

TORRES, C.U.
Estudio de la Activi

2004

60657



60657

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE DIFERENTES
FRACCIONES DE *Minthostachys verticillata* FRENTE A
HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

**Tesis para optar al título de *Magíster en Biotecnología*
*Mic. Cristina Vanesa Torres***

2004

T. 377

00021

***A Cristina, mi madre.
A Mauricio, mi esposo.
A toda mi familia Torres-Bartolomeoli.***

60657

MFN:
Clasif:
7.377

AGRADECIMIENTOS

A Dios que guía mis pasos, y que me permitió llegar a este momento.

A la U.N.R.C. que posibilitó mi formación académica.

A la Dra. Ana Dalceró, porque con tu generosidad, especialmente en el conocimiento me guiaste, (además de sentarte conmigo al microscopio)
GRACIAS!!!!

A la Dra. Mirta Demo: porque gracias a tu colaboración pude concretar este trabajo.

A la Dra. Liliana Sabini, porque me acompañaste en esta formación posibilitándome que realizara y concluyera esta tesis.

Al Ing. Jorge Daghero, porque con su importante aporte se concretaron las experiencias químicas.

Al Dr. Sergio Godino por su predisposición y consejos, GRACIAS!!!!

A mi familia, mamá, César, Débora y mis soles: Lucía y Clara quienes alegran mi vida.

A Débora mi hermana y amiga que siempre estuvo a mi lado.

A Mauricio por acompañarme en todo el tiempo dedicado a este trabajo, gracias por tu paciencia.

A mis compañeros de laboratorio: Silvia: gracias por tus consejos y el compañerismo que me hiciste sentir, Sonia: gracias por ser tan buena compañera y apoyarme en los momentos difíciles, Verónica, Mariana, Mario, Paula y Franco, gracias por su buena onda.

A Rebeca, mi gran compañera de ensayos, que con angustias, y alegrías compartidas logramos los objetivos, gracias a tu colaboración!!.

A mis amigos que siempre están a mi lado: Elina, Marisa, Sonia, Cristina, Andrea, Pachi y Claudia.

A Rosana, Sergio, Norma y Gabriela que con su buena onda me acompañaron y aguantaron este último mes.

A mis compañeras de Maestría por los momentos agradables compartidos.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Para optar al título de Magíster en Biotecnología.

Directora: Dra. Ana M. Dalcero

Co-Directora: Dra. Mirta Demo

Jurados:

Dr. Blas Micalizzi

Dra. Stella Chiacchiera

Dra. Marisa Rovera

RESUMEN

Ante la necesidad de disponer de nuevos compuestos antifúngicos con baja toxicidad y conociendo que la cuarta parte de los fármacos actuales proviene de las plantas medicinales resulta un tópico interesante la búsqueda de compuestos bioactivos en las plantas medicinales. En las sierras de Córdoba se encuentra *Minthostachys verticillata*, que se caracteriza por ser la más abundante y por su uso popular como antiespasmódico además de la acción antiviral y antibacteriana "in vitro". En el presente trabajo se propuso como objetivo evaluar la actividad antifúngica de diferentes fracciones de *Minthostachys verticillata* frente a hongos causales de micosis superficiales y oportunistas. Se estudió la actividad de decocciones, extracto etanólico crudo, aceite esencial, y componentes mayoritarios del AE, determinándose el porcentaje de inhibición, concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración fungicida mínima (CFM). De los pacientes que concurren al Hospital Regional de Río Cuarto con micosis superficiales se aislaron: *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*. La decocción de *M. verticillata*, a una concentración de 1,04 mg/ml inhibió el crecimiento de *T. rubrum*, *M. gypseum*, *M. nanum*, y a una concentración de 2,14 mg/ml a *T. terrestre*, *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp., con un índice terapéutico (IT) para estas levaduras de 104 y 212, respectivamente. El extracto etanólico crudo inhibió el crecimiento fúngico de *T. rubrum*, *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp con una CIM de 0,74 mg/ml y un IT de 1,19. El aceite esencial afectó el crecimiento de, *M. canis*, *M. nanum*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. terrestre*, *A. fumigatus*, con una CIM de 1,79 mg/ml, y el valor de la CIM para *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp. fue de 0,22 mg/ml, con un IT de 3 para estas levaduras. Mentona fue el componente mayoritario del AE que produjo mayor inhibición del crecimiento fúngico de *M. canis* y *T. rubrum*. Las diversas fracciones vegetales y los componentes mayoritarios del AE de *M. verticillata*, demostraron tener actividad antifúngica frente a patógenos causales de micosis superficiales y oportunistas y de poseer baja toxicidad en células de mamíferos. Los resultados obtenidos sugieren que *M. verticillata* y/o sus derivados pueden ser propuestos como fitofármaco de uso potencial.



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1-Micosis: generalidades:	1
1.2- Antifúngicos.....	5
1.3- Plantas medicinales	7
1.4- Productos antimicrobianos de plantas medicinales.....	9
1.4.1- Fenoles y polifenoles.....	10
1.4.2- Quinonas.....	10
1.4.3- Flavonas, flavonoides y flavonoles	11
1.4.4- Taninos	11
1.4.5- Cumarinas.....	12
1.4.6- Terpenoides y aceites esenciales.....	12
1.4.7- Alcaloides.....	13
1.4.8- Lectinas y polipéptidos	13
1.4.9- Mezclas	14
1.4.10- Otros compuestos	14
1.5- Métodos de extracción de los compuestos bioactivos.....	14
1.6- Plantas medicinales del sur de Córdoba.....	17
1.6.1- Generalidades.....	17
1.6.2- <i>Minthostachys verticillata</i>	17
1.6.3- Antecedentes antimicrobianos de <i>Minthostachys verticillata</i>	18
1.7- Planteamiento del problema	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo general	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIALES	23
3.1- Drogas	23
3.2- Soluciones.....	23



3.2.1- Solución balanceada de fosfatos	23
3.2.2- Solución de Cloruro de sodio (ClNa) al 0.85%	23
3.2.3- Solución colorante tinta china azul Parker	23
3.2.4- Solución extracto de levadura al 10%	24
3.2.5- Solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 15 o 20%	24
3.3- Medios	24
3.3.1- Agar Sabouraud Glucosado (ASG)	24
3.3.2- Agar urea	25
3.3.3- Caldo Sabouraud Glucosado (CSG)	25
3.3.4- Medio Lactrimel	25
3.3.5- Medio Littman	26
3.4- Material biológico	26
3.4.1- Especies fúngicas	26
3.4.2- Material vegetal	27
4. MÉTODOS	28
4.1. Toma de muestra	28
4.2- Aislamiento e identificación	28
4.2.1- Examen directo	28
4.2.2- Aislamiento del agente etiológico por cultivo	28
4.2.3- Técnicas de identificación de especies fúngicas	29
4.2.3.i- Identificación de especies del género <i>Trichophyton</i> mediante la prueba del pelo, (técnica de Ajello)	29
4.2.3.ii- Identificación de especies del género <i>Trichophyton</i> mediante la prueba de la ureasa	29
4.2.3.iii- Identificación de especies del género <i>Microsporum</i> mediante visualización macro y microscópica	30
4.3- Recolección y procesamiento del material vegetal	30
4.4- Obtención de las diferentes fracciones del material vegetal	31
4.4.1- Obtención de decocciones	31
4.4.2- Producción de extracto etanólico crudo	31
4.4.3- Extracción del aceite esencial, por hidrodestilación	32



4.5- Identificación y cuantificación de los componentes del aceite esencial, por cromatografía gaseosa	32
4.6- Ensayos de actividad antifúngica de las distintas fracciones vegetales.....	33
4.6.1- Determinación de la actividad de decocción frente a hongos filamentosos de importancia clínica.....	33
4.6.2- Determinación de la actividad antifúngica de extracto etanólico, aceite esencial y componentes mayoritarios del aceite esencial frente a hongos filamentosos, método de la microdilución	35
4.6.2.i- Preparación del inóculo fúngico	35
4.6.2.ii- Análisis de la actividad antifúngica: Técnica de screening	35
4.6.2.iii- Análisis de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM)	35
4.6.3- Análisis de la actividad antifúngica de diferentes fracciones vegetales frente a hongos levaduriformes	36
4.7- Registro de imágenes.....	37
5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1- Análisis de la frecuencia de dermatofitos en el sur de la provincia de Córdoba	38
5.2.- Análisis de la cromatografía gaseosa del aceite esencial de <i>Minthostachys verticillata</i>	44
5.3- Determinación de la actividad de las decocciones de <i>Minthostachys verticillata</i> frente a hongos filamentosos de importancia clínica	47
5.4- Determinación de la actividad del extracto etanólico crudo y aceite esencial frente hongos filamentosos de importancia clínica.....	58
5.5- Determinación de CIM del extracto etanólico crudo de <i>Minthostachys verticillata</i> frente a hongos filamentosos de importancia clínica.....	60
5.6- Determinación de CIM del aceite esencial de <i>Minthostachys verticillata</i> frente a hongos filamentosos de importancia clínica	65



5.7- Determinación de CIM de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Minthostachys verticillata</i> frente <i>M. canis</i> c.a. y <i>T. rubrum</i> c.a.	70
5.8- Determinación de la actividad de la decocción (2,14mg/ml) de <i>Minthostachys verticillata</i> frente levaduras de importancia clínica.....	75
5.9- Determinación de la actividad del extracto etanólico crudo de <i>Minthostachys verticillata</i> frente levaduras de importancia clínica.....	77
5.10- Determinación de la actividad del aceite esencial de <i>Minthostachys verticillata</i> frente levaduras de importancia clínica.....	79
5.11- Discusión general	82
6- CONCLUSIONES	88
7.- BIBLIOGRAFÍA	91



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación clínica de las micosis según López Martínez 1995.....	2
Tabla 2: Distribución de los dermatofitos, según Negroni and Negroni 1988	4
Tabla 3: Componentes activos extraídos de plantas medicinales por diferentes solventes.....	15
Tabla 4: Resultados del examen directo en función del sexo	38
Tabla 5: Resultados obtenidos del examen directo, cultivo e identificación de dermatofitos en función del grupo etario	41
Tabla 6: Datos cromatográficos: tiempos de retención, área porcentual de los componentes mayoritarios del AE de <i>Minthostachys verticillata</i>	46
Tabla 7: Inhibición del crecimiento radial de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> aislado de casos clínicos frente a decocciones de <i>Minthostachys verticillata</i>	49
Tabla 8: Inhibición del crecimiento radial de hongos filamentosos frente a decocciones de <i>Minthostachys verticillata</i>	52
Tabla 9: Inhibición del crecimiento radial de hongos filamentosos frente a decocción (1,07 mg/ml) de <i>Minthostachys verticillata</i>	55
Tabla 10: Comparación de la inhibición del desarrollo fúngico de las tres fracciones de decocción de <i>Minthostachys verticillata</i> sobre dermatofitos.....	56
Tabla 11: Valores porcentuales de la inhibición del desarrollo fúngico de hongos filamentosos frente a EEC y AE de <i>Minthostachys verticillata</i>	59
Tabla 12: Valores porcentuales de inhibición del desarrollo de hongos filamentosos frente al EEC, técnica de microdilución.....	64
Tabla 13: Valores en porcentaje de inhibición del desarrollo de hongos filamentosos por AE	68
Tabla 14: Porcentaje de inhibición del desarrollo de <i>Trichophyton rubrum</i> c.a. producido por mentona, pulegona y limoneno.....	72



