

ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) COMPARADO CON EL FLUCONAZOL EN CULTIVO DE *Candida albicans*

Alcalá-Marcos Katherine M^{1,2,3 a}, Alvarado-Gamarra A. Giancarlo^{1,2,3 a},
Alejandro-Paredes L Arturo⁴, Huayané-Linares Eduardo^{1, a}

¹ Facultad de Medicina "Hipólito Unanue", Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú.

² Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina Villarrealinos, Lima, Perú.

³ Sociedad Científica Médico Estudiantil Peruana.

⁴ Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

^a Estudiante de Medicina

CIMEL 2011; 16(2):83-86

RESUMEN

Objetivo.- Demostrar el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación con el Fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. **Materiales y Método.-** Estudio experimental. El efecto antimicótico se estudió midiendo 80 halos de inhibición distribuidos en 5 grupos mediante el método Kirby-Bauer. Se utilizó una cepa clínica de *Candida albicans*. Los grupos de estudio fueron grupo muña 25% (GM25%), grupo muña 50% (GM50%), grupo muña 100% (GM100%), un grupo control positivo (Fluconazol), y un grupo control negativo (aceite mineral). El análisis estadístico se realizó mediante la Prueba de Kruskal-Wallis y el Test de Dunn usando el paquete SPSS v.17.0. Se consideró un nivel de significancia $< 0,05$. **Resultados.-** La mediana de los halos de inhibición del GM25% fue de 32,00 mm (31,00 a 33,75); del GM50%: 40,00 mm (39,25 a 41,00); del GM100%: 46,80mm (46,00 a 48,00), y del grupo Fluconazol: 39,00mm (38,00 a 40,75). No se obtuvo halos de inhibición en el grupo control negativo. Se encontró diferencia significativa entre GM25%, GM100% y el grupo Fluconazol ($p < 0,001$), más no entre este último y GM50% ($p > 0,05$). **Conclusión.-** El aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (al 100%) tuvo mayor efecto contra la *Candida albicans* que el Fluconazol; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25%, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50%. **Palabras Clave:** Plantas medicinales; Antifúngicos; *Candida albicans*; Fluconazol

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM THE LEAVES OF *Minthostachys mollis* (MUÑA) COMPARED TO FLUCONAZOLE IN *Candida albicans* CULTURE

ABSTRACT

Objective. - Demonstrate the antifungal effect of essential oil from leaves *Minthostachys mollis* (muña) compared to fluconazole in *Candida albicans* culture. **Materials and Methods.** - Experimental study. The antifungal effect was studied by measuring 80 inhibition zones divided into 5 groups using the Kirby-Bauer method. We used a clinical isolate of *Candida albicans*. The study groups were grouped as follow: "muña" 25% (GM25%), group "muña" 50% (GM50%), group "muña" 100% (GM100%), a positive control group (fluconazole) and a negative control group (mineral oil). Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis and Dunn test using SPSS v.17.0. The level of significance was $< 0,05$. **Results.** - The median of the halos of inhibition of GM25% was 32.00 mm (31.00 to 33.75), GM50%: 40.00 mm (39.25 to 41.00), GM100%: 46.80 mm (46.00 to 48.00) and the fluconazole group: 39.00 mm (38.00 to 40.75). No inhibition zones were obtained in for the control group negative. We found significant difference among GM25%, GM100% and fluconazole group ($p < 0.001$), but not between the last and the GM50% ($p > 0.05$). **Conclusion.** - The essential oil from the leaves of *Minthostachys mollis* (100%) was more effective against *Candida albicans* than fluconazole, in addition, the antifungal effect of fluconazole was greater than *Minthostachys mollis* 25%, and was the same that *Minthostachys mollis* 50%. **Keywords:** Medicinal plants; Antifungal agents; *Candida albicans*; Fluconazole.

INTRODUCCIÓN

La infección mucocutánea por *Candida albicans* se presenta con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos. La Candidiasis orofaríngea sucede en un 28,6% de los pacientes con VIH/SIDA, siendo la infección oral más común en estos pacientes¹. Asimismo, otros estudios muestran que más del 90% de los individuos VIH+, desarrollan Candidiasis Oral en algún momento durante el transcurso de su enfermedad^{1, 2, 3}.

