana Med Gen Integr. 2001; 17(6):559-64

28. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Disponible en: http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c78.htm
Acceso el 20 de Julio de 2005.

29. Abbott Laboratorios. Vademécum PR. Lima. 2002.

30. Farmacias Ahumada. Santiago de Chile. Disponible en: http://www.farmaciasahumada.cl/stores/fasa/html/MFT/DROGAS/D336.HTM
Acceso el 20 de Julio de 2005.

31. Universidad Autónoma de México. México. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/9745.htm
Acceso el 18 de Marzo de 2006.

32. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. Lima. 1995.

33. E-medicum. Buenos Aires. Disponible en: http://www.e-medicum.com/vademecum/producto.php?id=226
Acceso el 12 de Agosto de 2005.

34. Rodríguez Pargas A, Del Carmen León M, Hernández Rodríguez A, Lunco Barranco J. Actividad Antifungica in vitro de una crema de *Plantago major* L. Rev cubana plant med. 1996; 13:9-12.

35. Guerra Ordóñez M, Mayra Rodríguez J, Gastón García S. Llerena Range C. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Staff. Rev Cubana Plant Med. 2004; 9(2):44-47.

36. Revista Cubana. Guía para realizar un protocolo de Ensayo Clínico con productos herbarios Para realizar un ensayo clínico con un medicamento herbario. Rev cubana plant med. 1998; 3(2):83-8.

IX. ANEXOS

ANEXO N° 1

Minthostachys mollis (KUNTH.) GRISEB - Lamiaceae

ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS MONOTERPENOS: PULEGONA, MIRCENO, LIMONENO Y MENTONA

Actividades Farmacológicas de la Pulegona (Biological Activities of PULEGONE)

Inhibidor de la acetil colinesterasa (AChE-Inhibitor)
Antialzheimer (Antialzheimeran)
Antibacteriano (Antibacterial)
Antihistamínico (Antihistaminic)
Antipirético (Antipyretic)
Preventivo del Cancer (Cancer-Preventive)
Candidiasis (Candidicide)
Cerebrotóxico (Cerebrotoxic)
Encefalopático (Encephalopathic)
Saborizante (Flavor)
Fungicida (Fungicide)
Alucinogéno (Hallucinogenic)
Hepatotóxico (Hepatotoxic)
Herbicida (Herbicide)
Insecticida (Insecticide)
Insectifugo (Insectifuge)
Nefrotóxico (Nephrotoxic)
Neurotóxico (Neurotoxic)
Esencia (Perfumery)
Pesticida (Pesticide)
Pulifugo (Pulifuge)
Pulmotóxico (Pulmonotoxic)
Sedativo (Sedative)

Actividades Farmacológicas de la Mircene (Biological Activities of MYRCENE)

Inhibidor de la acetilcolinestarasa (ACE-Inhibitor)
Alergénico (Allergenic)
Antibacteriano (Antibacterial)
Anticonvulsivante (Anticonvulsant)
Antimutagénico (Antimutagenic)
Antioxidante (Antioxidant)
Antiespasmódico (Antispasmodic)
Saborizante (Flavor)
Fungicida (Fungicide)
Hipotérmico (Hypothermic)
Insectifugo (Insectifuge)
Irritante (Irritant)
Miorrelajante (Myorelaxant)
Esencia (Perfumery)
Pesticida (Pesticide)

Actividades Farmacológicas del Limoneno (Biological Activities of LIMONENE)

Inhibidor de la Acetilcolinesterasa (AChE-Inhibitor)
Acaricida (Acaricide)
Alergénico (Allergenic)
Antialzheimer (Antialzheimeran)
Antiasmatico (Antiasthmatic)
Antibacteriano (Antibacterial)
Anticancerigeno (Anticancer)
Antigripal (Antiflu)
Antiinflamatorio (Antiinflammatory)