Tabla 15: Valores en porcentaje de inhibición del desarrollo de <i>Microsporum canis</i> c.a. producido por mentona, pulegona y limoneno	73
Tabla 16: Comparación de actividad del AE y los componentes mayoritarios a similar concentración, frente a especies fúngicas aisladas en la región.....	73
Tabla 17: Inhibición del crecimiento de levaduras frente a la decocción de <i>Minthostachys verticillata</i>	80
Tabla 18: Inhibición del crecimiento de levaduras frente al EEC de <i>Minthostachys verticillata</i>	81
Tabla 19: Inhibición del crecimiento de levaduras frente al AE de <i>Minthostachys verticillata</i>	81



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras químicas de compuestos antimicrobianos de plantas.....	19
Figura 2: Muestras clínicas positivas al examen directo en función del tiempo.....	43
Figura 3: Perfil de la cromatografía gaseosa del aceite esencial de <i>Minthostachys verticillata</i>	46
Figura 4: Actividad de la decocción de <i>Minthostachys verticillata</i> frente a <i>T. rubrum</i> c.r.....	57
Figura 5: Actividad del extracto etanólico crudo de <i>Minthostachys verticillata</i> frente a <i>T. rubrum</i> c.a.	63
Figura 6: Actividad del aceite esencial de <i>Minthostachys verticillata</i> frente a <i>M. gypseum</i>	69
Figura 7: Actividad de pulegona frente a <i>T. rubrum</i> c.a.	74

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1. 1- Micosis: generalidades:

El término micosis se refiere a enfermedades producidas por hongos, donde la mayoría de las cepas que afectan al hombre también han sido aisladas de casos clínicos en los animales. Las micosis se clasifican de acuerdo al tejido afectado en: superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas (tabla 1). Esta clasificación responde a un criterio topográfico; sin embargo las micosis oportunistas pueden localizarse e invadir cualquier tejido corporal.

Las micosis subcutáneas afectan a la piel como puerta de entrada, extendiéndose al tejido dérmico y con capacidad para invadir otros tejidos profundos.

Las micosis sistémicas se localizan principalmente a nivel pulmonar (primo infección) y posteriormente tienden a diseminarse por vía hematógena a diferentes sistemas de órganos, constituyendo las micosis de pronóstico grave. Las superficiales o dermatofitias son un grupo de afecciones que atacan la capa cornea de la piel, y sus anexos o faneras como: pelos y uñas. Pueden ser epidémicas, y están extendidas en todo el mundo. Si bien las dermatomicosis no son de pronóstico grave, son las que con mayor frecuencia afectan a la población humana. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente un 20% de la población mundial es afectada por micosis superficiales cada año, (Negroni and Negroni., 1988; Basualdo y col., 1996; López Martínez y col., 1995). Las micosis superficiales son producidas por dermatofitos, hongos adaptados fisiológicamente a crecer en queratina. Los agentes causales son especies pertenecientes a los géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, (tabla 2).

La mayor parte de la información sobre la incidencia de las dermatofitias proviene de los EEUU, la que demuestra que en esta población millones de adultos y niños sufren de uno a más tipos de infecciones por dermatofitos y se estima que en dicho país tiene un gasto público en medicamentos para las infecciones de tiñas de alrededor de 150 millones de dólares anuales.



Taxonómicamente los hongos que causan micosis superficiales pertenecen a los Ascomycetes en su fase teleomórfica (sexuada) ubicándose en la familia Arthrodermataceae. Las especies anamórficas (asexuada) de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum* tienen su fase perfecta dentro del género *Arthroderma*. No se conoce aun la fase sexuada de las especies del género *Epidermophyton*, (Negroni and Negroni., 1988; Basualdo y col., 1996).

Tabla 1: Clasificación clínica de las micosis.

Micosis	Enfermedad
Micosis superficiales	Pitiriasis versicolor Tiña negra Dermatofitosis Piedras Dermatomicosis
Micosis subcutáneas	Esporotricosis, Feohifomicosis Cromomicosis, Rinosporidiosis Eumicetomas, Conidiobolomicosis Lobomicosis Basidiobolomicosis
Micosis sistémicas	Histoplasmosis, Coccidioidomicosis Paracoccidioidomicosis Blastomicosis
Micosis oportunistas	Candidosis, Geotricosis Criptococcosis, Fusariosis Mucormicosis, Scedosporiosis Escopulariopsis, Peniciliosis Aspergilosis, Rodotorulosis
Seudomicosis	Eritrasma, Queratolisis plantar Tricomycosis, Dermatofilosis Prototecosis, Actinomicosis, Nocardiosis Actinomycetoma

López Martínez 1995



Los dermatofitos según su afinidad por el parasitismo humano o animal y su hábitat se dividen en:

Zoófilos: propios de animales grandes o pequeños y frecuentemente afectan al hombre, como las tricofitias y microsporias.

Geófilos: cuando el hombre y los animales se infectan desde la tierra.
Ej.: *Microsporum gypseum*.

Antropófilos: en los que el ciclo vital se mantiene por contagio humano o por mantenerse vivo en el material corneo depositado en pisos o alfombras y otros sustratos húmedos. Es el caso de las epidermofitias, pitiriasis versicolor, eritrasma y tricomiasis axilar.

Los factores que determinan la frecuencia de las infecciones fúngicas son: el sexo, la edad, profesión, deporte, condiciones higiénicas y sociales, los hábitos de vestir y la raza. Para que estas infecciones se produzcan debe ocurrir un contacto del agente causal con el tejido para que la enfermedad sea sintomática, las tensiones por la temperatura y la humedad se mencionan como factores necesarios para la exacerbación de la enfermedad subclínica previa. Además del contacto directo con los agentes infecciosos y las condiciones antes mencionadas, es necesaria la susceptibilidad del paciente para que se establezca la infección, (Emmons et al., 1964; Negroni and Negroni, 1988; Basualdo y col., 1996).

Con relación a la incidencia y aislamiento los dermatofitos varían según las áreas geográficas, algunos tienen distribución universal y otros están en zonas más restringidas. En nuestro país, según estudios realizados en las provincias de Chaco, Santa Fe, Buenos Aires, Chubut, Entre Ríos, Formosa, La Pampa, Mendoza, San Luis, Neuquen, Tucumán y Salta, las especies más frecuentes son: *Microsporum canis* causantes de más del 90% de tiñas en el cuero cabelludo en los niños, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes* en lesiones interdigitales y de uñas, seguidas en menor proporción por *M. gypseum*, *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, y *T. verrucosum*, (Davel y col., 1999). Son escasos los datos obtenidos en la provincia de Córdoba sobre la incidencia de estos hongos.



Tabla 2: Distribución de los dermatofitos.

Género	Hábitat y parasitismo			Distribución geográfica
	H	A	S	
<i>Epidermophyton:</i>				
<i>E. floccosum</i>	+			Cosmopolita
<i>Microsporum:</i>				
	+			Cosmopolita, raro en Sud América
<i>M. audouinii</i>				
<i>M. canis</i>	+	+		Cosmopolita
<i>M. gypseum</i>	+	+	+	Cosmopolita
<i>M. fulvum</i>	+	+	+	Cosmopolita
<i>M. nanum</i>	+	+		Cosmopolita
<i>M. cookei</i>			+	Cosmopolita
<i>M. distortum</i>	+	+		Australia, Nueva Zelandia y E.E.U.U.
<i>M. ferrugineum</i>	+			Asia y África
<i>M. racemosum</i>	+	+		Cosmopolita
<i>M. vanbreuseghemii</i>				E.E.U.U-
<i>Trichophyton:</i>				
<i>T. schoenleini</i>	+E			Eurasia y N. de Africa
<i>T. tonsurans</i>	+En			Cosmopolita
<i>T. violaceum</i>	+En			Cosmopolita
<i>T. rubrum</i>	+var.			Cosmopolita
<i>T. gourvilli</i>	+En			África
<i>T. soudanense</i>	+En			África
<i>T. yaoundei</i>	+En			África
<i>T. concentricum</i>	+			Asia, Islas Pac. Sud América
<i>T. mentagrophytes</i>				
var. yesosa	+Emi	+		Cosmopolita
var. vellosa	+			Cosmopolita
<i>T. gallinae</i>	+	+Ec?		Cosmopolita
<i>T. verrucosum</i>	+Eme	+		Cosmopolita
<i>T. quinckeanum</i>	+	+		Cosmopolita
<i>T. equinum</i>		+Eme		Cosmopolita
<i>T. georgii</i>	+Ec		+	
<i>T. megninii</i>	+Ec		+	Europa, Africa
<i>T. simii</i>	+	+EcE		India
<i>T. terrestre</i>			+	Cosmopolita
<i>T. ajelloi</i>	+	+	+	Cosmopolita

Negróni and Negróni 1988

H: humano, A: animales, S: suelo, E: endotrix moderado, En: endotrix intenso, var: variable, Emi: ectotrix microides, Eme: ectotrix megasporado, Ec: ectotrix y EcE: endoectotrix.

En las últimas décadas, se ha observado un incremento importante en la frecuencia de las micosis, debido al aumento de causas predisponentes como la inmunosupresión, los trasplantes, enfermos de SIDA y pacientes con tratamientos prolongados de antibióticos, corticoides y quimioterapia antineoplásica, entre otros. Esto conlleva a la aparición de numerosos casos de micosis oportunistas, infecciones determinadas por hongos saprofitos de bajo



poder patógeno en condiciones normales. Como es el caso de las candidiasis clínicas del adulto y las infecciones causadas por *Cryptococcus neoformans* y especies de *Aspergillus*, entre las más frecuentes, (Negroni and Negroni, 1988; Basualdo y col., 1996; Baster et al., 2001). Estas condiciones de los pacientes inmunocomprometidos constituyen un gran desafío en la búsqueda de nuevos agentes o sustancias antifúngicas.