La candidiasis orofaríngea contribuye considerablemente a la morbilidad asociada con la infección por VIH afectando la calidad de vida de estos pacientes y requiere a menudo formas más agresivas de tratamiento⁴. Alternativas de bajo costo se están evaluando como la violeta de genciana⁵, solución oral de *Melaleuca alternifolia*⁶, entre otros. El efecto antimicótico (contra *Candida albicans*) de plantas medicinales, como la *Minthostachys mollis* (muña) ha sido estudiado previamente pero los resultados no son concluyentes⁷.

La *Minthostachys mollis* (muña) que crece entre los 2500 y 3500 msnm en la sierra del Perú, tiene una variedad de propiedades usadas en la medicina tradicional. Es usado como digestivo, antihelmíntico, antidiarreico y en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio y urinario.⁸ Además, se ha demostrado su efecto antibacteriano^{9,10} e insecticida.¹¹

Demostrar el efecto antimicótico de la “muña”, y más aún compararlo con el Fluconazol, podría ser de interés y constituir una nueva alternativa terapéutica, de menor costo y mayor eficacia. Por lo tanto, el objetivo del estudio es demostrar el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación con el Fluconazol en cultivos de *Candida albicans*.

MATERIALES Y METODOS

Este es un estudio experimental. El tamaño de la muestra estuvo constituido por 80 halos de inhibición distribuidos en 5 grupos: grupo experimental “muña” a 100%, 50% y 25%, grupo control positivo (Fluconazol) y un grupo control negativo (aceite mineral). Para la dilución (a 25% y 50%) se usó un aceite mineral autoclavado.

La planta fue recolectada en el distrito de Huacrapuquio (Tarma- Junín). El estudio taxonómico de la *Minthostachys mollis* se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La preparación del aceite esencial de “muña” se realizó en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se obtuvo 16 ml de aceite esencial a partir de hojas frescas de muña (10kg) usando el proceso de destilación por arrastre de vapor de agua¹².

La cepa de *Candida albicans* fue obtenida de una muestra clínica (flujo vaginal) en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza e identificada por morfología, examen microscópico, pruebas fisiológicas (tubo germinativo) e identificación bioquímica enzimática (medio CHROM agar). Se reactivó la cepa en un Caldo Trypticase-Soya (TSB) a temperatura ambiental. Luego de 24 horas, se determinó la turbidez al diluir con suero fisiológico previamente autoclavado, se correlacionó con la escala de McFarland obteniéndose una concentración de $1,5 \times 10^8$ ufc/mL.

Se prepararon las placas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud, se dejó solidificar y se agregó 100 ul del cultivo acondicionado de *Candida Albicans* (1.5×10^8 UCF/mL), lue-

go se expandió (método del hisopado) en las placas Petri (85mm x 12 mm).

En pozos (de 11 mm de diámetro) se colocó 0,1ml de muña al 25%, 50% y 100% (grupo experimental), 100 ug de Fluconazol (grupo control positivo), y aceite mineral autoclavado (grupo control negativo). Se dejó reposar 24 horas a temperatura ambiente y se midió los halos de inhibición de cada grupo (método Kirby-Bauer: de difusión en agar).

Los datos fueron procesados en el programa estadístico SPSS v.17.0. En el análisis univariado, para variables cuantitativas se usó la mediana y el rango intercuartílico. Para el contraste de hipótesis se usó pruebas no paramétricas como la Prueba de Kruskal-Wallis y el Test de Dunn, considerando una distribución asimétrica por el tamaño pequeño de la muestra (teorema del límite central), y por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se consideró un nivel de significancia $< 0,05$.

Todos los procesos realizados en el laboratorio estuvieron acordes con el “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS)¹³.

RESULTADOS

Al visualizar los halos de inhibición en las placas Petri, el grupo “muña” 100% mostró un halo mayor con respecto a los otros grupos (Figura 1).