Antilinfómico (Antilymphomic)
Antimutagénico (Antimutagenic)
Anti Obesidad (Antiobesity)
Antiséptico (Antiseptic)
Antiespasmódico (Antispasmodic)
Antitumoral (Antitumor)
Antitumoral de Seno (Antitumor (Breast)
Antitumoral de Páncreas (Antitumor (Pancreas)
Antitumoral de Próstata (Antitumor (Prostate)
Antiviral (Antiviral)
Broncoprotector (Bronchoprotectant)
Preventivo de Cancer (Cancer-Preventive)
Candidiasis (Candidistat)
Expectorante (Expectorant)
Saborizante (FLavor)
Fungifilico (Fungiphilic)
Fungistático (Fungistat)
Inductor gastro cinético (GST-Inducer)
Herbicida (Herbicide)
Histámico (Histaminic)
Inmunodulador (Immunomodulator)
Insecticida (Insecticide)
Insectifugo (Insectifuge)
Irritante (Irritant)
Lipolitico (Lipolytic)
Miorrelajante (Myorelaxant)
Nematicida (Nematicide)
Pesticida (Pesticide)
Fotosensibilizante (Photosensitizer)
Sedativo (Sedative)

Actividades Farmacológicas de la Mentona (Biological Activities of MENTHONE)

Acaricida (Acaricide)
Analgésico (Analgesic)
Antiagregante (Antiaggregant)
Antialergico (Antiallergic)
Antibacillar (Antibacillary)
Antibacteriano (Antibacterial)
Antihistamínico (Antihistaminic)
Antisalmonellosis (Antisalmonella)
Antiséptico (Antiseptic)
Antiespasmódico (Antispasmodic)
Antiestafilococo(Antistaphylococcic)
Preventivo del Cancer (Cancer-Preventive)
Candidiasis (Candidicide)
Cerebrotóxico (Cerebrotoxic)
Saborizante (Flavor)
Fungicida (Fungicide)
Insecticida (Insecticide)
Larvicida (Larvicide)
Mutagénico (Mutagenic)
Nematicida (Nematicide)
Esencia (Perfumery)
Pesticida (Pesticide)
Sedativo (Sedative)
Tricomonicida (Trichomonicide) (14)

ANEXO N° 2

Minthostachys mollis (KUNTH.) GRISEB - Lamiaceae

Nombre Común “Muña”

Relación de Metabolitos. (chemicals)

Chemical	Part	Lo ppm	Hi ppm	Reference
(E)-BETA-OCIMENE	Hoja	3	18	EB48:60
(Z)-BETA-OCIMENE	Hoja	4	8	EB48:60
ALPHA-HUMULENE	Hoja	1	5	EB48:60
ALPHA-PINENE	Hoja	2	4	EB48:60
BETA-CARYOPHYLLENE	Hoja	11	32	EB48:60
BETA-PINENE	Hoja	3	5	EB48:60
EO	Hoja	700	900	EB48:60
ISOMENTHOL	Hoja	3	9	EB48:60
ISOMENTHONE	Hoja	23	44	EB48:60
ISOMENTHYL-ACETATE	Hoja	95	230	EB48:60
LIMONENE	Hoja	4	10	EB48:60
MENTHOL	Hoja	120	215	EB48:60
MENTHONE	Hoja	130	265	EB48:60
MENTHYL-ACETATE	Hoja	0.5	1	EB48:60
MYRCENE	Hoja	0.4	0.5	EB48:60
NEOMENTHOL	Hoja	180	300	EB48:60
NEOMENTHYL-ACETATE	Hoja	16	28	EB48:60
PIPERITONE	Hoja	50	100	EB48:60
PULEGONE	Hoja	3	10	EB48:60
SABINENE	Hoja	1	2	EB48:60

ANEXO N° 3

Minthostachys mollis (KUNTH.) GRISEB - Lamiaceae

Monoterpenos con actividad Fungicida (Chemicals with Fungicide Activity)