Así también la selección de cepas resistentes a los antifúngicos convencionales, debido a las terapias prolongadas o inadecuadas. En los últimos años, han surgido cepas patógenas resistentes, como es el ejemplo de la levadura de *Candida albicans* a fluconazol en pacientes HIV positivo, siendo este el antifúngico más usado en estos casos. Algunas veces esta resistencia a fluconazol provoca también resistencia cruzada a otros azoles, (Sanglard D., 2002; Sanglard and Odds, 2002).

La anfotericina B, es un antimicótico efectivo con un alto valor del índice beneficio/riesgo por su baja toxicidad renal, aunque este compuesto no es bien tolerado en la mayoría de los pacientes, especialmente aquellos tratados con altas dosis. Mientras la resistencia a antifúngicos no es relevante en anfotericina B, si lo es para *Candida albicans* a fluconazol constituyendo un grave problema en las candidiasis orogastrointestinales en pacientes infectados de HIV, (Bergoglio M., 1993; Baster et al., 2001).

1.2- Antifúngicos

Las micosis superficiales son difíciles de erradicar. Los antifúngicos utilizados en su tratamiento, como son los de aplicación tópica no tienen efectividad, por lo que para la erradicación de estas micosis se deben suministrar por vía oral y en forma prolongada, (Baster et al., 2001).

El tratamiento de las infecciones fúngicas está limitado por el hecho de que la célula micótica es eucariota, al igual que el huésped, y contiene quitina en su pared celular. Los agentes antifúngicos deben interferir la proliferación celular del hongo sin afectar el metabolismo normal de las células del huésped, procurando una intensa actividad pero sin elevar su toxicidad, (García Martos y col., 1997). Existen efectos secundarios que resultan del uso prolongado de



antifúngicos orales como la toxicidad hepática y renal, disminución de la actividad suprarrenal, teratogenicidad, sensibilidad cutánea y alergias entre otras. Estas afecciones son producidas en mayor o menor intensidad por antifúngicos convencionales como, la griseofulvina, ketoconazol, miconazol y anfotericina B o por sensibilidad del paciente a estos compuestos.

Sumado a los efectos anteriores, la sensibilidad que presentan algunos pacientes a ciertas drogas, hace que se reduzca más aun el número de drogas antifúngicas disponibles. Las micosis son altamente contagiosas y en ciertas ocasiones todos los integrantes de una familia deben tratarse simultáneamente para una erradicación efectiva, esto conlleva a un incremento en el costo del tratamiento. Otro aspecto a considerar es el surgimiento de algunos dermatofitos resistentes a los antifúngicos administrados.

Ante esta realidad, se vuelve necesario la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos efectivos y de baja toxicidad ya que en la actualidad existen muy pocos con estas características. Estos podrían resultar de modificaciones de la estructura de antifúngicos convencionales tales como la de los azoles, o bien compuestos completamente nuevos en su estructura. Esta búsqueda se facilita con el conocimiento molecular del blanco de acción o bien a través de compuestos extraídos de agentes naturales. Actualmente existen muchas investigaciones orientadas a encontrar nuevos antifúngicos ya sean de origen sintéticos o extraídos de productos naturales, (Baster et al., 2001).

Son muchas las plantas de todo el mundo que inhiben el desarrollo de variadas cepas fúngicas. A modo de ejemplo podemos citar el extracto etanólico de hojas de *Cestrum auriculatum* el cual inhibe el desarrollo de *Microsporum gypseum* y *Sporothrix schenckii*; el extracto de *Iryanthera lancifolia* y *Ophryosporus peruvian*, plantas medicinales de Perú, que inhiben a *Trichophyton mentagrophytes*. Los extractos etanólicos de *Zuccagnia punctata* y *Larrea cuneifolia*, plantas del noreste Argentino, demostraron actividad inhibitoria frente a hongos filamentosos como *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger* y especies del género levaduriforme *Rhodotorula*. Otras plantas de la provincia de San Juan fueron activas frente a *Candida albicans*, *Criptococcus*



neoformans, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, y *Trichophyton rubrum*, (Rojas et al., 2003; Quiroga et al.; 2001; Feresin et al., 2001).

1.3- Plantas medicinales

En distintas culturas y desde tiempos remotos, las plantas han sido utilizadas con fines terapéuticos. Las personas que tenían estos conocimientos estaban ligadas a lo trascendental, lo espiritual y la magia, como lo eran los chamanes, hechiceros y los curanderos; la colecta y los usos de cada planta formaban parte del ritual. Registros de ésto son el uso de amapola por los sumerios, las más de 700 fórmulas medicinales que curaban distintas enfermedades y que quedaron registradas en los papiros y las paredes de los templos egipcios, (Cambría J.A., 1993).

Hipócrates, 5 siglos antes de Cristo, mencionó de 300 a 400 plantas medicinales. En el primer siglo después de Cristo, Discorides escribió un catálogo de plantas medicinales "*De materia Médica*", un prototipo de las farmacopeas modernas. La Biblia hace descripciones de 30 plantas curativas. Realmente la mirra y el incienso poseen propiedades medicinales como antiséptico y que fueron empleados como enjuague bucal.

La caída de las civilizaciones antiguas impidió los avances en el conocimiento de las plantas medicinales, debido a que la mayoría de la documentación de éstas fue destruida o perdida.

En la cultura asiática se realizó una compilación de las viejas farmacopeas. En el occidente se observó también el interés por la medicina antigua. En Norteamérica el uso de las plantas medicinales tuvo su origen a partir de las culturas indígenas y las alternativas de la medicina europea y americana.

La disciplina científica que estudia esto es la etnobotánica o etnofarmacología, cuyo fin es la formación del conocimiento compilado de los indígenas acerca del uso de las plantas en el mantenimiento de la salud humana y animal, (Cowan M., 1999). Gracias al avance de la ciencia moderna, en especial la biotecnología y la bioquímica molecular, se puede conocer más acerca de los principios activos de las plantas medicinales, su actividad en el



organismo y así lograr validar los usos de las diversas especies vegetales, (Alonso J., 2002).

El uso de las plantas medicinales autóctonas, se considera como medicina tradicional o folklórica, (Ratera and Ratera, 1980; Hammer et al., 1999). Actualmente la tendencia en todo el mundo, es promover el uso de la medicina tradicional. Según informe de la OMS en China, ésta representa cerca del 40% de toda la atención primaria de la salud, en la India el 65% de la población rural la utiliza para atender las necesidades primarias de la salud. En Chile la ha utilizado el 70% de la población. En los países desarrollados se están popularizando los medicamentos tradicionales, complementarios y alternativos. En Canadá el 70% de la población utilizó al menos una vez dichos medicamentos, 48% en Estados Unidos y 49% en Francia, (OMS, 2002).

De total de los fármacos empleados en la actualidad, la cuarta parte tienen origen vegetal o son derivados de éstos, (Lozoya X., 1997; Cowan M., 1999). Existen aproximadamente unas 90 especies vegetales que se emplean actualmente como fuentes de drogas medicinales, como: la aspirina con acción analgésica, extraída de *Filipéndula ulmaria* de la familia Rosaceae; reserpina una droga tranquilizante y antiesquisofrénica derivada del arbusto *Rauwolfia serpentina* de la familia Apocynaceae; Benzoina, un desinfectante oral que se extrae de *Styrax tonkinensis* de la familia Styracaceae; tubocurarina con acción relajante muscular extraída de *Chondrodendron tomentosum* de la familia Menispermaceae, vinblastina de la especie *Catharanthus roseus* de la familia Apocynaceae de uso en la enfermedad de Hodgkin, vincristina de la especie *Catharanthus roseus* de la familia Apocynaceae de uso en enfermos de leucemia, entre otros.

La medicina tradicional fue reconocida por la OMS en los años sesenta, provocando un gran impulso a la investigación hacia la búsqueda y estudios de la estructura molecular y función de los metabolitos de las plantas medicinales. La OMS en 1978, alentó a los gobiernos a incorporar los aspectos favorables de la medicina tradicional a la salud primaria.

El caso de *Catharanthus roseus* o pervinca que contiene vincristina y la vinblastina, drogas que salvaron a muchos enfermos de leucemia infantil y del



mal de Hodgkin, estimularon también el estudio de las plantas medicinales. Además de los efectos curativos cabe agregar los beneficios económicos que proveen las drogas de origen vegetal que van de 34 a 1000 millones de dólares por año en los EEUU, (Cantero y Núñez, 2000).

En la selección de las plantas con propiedades curativas se observa el comportamiento de los animales, como los primates, en cuanto a la selección de los vegetales cuando éstos se sienten enfermos, (Lozoya X., 1997; Cantero y Núñez, 2000). Otra fuente lo constituyen los conocimientos botánicos y farmacéuticos de los pueblos indígenas, desde donde surgió el uso de las siete mil especies vegetales mas utilizadas en el mundo. Estos conocimientos perduraron de generación en generación por la transmisión oral o revelación de sus ancestros, (Bentancour Posadas A., 2002).

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que poseen metabolitos que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo. Entre ellos se encuentran los principios activos que le confieren a las plantas medicinales el uso terapéutico. Todas las partes de los vegetales pueden contener estos principios activos: las raíces, tallos, hojas, frutos y semillas; siendo las hojas uno de los órganos más interesantes, ya que en ellos se realiza la mayor parte de los procesos metabólicos. Estas plantas se utilizan tradicionalmente como infusiones, decocciones o cocimientos, extractos fluidos, jarabes, extracto secos, cápsulas, comprimidos, etc.

1.4- Productos antimicrobianos de origen vegetal

El interés en las plantas medicinales tiene su fundamento en que ellas proveen un arsenal de drogas antimicrobianas. Los usos del numerosos compuestos procedentes de las plantas son: como suplementos herbarios, conservantes naturales de alimentos, en perfumería, como terapia natural y medicina alternativa, (Cantero y Núñez, 2000; Cowan M., 1999; Demo, y col. 2001).

En los últimos 20 años, aumentó considerablemente las especies vegetales en vías de extinción, el conocimiento de los compuestos activos sería



útil para lograr así la síntesis química de los mismos, evitando que otras especies se extingan.

Las plantas tienen la capacidad casi ilimitada de sintetizar compuestos aromáticos la mayoría de los cuales son fenoles o sus derivados con sustitución del oxígeno. Muchos de ellos son metabolitos secundarios de los cuales han sido aislados al menos 12.000, aproximadamente un 10% del total. En algunos casos estas sustancias son usadas por las plantas como mecanismo de defensa contra la predación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunas de estas sustancias, como los terpenoides, les confieren el aroma; otras, como las quinonas y los taninos, son los responsables de la pigmentación de la planta. Algunos compuestos le dan el sabor y algunas de estas hierbas se usan para sazonar los alimentos, así también como medicinales, (Cowan M., 1999).