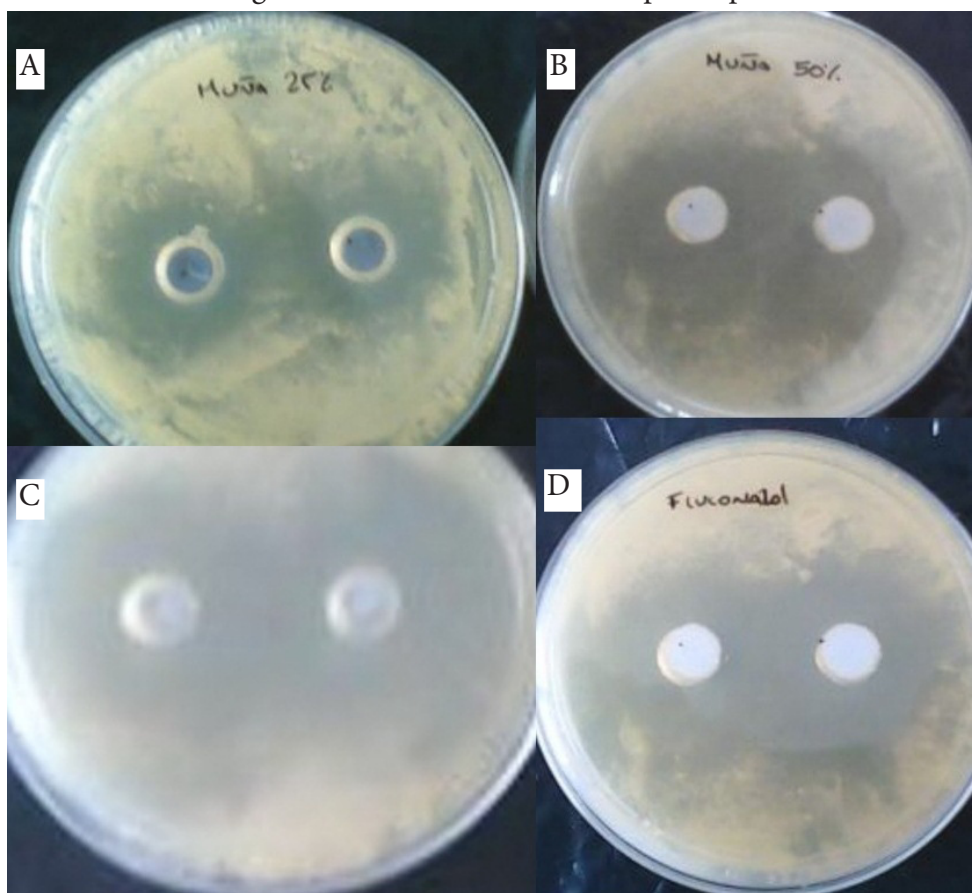
Se obtuvo las medianas de los halos de inhibición de cada grupo experimental (Muña 25%, Muña 50% y Muña 100%) y del control positivo (Fluconazol). No se obtuvo halos de inhibición para el grupo control negativo. La mediana del halo de inhibición del grupo muña 100% fue mayor que el de los otros (Tabla 1).

Existió diferencia significativa entre la mediana del grupo muña 100% y del grupo muña 25% con respecto al grupo Fluconazol ($p < 0,001$), más no entre este último y el grupo muña 50% ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Existe mayor frecuencia de colonización de la cavidad oral en pacientes VIH+ que los sujetos sanos, la proporción varía de 60%^{14,15} al 88% cuando más de una muestra es estudiada¹⁶, la mayoría de estos pacientes evolucionan

Figura 1. Halos de inhibición en placas petri.



(a) Placa petri del grupo muña al 25%, (b) grupo muña al 50%, (c) grupo muña al 100%, (d) grupo fluconazol

Tabla 1. Medianas de los halos de inhibición

Grupos de estudio	N	Mediana(mm)	Rango intercuartílico(mm)
Muña 25%	16	32,00	31,00 a 33,75
Muña 50%	16	40,00	39,25 a 41,00
Muña 100%	16	46,80	46,00 a 48,00
Fluconazol	16	39,00	38,00 a 40,75

N=número de halos de inhibición

a candidiasis orofaríngea¹⁷. La frecuencia de esta ha disminuido por la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA)¹⁸, pero aún las manifestaciones orales son comunes¹⁷. En Perú la candidiasis orofaríngea por *Candida albicans* se presenta en el 42% y el 79% de los pacientes VIH/SIDA con síntomas de odinofagia¹⁹.

A pesar del uso masivo del Fluconazol en candidiasis orofaríngea en pacientes HIV/SIDA²⁰, los efectos secundarios son escasos, pero se han descrito varias interacciones medicamentosas²¹. Se ha demostrado la eficacia del Fluconazol en pacientes adultos, más no en niños,

por otro lado, no existe suficiente evidencia para demostrar su eficacia en la profilaxis en ambos grupos etarios⁴. Existe una falta general de datos sobre la resistencia tras el uso de antifúngicos^{22,23}, pero la profilaxis y el tratamiento prolongado condicionan su aparición²⁴. Lo mencionado y el alto costo del fármaco alienta la búsqueda de nuevas drogas, sobre todo en países en desarrollo.