MENTHONE

MYRCENE

PULEGONE

Minthostachys mollis (KUNTH.) GRISEB - Lamiaceae

Monoterpenos con actividad Fungistática (Chemicals with Fungistat Activity)

LIMONENE

ANEXO N° 4

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA Y TEXTIL
Laboratorio de Investigación y Química Aplicada N ° 21
Av. Túpac Amaru 210. Lima 25 PERU – Apartado 1301
Teléfonos 481-0662, Central FIQT 381-3849 / 381-3867 anexo 37 telefax 481-7919

INFORME N° 076-06-L21-FIQT-06

SOLICITANTE	:	Carlos A Cano Perez
MUESTRA	:	Aceite de muña
ENSAYO	:	Análisis cromatográfico
FECHA	:	02-03-06

REPORTE DE RESULTADOS

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

Se adjunta cromatograma

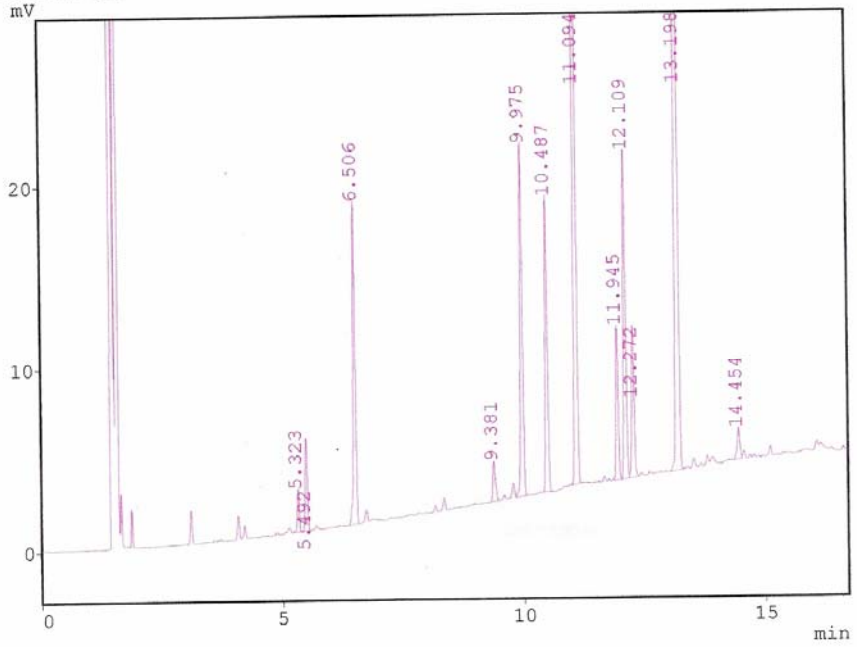
Agradeciendo su atención y sin otro particular, quedamos de usted. ,

Atentamente,

ING. ENRIQUE F. NEIRA MONTOYA
Jefe (e) del Lab.N°21

DATA=CANO01.D01 06/03/01 14:47:14
Vial # : 1
Sample : muña
ID : aceite
Inj. Volume : 1
Type : Unknown
Detector : WFID
Operator : E. Neira
Method Name : MUÑA.MET

*** Chromatogram *** Filename:CANO01.C01



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC [%]
1	5.323	6420	2330	V		0.7699
2	5.492	15970	5064	V		1.9151
3	6.506	56441	17720			6.7683
4	9.381	8185	2197			0.9815
5	9.975	65037	19378	V		7.7990
6	10.487	51967	16238			6.2317
7	11.094	202149	68062			24.2412
8	11.945	27351	8488	V		3.2799
9	12.109	57478	18005	V		6.8926
10	12.272	30195	8368	V		3.6209
11	13.198	305947	93542			36.6884
12	14.454	6766	1697			0.8114
		833906	261087			100.0000

<Temporary> 4 - 1/1 06/03/01 15:34:43