La fitoquímica puede dividirse en varias categorías de compuestos de acuerdo al uso que se le dan a los principios activos:

1.4.1- Fenoles y polifenoles:

Algunos de los fitoquímicos bioactivos consisten en una simple sustitución en el anillo fenólico Ej. el ácido caféico, un compuesto derivado de fenilpropano altamente oxidado. Plantas como el estragón y tomillo contienen ácido caféico que es efectivo contra virus, bacterias y hongos.

El mecanismo de acción de los fenoles es debido a la inhibición de las enzimas, posiblemente a través de la reacción con los grupos sulfhidrilos o a interacciones inespecíficas con las proteínas, (Cowan M., 1999)

1.4.2- Quinonas:

Las quinonas, 2-5-ciclohexadien-1,4-diona, ampliamente distribuida en la naturaleza, actúan como agentes oxidantes bioquímicos para mediar los procesos de transferencia electrónica en la producción de energía.

Las quinonas son conocidas porque forman un complejo irreversible con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, frecuentemente llevan a la inactivación principal de las proteínas y la pérdida de su función. Por esta



razón, el rango potencial del efecto antimicrobiano de las quinonas es grande. Probablemente el blanco de la célula microbiana se debe a la superficie expuesta de las adhesinas, los polipéptidos de la pared celular y las enzimas unidas a la membrana, como la anthraquinona de *Cassia italica*, un árbol Paquistaní, que demostró tener actividad bacteriostática, (Cowan M., 1999).

1.4.3- Flavonas, flavonoides y flavonoles:

Las flavonas son de estructura fenólica que contienen un grupo carbonilo. La adición de un grupo 3-hidroxilo produce al flavonol. Los flavonoides son sustancias fenólicas hidroxiladas con unión del C6-C3 a un anillo aromático.

Estos compuestos son sintetizados por las plantas en respuestas a la infección microbiana. La actividad antimicrobiana se debe probablemente a la capacidad de formar complejos con proteínas extracelulares, solubles y también con las paredes celulares bacterianas, como con las quinonas. Los flavonoides lipofílicos podrían romper la membrana microbiana, además dichos compuestos exhiben efecto inhibitorio contra múltiples virus. Otros, como las isoflavonas, 3, 5, 7-trihidroxi-flavona derivado de la hierba perenne *Helichrysum aureonitens*, presentó actividad contra un amplio rango de bacterias gram positivas como así también contra hongos y virus, (Cowan M., 1999).

1.4.4- Taninos:

Son compuestos poliméricos fenólicos, que podrían formarse por la polimerización de las quinonas. Tienen actividad en la estimulación de células fagocíticas en el ser humano, y un amplio rango de acción anti-infecciosa.

Una de sus acciones moleculares, es la de formar complejos con proteínas a través de fuerzas específicas tales como las puentes de hidrógeno y efectos hidrofóbicos. Podrían inactivar las adhesinas microbianas, enzimas y proteínas de transporte de la célula, etc. También formar complejos con los polisacáridos. Los taninos inhiben el crecimiento de insectos y alteran la digestión en animales rumiantes.



Los taninos son compuestos tóxicos para hongos filamentosos, levaduras y bacterias; que condensados se unen a la pared celular de las bacterias de los rumiantes inhibiendo su crecimiento y la actividad proteasa, (Cowan M., 1999).

1.4.5- Cumarinas:

Son sustancias producidas por la unión benceno y anillos de α -pirona. Estas son las responsables del aroma de heno. Tienen propiedades antitrombósicas, antiinflamatorias y vasodilatadoras. Ej.: warfarina, es bien conocida por su acción como anticoagulante oral.

Varias cumarinas tienen actividad antimicrobianas. Se conoce que inhiben a *Candida albicans* por lo que se estudia su posible acción en la candidiasis vaginal, en pacientes embarazadas.

Un grupo de cumarinas estimulan a los macrófagos, lo que indirectamente tendría efecto negativo sobre los patógenos.

Las phytoalexinas, que son derivados de cumarinas, son producidas en zanahorias en respuesta a las infecciones fúngicas, (Cowan M., 1999).

1.4.6- Terpenoides y aceites esenciales:

Las fragancias de las plantas están en la fracción del aceite esencial. Estos últimos son metabolitos secundarios que están altamente enriquecidos en componentes basados en una estructura del isopreno. Son llamados terpenos, su estructura química general es $C_{10}H_{16}$ y los diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (C_{20} , C_{30} , y C_{40}), como así también los hemiterpenos (C_5) y sesquiterpenos (C_{15}). Estos, son sintetizados desde uniones acetatos y comparten sus orígenes con los ácidos grasos. Difieren de estos últimos en que contienen ramificaciones y son cíclicos. Los terpenoides más comunes son el alcanfor (monoterpeno), farnesol y artemisina (sesquiterpenoides). Los Terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, hongos, virus y protozoos.



En 1977 se informó que el 60% de los derivados de aceites esenciales fueron inhibidores de hongos, y el 30% activo frente a bacterias. El aframodiol, diterpeno de *Cameroonian spice*, presenta un amplio espectro antifúngico.

La acción de los terpenoides no está todavía bien conocida, pero se especula que desestabilizan los compuestos lipofílicos de la membrana.

El modo de acción de los aceites esenciales se debe a que reaccionan a través de la fracción lipofílica con la parte lipídica de la membrana celular, modificando la actividad de los canales de iones calcio. En ciertos niveles de dosis, los aceites volátiles saturan las membranas y muestran efectos similares al de las anestésicas locales. Pueden interactuar con las membranas celulares por medio de sus propiedades fisicoquímicas y forma molecular, pudiendo influir sobre sus enzimas, transportadores, canales de iones y receptores, (Cowan M., 1999).

1.4.7- Alcaloides:

Son componentes heterocíclicos nitrogenados, un ejemplo de los primeros en ser utilizados en medicina es la morfina, aislada en 1805 de *Papaver somniferum*, así como codeína y heroína derivados de la misma. Alcaloides diterpenoides aislados de plantas de Ranunculaceae tienen actividad antimicrobiana. El alcaloide más importante es la berberina, potencialmente activo contra tripanosoma y plamodio por su capacidad de intercalarse con el ADN, (Cowan M., 1999).

1.4.8- Lectinas y polipéptidos:

Los péptidos son los primeros compuestos conocidos que inhibieron a los microorganismos. Su acción podría ser la formación de canales iónicos en la membrana microbiana, o la inhibición competitiva por adhesión a las proteínas microbianas que se unen a los receptores polisacáridos del huésped, (Cowan M., 1999).



1.4.9- Mezclas:

La papaya (*Carica papaya*) produce una savia lechosa, látex, que es una mezcla compleja de compuestos químicos. El principal componente es la papaína, una enzima proteolítica muy conocida. También se encuentran alcaloides y carpaina. Los terpenoides presentes le dan las propiedades antimicrobianas.

Otras mezclas como la de raíces de *Withania somnifera* que se aplican en el tratamiento tanto en humano como en animales, poseen actividad antimicrobiana, antidiarreica, inmunomoduladora, anticancer y propiedades psicotrópicas, (Cowan M., 1999).

1.4.10- Otros compuestos:

Algunos compuestos no mencionados anteriormente y que demuestran actividad antimicrobiana serían la poliaminas, en particular la espermidina, isotiocianatos, tiosulfatos y glucósidos, (Cowan M., 1999).

Las composición estructural de algunos compuestos antes mencionados se muestran en la figura 1.

1.5- Métodos de extracción de los compuestos bioactivos:

El agua es el solvente universalmente usado para la extracción. En forma casera las plantas secas pueden ser ingeridas en infusiones como el té, o raramente como tinturas, plantas en soluciones alcohólicas, o inhaladas por vapor de suspensiones en ebullición. Partes de plantas secas pueden ser agregadas a aceites o jaleas y aplicadas externamente.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las plantas se realiza la búsqueda inicial de compuestos activos en los extractos acuosos y alcohólicos, seguida de varios métodos de extracción orgánica.

Casi todos los compuestos aislados de las plantas con actividad antimicrobiana son componentes orgánicos saturados o aromáticos, la mayoría de ellos provienen de extracciones alcohólicas con metanol y etanol. En efecto, en algunos estudios se utiliza completamente la fracción acuosa.



Los compuestos aislados por extracción acuosa son polipéptidos, varias lectinas son comúnmente los más efectivos como inhibidores de patógenos (usualmente virus). Ocasionalmente los taninos y terpenoides podrían también encontrarse en la fase acuosa, aunque ellos pueden ser obtenidos por tratamientos con solventes menos polares. En la tabla 3, se observan ejemplos de extracciones con distintos solventes y los compuestos activos aislados.

Tabla 3: Componentes activos extraídos de plantas medicinales por diferentes solventes.

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometano	Eter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoles
Almidón*	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides		Terpenoides	
Saponinas	Poliacetilenos*	Saponinas			Cumarinas*	
Terpenoides	Flavonol	Taninos			Acidos grasos*	
Polipéptidos*	Terpenoides	Xantoxilinas*				
Lectinas*	Esteroles*	Totarol*				
	Alcaloides	Quasinoideos*				
	Propolis*	Lactonas*				
		Flavonas				
		Fenonas*				
		Polifenoles				

Cowan, 1999

*componentes obtenidos generalmente con un solo solvente

Los componentes activos se encuentran en distintas partes de la planta, en el caso de ginseng se encontraron en las saponinas y el aceite esencial extraído de sus raíces, mientras en el eucaliptus los principios activos se hallaron en los taninos y el aceite esencial extraído de sus hojas.

Para las extracciones alcohólicas, el vegetal es secado, reducido a una fina textura, y así embebido en metanol o etanol por períodos prolongados. Entonces es filtrado, posteriormente concentrado a una baja presión y redissuelto en alcohol a una determinada concentración. En las extracciones acuosas los vegetales son embebidos en agua destilada, se retira el agua con papel secante y el extracto obtenido es filtrado. Este último filtrado puede ser centrifugado a 20.000 g durante 30 minutos varias veces para su clarificación.



Los productos crudos pueden ser utilizados para pruebas de difusión en discos y dilución en medios, para evaluar la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral.

De los productos químicos naturales pueden purificarse sus compuestos activos por una variedad de métodos, entre ellos partición entre etil acetato y agua, continuado con hexano y metanol para la obtención de flavonoles. Las estructuras químicas pueden ser analizadas por cromatografía, bioautografía, radioinmunoensayo, espectrofotometría de masa, HPLC, electroforesis capilar, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X, (Cowan M., 1999).