El Perú tiene una gran diversidad biológica por el número de especies, recursos genéticos y variedad de ecosistemas²⁵. Es necesario el estudio de las propiedades medicinales de las plantas para demostrar su potencial

efecto benéfico. Previamente, el posible efecto antimicótico (contra *Candida albicans*) de la “muña” fue estudiado por triplicado, siendo los resultados preliminares. Además se identificó a los monoterpenos (pulegona, mentona, limoneno y mirceno) como posibles responsables de la actividad biológica descrita⁷. En nuestro estudio se demostró el efecto antimicótico con un mayor número de ensayos y se ha comparado con el Fluconazol.

Los resultados son alentadores; sin embargo, es necesario evaluar el efecto antifúngico de la “muña” con un modelo en ratas para candidiasis oral asociado a VIH (vía tópica / vía sistémica). Además, se necesitan estudios controlados y aleatorizados para evaluar la eficacia y seguridad en pacientes VIH + con candidiasis oral. En el presente estudio no se usó una cepa de *Candida albicans* codificada por alguna institución. La muestra clínica (flujo vaginal) fue tomada antes de recibir tratamiento. Las pruebas de sensibilidad frente a fluconazol y la identificación se realizó en el laboratorio del hospital, la evolución de la paciente fue positiva.

Finalmente, podemos concluir que el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (al 100%) tuvo mayor efecto antimicótico (contra *Candida albicans*) que el Fluconazol; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25%, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50%.

Correspondencia:

Alcalá-Marcos Katherine M
kalma212@gmail.com

Recibido: 06-07-2012

Aprobado: 16-08-2012

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pinheiro A, Marcenes W, Zakrzewska JM. Dental and oral lesions in HIV infected patients: a study in Brazil. *Int Dent J* 2004;54(3):131-7.
- Moris DV, Melhem MSC, Martins MA, Mendes RP. Oral *Candida* spp colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2008; 14(2):224-257.
- Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. *Oral Dis* 2008; 14, 138-43.
- Pienaar ED, Young T, Holmes H. Interventions for the prevention and management of oropharyngeal candidiasis associated with HIV infection in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (11):CD003940.
- Wright SC, Maree JE, Sibanyoni M. Treatment of oral thrush in HIV/AIDS patients with lemon juice and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and gentian violet. *Phytomedicine* 2009; 16:118-24.
- Vazquez JA, Zawawi AA. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. *HIV Clinical Trials* 2002; 3(5):379-85.
- Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008; 25(3):298-301.
- Hammond GB, Fernández ID, Villegas LF, Vaisberg AJ. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *J Ethnopharmacol*. 1998; 61(1): 17-30.
- 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: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.
- Guiza Pérez GP, Rincón Prieto LM. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* [Tesis de bachiller]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
- 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; 53(17): 6903-6.
- United States Pharmacopeia Convention. USP 30. NF 25. The United States Pharmacopeial. The National Formulary. Rockville: 2007.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Wayne, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008.
- Costa CR, Cohen AJ, Fernandes OFL et al. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48: 257-261.
- Campisi G, Pizzo G, Milici ME et al. *Candida* carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 281-286.
- Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 341-350
- Tami-Maury I, Willig J, Vermund S, Jolly P, Aban I, Hill J, Wilson CM. Contemporary profile of oral manifestations of HIV/AIDS and associated risk factors in a Southeastern US clinic. *J Public Health Dent*. 2011;71(4):257-64.
- Delgado AC, de Jesus Pedro R, Aoki FH, Resende MR, Trabasso P, Colombo AL, de Oliveira MS, Mikami Y, Moretti ML. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(4):364-71.
- Guía nacional de atención integral de la persona viviendo con el VIH/SIDA (PVVIH/S). Ministerio de Salud. Segunda Edición. Abril 2006.
- Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. 2009. Antifúngicos para uso sistémico. *Enferm Infecc y Microbiología Clín* 27 (6): 353-362
- Bruggemann RJ, Alffenaar JW, Blijlevens NM, Billaud EM, Kosterink JG, Verweij PE. Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1441-1458.
- Patton LL, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 2001;92:170-9.
- Loannidis J, Wilinson D. HIV: prevention of opportunistic infections. *Clinical Evidence*. 2005; 14:832-51.
- Epstein JB, Polsky B. Oropharyngeal candidiasis: A review of its clinical spectrum and current therapies. *Clinical Therapeutics* 1998; 20:40-57.
- Pamo-Reyna OG. Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2009; 26(3): 314-23.