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos a través de diferentes métodos de extracción. Uno de los más empleados es el proceso de hidrodestilación donde los aceites volátiles son arrastrados por el vapor de agua a una temperatura de 100°C aproximadamente y luego son recuperados por condensación, (Murillo Perea y Viña Patiño, 1999; Senatore F., 1998).

La esencia es un subproducto de la industrialización integral del fruto, siendo el principal producto el jugo concentrado, (Muñoz F., 1993).

Otro método es el de extracción con solventes, que se caracteriza por operar a temperaturas moderadas (40-60°C) y por eso, se utiliza en los casos en que el producto a extraer sea termolábil. Por otra parte, el solvente (hexano, metanol, dicloroetileno, etc.) extrae otros compuestos no volátiles, además de la esencia, que en muchos casos resulta de interés ya que contribuyen al sabor y no pueden obtenerse por destilación. Dado que el solvente tiene baja selectividad, se extraen otros compuestos indeseables como colorantes y ceras que toman al producto oscuro, de alta viscosidad y difícil de solubilizar, (Umano et al., 2000).

El dióxido de carbono supercrítico en particular aventaja a los solventes convencionales por ser de bajo costo, no tóxico, no explosivo y muy selectivo; por otra parte el extracto obtenido no contiene trazas del solvente. La dificultad de la aplicación de esta tecnología está en la elevada inversión inicial, por lo que debe ser utilizada en productos de elevado valor, (Murillo Perea and Viña Patiño, 1999).



Para que tengan efectos terapéuticos, los aceites esenciales (AE) deben ser de la más alta calidad, convenientemente procesados a baja presión y temperatura, deben procesarse suavemente y estar libres de aditivos químicos y solventes.

Originalmente muchos fueron producidos por la industria del perfume donde los aceites son destilados rápidamente a altas presiones y temperaturas, rompiendo las moléculas del aceite y destruyendo las cualidades terapéuticas.

Los antiguos procesos de la destilación de aceite son un arte delicado y preciso, actualmente casi olvidado. No obstante, la ciencia está ahora redescubriendo estas sustancias terapéuticas que fueron usadas en tiempos antiguos y comienzan a recobrar su valor, (Drysdale and Drysdale, 2000).

1.6- Plantas medicinales del sur de Córdoba:

1.6.1- Generalidades:

Son variadas las plantas vasculares con acción farmacológica (373) que se encuentran en el sur de la provincia de Córdoba, de las cuales 295 son especies nativas y el resto exóticas. Las plantas medicinales más utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética para la elaboración de jugos, amargos y yerbas compuestas, son denominadas vulgarmente como tomillo, peperina, poleo y carqueja, pertenecientes a las especies: *Hedeoma multiflora* y *Minthostachys verticillata*, ambas de la familia *Lamiaceae*, *Lippia turbinata* de la familia *Verbenaceae* y *Baccharis crispa* de la familia *Asteraceae*, respectivamente.

1.6.2- *Minthostachys verticillata*:

La especie *Minthostachys verticillata* se ubica dentro de la familia *Lamiaceae*. Es un arbusto aromático de 30 cm hasta 2 metros de altura, presenta hojas con breves pecíolos y láminas aovadas de 1 a 5 cm de largo y pelos en ambas caras. Posee flores blancas agrupadas en las axilas de las hojas. Florece en verano y los frutos son secos como pequeñas cápsulas con



cuatro semillas diminutas por fruto. Fructifica en marzo y abril y se cosecha en verano, (Bocco y Grosso, 1994; Cantero y Núñez, 2000).

Minthostachys verticillata (Gris.) Epling recibió el nombre científico en el año 1936; con anterioridad, en el año 1817, se le había dado como nombre científico *Minthostachys mollis* (H.B.K.) Gris y desde allí conserva el nombre del género. También en el mismo año, Kunt, la designo como *Bystropogon mollis* y en 1874, Gris., *Xenopona verticillata*. El origen de este nombre es del latín minthos= menta y stachys una hierba semejante al puerro. Su nombre vulgar suele variar, por ejemplo, es llamada pipirina, peperita, poleo, piperina o peperina.

La distribución geográfica de *M. verticillata* es desde Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú y Bolivia, hasta el noroeste y centro de Argentina, donde se la encuentra en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca y Córdoba, (Soraru y Bandoni, 1978; Bandoni y col. 1998; Basualdo M.C., 1991). En las serranías cordobesas es un arbusto típico que define la zona y es el más abundante.

La composición del aceite esencial de *M. verticillata* tiene importancia comercial en la Argentina. Los estudios realizados para caracterizarlo químicamente demostraron la prevalencia de monoterpenos donde la mayoría fueron compuestos oxigenados. Entre los monoterpenos hidrocarbonados predomina el limoneno. Pulegona y mentona representaron la mayoría de los compuestos oxigenados del aceite, sólo una pequeña cantidad de sesquiterpenos pueden estar presentes en el aceite. Así también carvone, timol y carvacrol en menor proporción. Se encontró además variación en la proporción de estos compuestos en plantas recolectadas en distintas regiones geográficas, (De Feo et al., 1998; Zygadlo et al., 1996; Retamar and Mazzola, 1963).

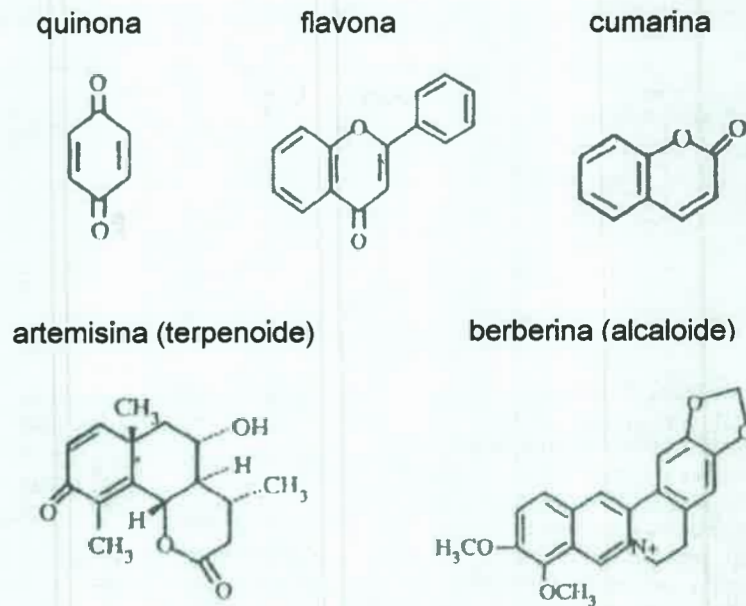
1.6.3- Antecedentes antimicrobianos de *Minthostachys verticillata*

El programa en el que esta enmarcado este trabajo de investigación ha demostrado hasta el momento la capacidad antimicrobiana de las diferentes fracciones extraídas de *M. verticillata*. El extracto etanólico crudo, inhibió la



infectividad del virus *Herpes suis* en un 99,9%, *Poliovirus* en un 32,5% y *Adenovirus* en 72%. El aceite esencial inhibió también el desarrollo de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Klebsiella sp.* Las decocciones obtenidas inhibieron el desarrollo de *S. aureus* aisladas de lesiones cutáneas.

Figura 1: Estructuras químicas de compuestos antimicrobianos de plantas





1.6.4- Planteamiento del problema

La incidencia de infecciones fúngicas se ha incrementado en los últimos años, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. En estos últimos el tratamiento de las micosis se torna más complicado, cuando se producen resistencias en los agentes patógenos a los antifúngicos convencionales.

La reducida disponibilidad de drogas antifúngicas, radica en que la célula fúngica es eucariota al igual que los huéspedes de donde pretende erradicarse. Por lo que se torna aún más difícil disponer de drogas nuevas que resulten efectivas contra patógenos que han generado resistencias y que además posean la propiedad de ser escasamente tóxicas para el paciente a tratar. Actualmente la búsqueda de drogas se ha convertido en un tópico de interés, por lo que se trata de sintetizar compuestos nuevos o bien derivados de drogas convencionales, incluyendo la búsqueda en fuentes naturales. Como ha ocurrido a lo largo de la historia del hombre, la búsqueda de sustancias terapéuticas en las plantas medicinales se repite actualmente.

En la región sur de la provincia de Córdoba, no se cuenta con datos epidemiológicos referidos a agentes causales de micosis superficiales, esto genera el interés por conocer la incidencia de estos microorganismos en esta región.

La serranía cordobesa se caracteriza por su variedad de plantas medicinales, siendo la más abundante *M. verticillata*, conocida popularmente como "peperina", y es utilizada en la medicina popular por sus propiedades antiespasmódicas.

Diferentes fracciones vegetales de esta planta medicinal fueron estudiadas en nuestro laboratorio, demostrándose su capacidad antiviral, y antibacteriana, (Zanon S. y col., 1999; Demo y col., 2001). Estos antecedentes impulsaron el estudio de la actividad antifúngica de preparaciones de *M. verticillata* frente a cepas de importancia clínica en la región, comparativamente con otras especies.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica de diferentes fracciones obtenidas de *Minthostachys verticillata* frente a cepas de referencias y especies fúngicas que causan micosis superficiales y oportunistas en nuestra región.

2.2- Objetivos específicos:

- Aislar e identificar a los agentes etiológicos productores de dermatofitias en pacientes que concurren al Hospital Central Regional de Río Cuarto.
 - Detectar patógenos fúngicos por examen directo.
 - Aislar e identificar por cultivo en medios adecuados.
 - Obtener valores de incidencia de los agentes fúngicos presentes en las lesiones de micosis superficiales.

- Obtener las distintas fracciones vegetales de *Minthostachys verticillata*.
 - Decocciones de diferentes concentraciones.
 - Extracto etanólico crudo.
 - Aceite esencial por hidrodestilación.
 - Identificar y cuantificar los componentes del aceite esencial, por cromatografía gaseosa.

- Evaluar la actividad antifúngica de cada fracción obtenida de *Minthostachys verticillata*.
 - Diferentes decocciones frente a hongos filamentosos de importancia clínica, por según técnica de *Mongelli* modificada.



- Extracto etanólico crudo, frente a hongos filamentosos y levaduras de importancia clínica, por técnica de microdilución.
- Aceite esencial, frente a hongos filamentosos y levaduras de importancia clínica, por técnica de microdilución.
- Componentes mayoritarios del aceite esencial, frente a hongos filamentosos de importancia clínica, por técnica de microdilución.
- Decocción al 1%, frente a levaduras de importancia clínica, técnica de microdilución.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración fúngica mínima (CFM) de la decocción, extracto etanólico crudo, aceite esencial y compuestos puros: mentona, pulegona y limoneno.

MATERIALES



3. MATERIALES

3.1- Drogas

Anfotericina B
Cloranfenicol
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Nistatina

3.2- Soluciones

3.2.1- Solución balanceada de fosfatos (PBS)

NaCl 8 g
KCl 0,2 g
Na₂PO₄H + 2 H₂O 1,44 g
K PO₄H₂ 0,2 g
Agua destilada c.s.p. 1000 ml

La solución fue fraccionada en frascos de vidrio y esterilizada a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 20 minutos y se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó en la preparaciones del extracto etanólico crudo.

3.2.2- Solución de Cloruro de sodio (ClNa) al 0.85%

Na Cl 0,85 g
Agua destilada c.s.p 100 ml

La solución fue fraccionada en frascos de vidrio y esterilizada a $\frac{3}{4}$ atmósfera, durante 20 minutos y se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó para obtener la suspensión de esporas fúngicas.

3.2.3- Solución colorante tinta china azul Parker

Esta solución se adquirió comercialmente y fue empleada, sin diluir, para la tinción de las estructuras fúngicas.



3.2.4- Solución extracto de levadura al 10%

Extracto de levadura10 g
Agua destilada c.s.p.100 ml.

Esta solución fue esterilizada con filtros Millipore de 0,22 μm de tamaño de poro y se conservó a 4° C hasta su uso. Fue empleada para la prueba de perforación y colonización del pelo.

3.2.5- Solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 15 o 20 %

KOH15-20 g
Agua destilada c.s.p.....100 ml

La solución fue envasada en frascos color caramelo y conservada, sin esterilizar, a temperatura ambiente. Se empleó para disgregar muestras queratinizadas de piel y/o faneras: uñas y pelos.

3.3- Medios

3.3.1- Agar Sabouraud Glucosado (ASG)

Peptona 10 g
Glucosa20 g
Agar-Agar20 g
Cloranfenicol0,05 mg/ml.
Cicloheximida0,5 mg/ml
Agua destiladac.s.p.1000 ml

Los ingredientes fueron disueltos de acuerdo al orden establecido, ajustándose el pH a 5,6. El medio fue esterilizado en autoclave, durante 20 minutos a $\frac{3}{4}$ de atmósfera y se conservó a 4°C hasta su uso.

Los antibióticos indicados se agregaron o no de acuerdo al propósito establecido.



3.3.2- Agar urea

Dextrosa	1 g
Peptona	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato monopotásico	2 g
Urea	20 g
Agar	15 g
Rojo fenol.....	12 mg
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se disolvió la urea en 100 ml de solvente y se esterilizó por filtración. Los ingredientes restantes se disolvieron en 900 ml de agua destilada y fueron esterilizados en autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Se dejó enfriar a 50°C y se mezcló con la solución urea en esterilidad. Se conservó a 4°C hasta su uso.

3.3.3- Caldo Sabouraud Glucosado (CSG)

Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

Los ingredientes fueron disueltos de acuerdo al orden establecido, ajustándose el pH a 5,6. El medio fue esterilizado en autoclave, durante 20 minutos a $\frac{3}{4}$ de atmósfera y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.3.4- Medio Lactrimel

Miel pura	10 ml
Leche entera	200 ml
Agar	15 g
Harina	20 g
Agua destilada tibia c.s.p.	600 ml

Se mezclaron la miel, el agua tibia y la leche con harina que se agregó a la preparación anterior. Se completó con agua hasta volumen final y se



esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ atmósfera, por 20 minutos, y se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó para inducir la esporulación fúngica.

3.3.5- Medio Littman

Peptona	10 g
Dextrosa	10 g
Bilis deshidratado	15 g
Agar	20 g
Cristal violeta	0,01 g
Agua destilada c.s.p.....	1.000 ml

Los ingredientes fueron disueltos de acuerdo al orden establecido y se esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 20 minutos. Se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó para inducir la esporulación fúngica.

3.4- Material Biológico

3.4.1- Especies fúngicas

Las cepas fúngicas se aislaron de casos clínicos de micosis superficiales en el Hospital Regional de Río Cuarto desde marzo a noviembre del 2003. Cepas de dermatofitos de referencia fueron provistas por la orientación de Micología del Dpto. de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Las cepas correspondieron a las especies: *Candida albicans*, *Microsporum gypseum*, *M. nanum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*. Se contó con otros hongos provenientes de casos clínicos en animales domésticos, de las cuales algunas especies son productores de micosis oportunistas en el hombre como: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula sp.*, *Trichophyton terrestre* y *Aspergillus fumigatus* recolectados y cedidas por el Instituto de Veterinaria del Departamento de Microbiología e Inmunología Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro.



3.4.2- Material vegetal

En estos ensayos se utilizaron hojas, talluelos y tallos tiernos de la planta *Minthostachys verticillata*, vulgarmente conocida como “peperina”, la que fue recolectada en el paraje Santa Mónica, zona aledaña a la localidad de Santa Rosa de Calamuchita, en febrero de 2003. La clasificación de la especie vegetal fue realizada en el Departamento de Ciencias Naturales, área Botánica Sistemática, de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El material vegetal inicialmente fue sometido a un proceso de lavado con abundante agua corriente, luego con agua destilada, secado al aire protegido de polvo ambiental, molienda y conservación en frascos color caramelo protegido de la luz a -20°C hasta su uso.



MÉTODOS



4. MÉTODOS

4.1- Toma de las muestras

Se analizaron 23 muestras clínicas obtenidas de pacientes de ambos sexos, cuyas edades variaron desde 20 días hasta 71 años, asistidos en el Hospital Regional Central de la Ciudad de Río Cuarto, Córdoba. Dichos pacientes fueron derivados a nuestro laboratorio por el médico dermatólogo, por presentar lesiones clínicas características de las micosis superficiales.

La toma de las muestras se realizó por raspado de piel lampiña del tronco, lecho ungueal tanto de miembros inferiores como superiores y de cuero cabelludo. En el caso de las escamas recolectadas de piel lisa se transportaron al laboratorio entre dos portaobjetos. Las escamas extraídas de uñas se colocaron en placas de Petri estériles.

4.2- Aislamiento e identificación

4.2.1- Examen directo

La observación directa al microscopio de las distintas muestras clínicas, se realizó en fresco con hidróxido de potasio (OHK) al 15% y calentamiento para disgregar la queratina, luego se agregó tinta azul Parker para observar las hifas con mayor facilidad.

4.2.2- Aislamiento del agente etiológico

El material recolectado fue inoculado en tubos pico de flauta conteniendo Agar Sabouraud Glucosado (ASG) sólo y otro suplementado con antibióticos (ASG ° / ATB).

A partir de los tubos con crecimiento fúngico se inocularon en tubos pico de flauta conteniendo los medios Littman o Lactrimel con el propósito de inducir la esporulación. En todos los casos, la incubación se realizó a 28°C por 10-15 días.

Luego del aislamiento se procedió a la identificación de géneros fúngicos, considerando las características macroscópicas, tales como la coloración en el envés y revés de la colonia; y las características



microscópicas como la presencia de abundantes o escasos macroconidios, su disposición, hifas hialinas, en espiral o raqueta, siguiendo las instrucciones descritas en los libros de Micología Médica y/o Diagnóstica, (Torres Rodríguez y col., 1993).

4.2.3- Identificación de las especies fúngicas

4.2.3.i- Identificación de las especies del género *Trichophyton* mediante la prueba del pelo (técnica de Ajello)

Todos los pasos de esta técnica están descritos en el Manual de Micología Diagnóstica, (López Martínez y col., 1995).

Fragmentos de cabellos de niños pre-púberes estériles fueron colocados en tubos de ensayos, conteniendo 3-4 ml de solución de extracto de levadura al 10%. Los mismos fueron inoculados con las cepas en estudio crecidas previamente en ASG y se incubaron a temperatura ambiente por 4 semanas.

La observación al microscopio de los pelos tratados con las cepas fúngicas problema reveló la capacidad de éstas de producir o no perforación en los pelos.

La técnica sirvió para diferenciar *T. mentagrophytes* de *T. rubrum*; teniendo el primero capacidad para producir órganos perforadores después de las 4 semanas, en contraposición con *T. rubrum* que carece de esta habilidad.

4.2.3.ii- Identificación de especies del género *Trichophyton* mediante la prueba de la ureasa

En tubos pico de flauta con Agar urea, se colocó un taco fúngico, previamente crecido en ASG y se incubó en estufa a 28°C durante 2 semanas. Se observó si hubo cambio de color o no del medio, desde el primer día de incubación.

Esta técnica sirvió para diferenciar *T. mentagrophytes* de *T. rubrum*, este último presenta una actividad ureasa débil o ausente antes de los 14 días; en cambio el primero demuestra una fuerte actividad ureasa antes de los 7 días, (López Martínez y col., 1995).



4.2.3.iii- Identificación de especies del género *Microsporium* mediante visualización macro y microscópica

Para la identificación en función de características culturales macroscópicas fueron considerados aspectos relacionados a la colonia fúngica tales como su textura y color. Es conocido que la especie *M. canis* exhibe colonias planas, blancas o amarillentas, toscamente vellosas o algodonosas, dispersas, con bordes radiales y con un color amarillo intenso o anaranjado al reverso. En referencia a *M. gypseum* su colonia es de rápido crecimiento, plana, pulverulenta, con aspecto y textura de piel de ante, de color canela. El reverso puede o no presentar pigmentos de color variable, (López Martínez y col., 1995).

La identificación de las especies en función de características microscópicas se logró observando exámenes en frescos, al microscopio óptico, realizados a partir del desarrollo fúngico en ASG. Se evaluó la presencia o ausencia de macroconidios y las características morfológicas de los mismos.

Según la literatura, *M. canis* se caracteriza por que sus macroconidios son abundantes, largos, en forma de uso, de paredes gruesas, con una prominencia asimétrica apical donde es más evidente la superficie rugosa (espículas) de estas estructuras, y casi siempre con más de seis compartimentos. También se observan hifas en raqueta, cuerpos pectinados y clamidoconidios.

M. gypseum también tiene macroconidios en abundancia, simétricos, elipsoidales de superficie rugosa o equinulada, de paredes delgadas, con cuatro a siete compartimentos y agrupados en racimos, (López Martínez y col., 1995).

4.3- Recolección y procesamiento del material vegetal

En la región de Santa Rosa de Calamuchita, provincia de Córdoba, se recolectó en forma manual *Minthostachys verticillata*, siguiendo pautas sugeridas por la OMS. Esto implicó el corte de la parte aérea del vegetal sin alterar sus raíces para no impedir la perpetuación de la especie.



Se lavó el vegetal recolectado con abundante agua corriente, agua destilada y se secó a temperatura ambiente en un espacio cerrado para evitar el polvo ambiental. Sus hojas y talluelos se conservaron en frascos limpios y cerrados a -20°C hasta su uso.

4.4- Obtención de las diferentes fracciones del material vegetal.

Se realizaron extracciones de principios activos por diferentes métodos para obtener:

- decocciones de distintas concentraciones.
- extracto etanólico crudo.
- aceite esencial.

4.4.1- Obtención de decocciones

La decocción fue realizada siguiendo la metodología descrita por *Mongelli y col., 1995*, con modificaciones. Se emplearon indistintamente 25 g de material vegetal seco en 200 ml de agua destilada, concentración final 12,5%, (fracción A), ó 5 g de planta en 100 ml de agua destilada, concentración final 5%, (fracción B), y a partir de ésta se realizó una dilución factor 2 obteniendo una tercera concentración de decocción del orden de 2,5%, (fracción C).

Cada mezcla fue calentada durante 20 minutos a temperatura de ebullición, se clarificó por papel Whattman N°2 y luego por filtro Millipore clarificante ($0,45\ \mu\text{m}$), por último fue esterilizada en autoclave a $\frac{3}{4}$ atmósfera, 20 minutos. Las decocciones se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.4.2- Producción de extracto etanólico crudo (EEC)

Hojas, tallos tiernos y talluelos de *Minthostachys verticillata* se maceraron en mortero con etanol al 80%, en relación 5 g de material vegetal por cada 30 ml de alcohol, (*Yip et al., 1961; Vanden Berghe et al., 1986; García et al., 1990*). Para facilitar la extracción de los principios activos se dejó reposar el macerado durante 24-48 h, a 37°C . El producto se filtró a través de un lienzo y el residuo retenido se lavó por percolación con más etanol al 80%. Se



llevó el colado y percolado a sequedad a 40°C, en estufa. El extracto seco se recolectó con espátula y se pesó para determinar el rendimiento en función de la relación peso inicial del vegetal y el peso final del residuo seco. El extracto seco fue resuspendido en el PBS precalentado a 37°C. El producto fue clarificado por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos y esterilizado por filtros Millipore de 0,22 μm de diámetro. Una vez estéril se conservó fraccionado en frascos color caramelo a resguardo de la luz a -80°C hasta el momento de su uso. El producto final así obtenido se identifica como extracto etanólico crudo (EEC).

4.4.3- Extracción del aceite esencial (AE) por hidrodestilación

El procedimiento de hidrodestilación implicó llenar una columna de extracción con 30 g de material vegetal triturado, depositado sobre una rejilla. Sobre un balón con 1 litro de agua destilada se sometió a calor hasta ebullición, los vapores al atravesar el lecho de la columna arrastraron los componentes volátiles presentes en el vegetal. El vapor conteniendo el AE y el agua se condensaron y por decantación, en virtud de la diferencia de densidad de los componentes de la mezcla, se recuperó sólo el aceite esencial, (Bamba et al., 1993; Ciccio and Poveda, 1999; De Feo et al., 1998).

La fracción oleosa de interés se conservó a -80°C hasta el momento de su uso y se identificó como aceite esencial (AE).

4.5- Identificación y cuantificación de los componentes del aceite esencial por cromatografía gaseosa.

Esta técnica permitió identificar los componentes mayoritarios presentes en el AE. Se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett- Packard modelo 5890 serie 2, equipado con detector de ionización de llama (FID, T detec 350°C), integrador HP-3396 y una columna HP-INNOWAX (30m x 0,25 mm x 0,25 m). Se utilizó el gas transportador N₂ con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El inyector fue Split:100/1 con un volumen de inyección de 1 μl , con una temperatura de inyección de 250°C. Sometiendo la muestra a dos rampas de temperaturas, la primera rampa comenzando a 60°C incrementando la



temperatura 2°C/min hasta alcanzar los 140°C, lo que permitió detectar los picos de retención para cada componente claramente. La segunda rampa comenzó con 140°C con un aumento de temperatura de 6°C/min hasta llegar a 250°C, donde se la dejó unos 20 minutos más para que eluyan todos los constituyentes del AE. El tiempo total de este ensayo fue de 80 minutos. Con el mismo procedimiento, se inyectaron las drogas patrones de los 6 componentes mayoritarios por separado, para determinar los tiempo de retención, previo al análisis del AE. El tiempo de retención de los componentes puros se utilizó para identificar cada uno de los componentes en el perfil cromatográfico que se produjo al inyectar el AE.

La elección de las drogas patrones estuvo basada en los trabajos previos realizados por Zygadlo et al., 1996 y De Feo et al., 1998, quienes analizaron la composición química del AE de *M. verticillata*, señalando como componentes mayoritarios a los terpenos: α -pineno, β -pineno, cíneol, limoneno, mentona y pulegona. Estos autores trabajaron con el mismo vegetal pero colectado en regiones serranas diferentes a la que es objeto de estudio en este trabajo, la metodología que utilizaron fue cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa, espectro infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

La cuantificación se realizó midiendo el área correspondiente a cada uno de los picos de la muestra, (Hayashi et al., 1995; Mímica - Dukié et al., 1991).

4.6- Ensayos de actividad antifúngica de las distintas fracciones vegetales

4.6.1- Determinación de la actividad antifúngica de decocción frente a hongos filamentosos.

Cada decocción fue empleada diluida 1:5 en ASG incorporado a placas de Petri dejándolo solidificar, las concentraciones finales de las decocciones fueron del 2,5%, 1% y del 0,5%, respectivamente.

El ensayo de actividad antifúngica consistió en colocar un taco fúngico (aproximadamente de 6mm x 6mm), de 10 días de crecimiento recuperado del cultivo en ASG de cada especie de hongo, aislada de los casos clínicos o cepas de referencia. El taco se ubicó en el centro de cada una de las placas de Petri conteniendo la fracción vegetal. Las placas fueron incubadas a 28°C



durante 15 días, haciéndose mediciones del diámetro de las colonias a distintos días post tratamiento: 3, 7, 10 y 15.

El ensayo incluyó sistemas controles de inhibición fúngica positiva. En lugar de las fracciones vegetales se incorporaron antifúngicos de reconocida actividad: 0,20 µg/ml de nistatina y 0,20 µg/ml anfotericina B. Como control negativo se empleó ASG sólo e inoculando en idénticas condiciones que los demás tratamientos. Todas las experiencias fueron realizadas por duplicado.

El porcentaje de inhibición fue calculado según lo especificado por Quiroga et al., 2001 de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Crecimiento micelial en placas sin tratar} - \text{Crecimiento micelial en placas tratadas}}{\text{Crecimiento micelial en placas sin tratar}} \times 100$$

El valor de índice terapéutico, es importante para poder evaluar su posible aplicación en el tratamiento de algunas micosis, se calculó mediante la relación entre la concentración de decocción no citotóxica sobre células eucariotas (Escobar, 2004) y la concentración de la misma fracción con actividad antifúngica:

$$IT = \frac{A}{B}$$

Donde: A: es la concentración del compuesto no tóxico sobre sistemas celulares
B: es la concentración del compuesto activo frente al patógeno.



4.6.2- Determinación de la actividad antifúngica de extracto etanólico, aceite esencial y componentes mayoritarios del aceite esencial frente a hongos filamentosos: método de microdilución

4.6.2.i- Preparación del inóculo fúngico

A un cultivo fúngico de 10 a 15 días de desarrollo en ASG, se incorporaron 2 ml de la solución de NaCl al 0,85%; raspando suavemente con ansa se obtuvo una suspensión de esporas. La misma fue diluida en CSG hasta obtener una concentración de 1×10^4 UFC/ml.

4.6.2.ii- Análisis de la actividad antifúngica: técnica de screening

Se realizó la prueba de *screening* para evaluar la capacidad antifúngica del EEC y el AE de *M. verticillata* frente a cada uno de los hongos filamentosos. Se empleó medio líquido (CSG), utilizando policubetas de 96 pocillos, siguiendo la técnica de microdilución para hongos filamentosos (M38-P) recomendada por el National Comité for Clinical Laboratory Standards, (Canton Lacasa y col., 2001; Ngono Ngane et al. 2000).

Se emplearon 100 μ l del EEC y AE a los que se agregaron 100 μ l del inóculo fúngico preparado como se describió anteriormente. Las policubetas se incubaron a 28°C, durante 72 h. Al cabo de este tiempo la lectura de los resultados se realizó a simple vista, evaluándose con más detalle a través de la observación microscópica. Los ensayos se realizaron por duplicado y con los siguientes controles: control negativo que contenía solo CSG y el inóculo fúngico, controles positivos que constaron de pocillos con 0,02 mg/ ml de nistatina y otros con anfotericina B más el inóculo. Se incluyó además un control de esterilidad del medio, para lo cual se sembraron 200 μ l de CSG solamente.

4.6.2.iii- Análisis de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM)

Esta técnica se desarrolló en diferentes experiencias para el EEC, el AE y los componentes puros que se encuentran en mayor proporción en el AE: mentona, pulegona y limoneno.



Se agregaron 100 µl de cada dilución factor 2 de la fracción vegetal en estudio, a los pocillos desde el número 1 al 8. En los pocillos 9 y 10, se incorporaron nistatina y anfotericina B en concentración de 0,02 mg/ml respectivamente. El pocillo 11 representó el control de desarrollo fúngico al que se le incorporó 100 µl de CSG. Por último, el pocillo 12 representó el control de esterilidad de todo el sistema ya que sólo contuvo 200 µl de CSG. Posteriormente se sembraron 100 µl de inóculo fúngico a todos los pocillos excepto para el pocillo del control de esterilidad del medio. La microplaca fue incubada durante 3 días a 28°C.

El valor de CIM se determinó por visualización directa del desarrollo fúngico y por observación paralela al microscopio óptico invertido durante los 3 días que duró el ensayo. Se consideró CIM a la última dilución de extracto vegetal o compuesto puro que inhibió el desarrollo de la cepa problema.

Para calcular la CFM a partir de la microplaca, se inocularon 100 µl de la última dilución que arrojó el valor de CIM, en placas conteniendo ASG, incubándolas a 28°C durante 3 días. Se definió la CFM como la mínima concentración a la cual menos del 0,1% del inóculo inicial sobrevivió. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Los aspectos metodológicos de esta técnica fueron adoptados, con modificaciones, de los trabajos de *Cantón Lacasa y col., 2001*.

4.6.3- Análisis de la actividad antifúngica de diferentes fracciones vegetales frente a hongos levaduriformes

Para esta determinación se procedió de la misma manera que la expuesta en el punto 4.6.2.ii y 4.6.2.iii tanto para decocción al 1%, EEC y AE, con las siguientes modificaciones:

En la preparación del inóculo para levaduras se tomaron con ansa 5 colonias de 24h de cultivo en ASG y se resuspendieron en solución de NaCl al 0,85%. La suspensión se diluyó en CSG hasta obtener una concentración de 1×10^3 UFC/ml.

Para el caso de *Cryptococcus neoformans* se partió de un cultivo de 48 horas.



Se incubaron las policubetas a 37°C durante por 72 horas, excepto para *Rhodotorula sp.* que se incubó a 25°C.

4.7. Registro de imágenes

El desarrollo microbiano o su inhibición por las fracciones vegetales, en placas de Petri o en tubos de ensayo, fue registrado con cámara fotográfica digital marca Kodak Easy Share CX6230 zoom digital camera; o bien con cámaras fotográficas digitales del Departamento de Audiovisuales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El desarrollo microbiano o su inhibición por las fracciones vegetales en policubetas fue registrado al microscopio óptico invertido Carl Zeiss Axiophot, con película AGFA color, 100 asas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1- Análisis de la frecuencia de dermatofitos en el sur de la provincia de Córdoba

Se estudiaron 23 pacientes derivados por el médico dermatólogo del Hospital Regional de Río Cuarto, por presentar lesiones características de micosis superficiales, 18 muestras resultaron positivas, determinándose una incidencia de micosis superficiales de 78%. Considerando la relación con el sexo de los pacientes, se obtuvieron 8 muestras de varones de los cuales el 75% (6) resultaron positivas al examen directo. De las 15 muestras provenientes de mujeres, 12 fueron positivas en el directo, representando un 80% (tabla 4).

Tabla 4: Examen micológico directo en función del sexo.

	Mujeres n=15	Varones n= 8	Total n=23
Examen directo positivo	12	6	18
Examen directo negativo	3	2	5
Porcentaje de positividad	80	75	78

Como puede apreciarse se detectaron más casos de micosis en mujeres que en varones, aunque los porcentajes de positividad no fueron significativamente diferentes. Estos datos concuerdan con los presentados por Davel y col. en 1999 a partir de un estudio multicéntrico de micosis superficiales en Argentina, en el cual la provincia de Córdoba no estuvo incluida.

Al analizar la tabla 5 puede observarse que el aislamiento en cultivo se logró a partir de solo 8 muestras (35%), de las 23, esto refleja que por ésta metodología se obtuvo un valor de incidencia menor al determinado por el examen directo. Si se observa la relación entre el número de muestras positivas mediante el examen directo (18) y las positivas por cultivo (8) se demuestra que el primer método es más sensible que el aislamiento del agente



patógeno en cultivo. Es habitual que los pacientes asistan al dermatólogo luego de automedicarse, lo que interfiere con la posibilidad de aislar el patógeno causal de la micosis.

En el caso de las muestras que desarrollaron en el cultivo, se identificaron a nivel de género teniendo en cuenta las características macroscópicas de las colonias, como el color que mostraron los medios en el envés y revés; el aspecto de las mismas, etc. Estas observaciones permitieron identificar los géneros *Microsporum* y más frecuentemente *Trichophyton*. A través del análisis microscópico, se determinaron: el aspecto de las hifas, tipo de conidios, su número y disposición confirmándose de esta manera la identificación en dichos géneros.

Las colonias de aspecto planas, algodonosas con bordes radiales, que en el reverso presentaron color amarillo intenso, y que en la observación microscópica presentaron abundantes macroconidios largos en forma de huso, con paredes gruesas y con una prominencia asimétrica apical con 6 o 7 septos, pertenecieron a la especie *M. canis*.

En la prueba del pelo se observó que las cepas aisladas e identificadas como pertenecientes al género *Trichophyton*, no presentaron la capacidad de producir órganos perforadores ya que los pelos mantuvieron la estructura normal, esto demostró que *T. rubrum* es el agente patógeno aislado, ya que esta especie carece de la capacidad de producir órganos perforadores. La prueba para la detección de ureasa confirmó la identificación de *T. rubrum* aislado a partir de las mismas muestras, debido a que esta prueba fue positiva recién a los 10 días de incubación.

Del total de muestras positivas en el cultivo (8), pudo determinarse que a partir de 6 se aisló a *T. rubrum* (75%) y las 2 restantes se recuperó *M. canis* (25%), datos que coinciden en esta provincia con los estudios realizados en otros centros hospitalarios Argentinos, donde informaron que *T. rubrum* es el dermatofito antropofílico cosmopolita y resulta ser el agente patógeno aislado con mayor frecuencia, aproximadamente en un 80% de los casos de las dermatomicosis producidas en humanos. En la mayoría de los casos documentados en Argentina se aisló en segundo lugar a la especie



T. mentagrophytes y luego a *M. canis*, (Davel, y col. 1999). Nuestro estudio reporta datos no coincidentes con estos informes ya que *M. canis* se aisló en 2 casos mientras no se detectaron micosis causadas por *T. mentagrophytes*. Estos datos se correlacionan con los obtenidos en la provincia del Chaco y con aquellos de 10 años de estudio sobre incidencia de las especies dermatofíticas realizados en Madrid, España, (Mangiaterra, y col. 1998; del Palacio y col., 1999).



Tabla 5: Examen micológico directo, aislamiento e identificación de dermatofitos en función del grupo etario.

Rango de edad (años)	Examen directo				Cultivo				
	negativo	positivo	Total	Positividad (%)	negativo	positivo	Agente etiológico	Muestra clínica	Positividad %
0-10	1	4	5	22,22	1	4	<i>T. rubrum</i> <i>T. rubrum</i> <i>M. canis</i> <i>M. canis</i>	Piel lisa Cuero cabelludo Piel lisa Cuero cabelludo	50
11-20	-	-	-	0	-	-	-	-	-
21-30	-	3	3	16,6	2	1	<i>T. rubrum</i>	Uñas de pie y mano	12,5
31-40	1	2	3	11,11	1	2	<i>T. rubrum</i> <i>T. rubrum</i>	Piel lisa Uñas de pie	25
41-50	1	3	4	16,6	3	1	<i>T. rubrum</i>	Uñas de pie	12,5
51-60	1	3	4	16,6	4	-	-	-	-
61-70	-	2	2	11,11	2	-	-	-	-
> 71	1	1	2	5,55	2	-	-	-	-
Total	5	18	23	100	15	8			100



En cuanto a las localizaciones de las lesiones se pudo observar el siguiente orden de incidencia: en uñas (tinea unguium) $n= 14$, en piel lisa (tinea corporis) $n= 6$ y en cuero cabelludo (tinea capitis) $n= 3$. Sin embargo la recuperación del agente etiológico se dio en forma inversa, ocurriendo con más éxito a partir de cuero cabelludo, piel lisa y por último en uñas. En uñas sólo fue posible aislar a *T. rubrum*, mientras que en piel lisa como en cuero cabelludo se recuperó además *M. canis*.

Los resultados obtenidos del examen directo y de la identificación del agente etiológico en función del grupo etario demostraron que el mayor porcentaje de positividad en el examen directo se encontró en el grupo etario comprendido entre 0 a los 10 años. Esto podría deberse a la inmadurez inmunológica de los niños a esta edad, que estaría ligada proporcionalmente a una mayor susceptibilidad. El n muestral no fue uniforme para todos los grupos etarios si consideramos que se aislaron ambas especies, *T. rubrum* y *M. canis*, de piel lisa y cuero cabelludo, áreas anatómicas expuestas a infecciones fúngicas, detectadas frecuentemente en niños de corta edad. Esto está en relación a los hábitos infantiles de jugar con mascotas y tierra, nicho ecológico propicio para contraer estas afecciones.

Evaluando la frecuencia de resultados positivos al examen directo en función de las estaciones del año, pudo notarse que fueron más frecuentes en abril y en agosto, meses estacionales de otoño invierno, lo que podría deberse al estrés causado por el frío. Considerando que las personas que asisten al Hospital Regional de Río Cuarto son de bajos recursos, también es causa predisponente de estas micosis la mayor susceptibilidad debido a factores como la inadecuada alimentación. Además en general los pacientes pertenecen a familias de grupo numeroso lo que implica en muchos casos condiciones de hacinamiento que facilitan la transmisión por contacto directo.

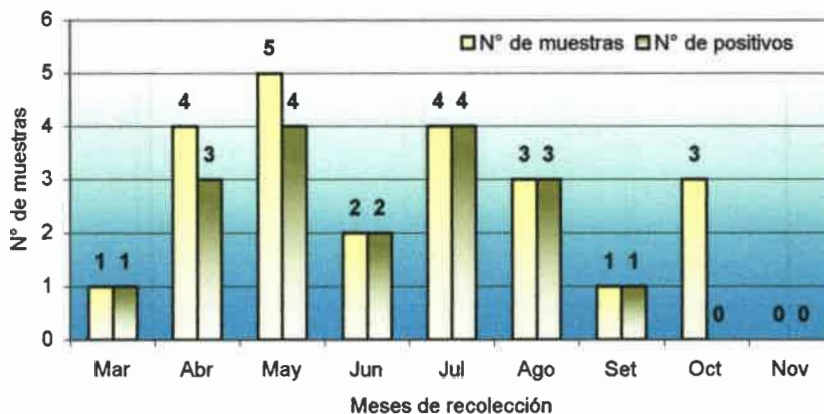
Como puede observarse en la figura 2, solo se dispuso de una muestra en el mes de marzo y setiembre pero con examen directo positivo, a diferencia del mes de octubre en el cual las tres muestras resultaron negativas. Esto pudo deberse a que la lesión no fue causada por un dermatofito, o bien el agente



causal se encuentra dañado por la automedicación o tratamiento a los que se someten los pacientes antes de recurrir al médico dermatólogo.

Debe considerarse que en el año de estudio los registros pluviométricos para la región fueron normales en los meses de invierno, no así para primavera-verano, lo que justificaría el escaso número de muestras recibidas durante este último período.

Figura 2: Muestras clínicas positivas al examen directo en función del tiempo.





5.2- Análisis de la cromatografía gaseosa del aceite esencial de *Minthostachys verticillata*.

Los resultados obtenidos del aceite esencial de *M. verticillata*, recolectada en la región de Santa Rosa de Calamuchita, en el mes de febrero de 2003, que se obtuvo por el proceso de hidrodestilación mostró un rendimiento que alcanzó el 9% (ml/100g de hierba seca), con densidad de 916,95 mg/ml. Esta densidad es ligeramente superior al 902 mg/ml, valor obtenido por De Feo y col., (1998) para el mismo vegetal. Los datos de rendimiento que se obtuvieron en este estudio coinciden en el rango de valores obtenidos por Zygadlo y col. (1996) a partir del mismo vegetal, colectado en distintas regiones Argentinas. Estudios recientes realizados también en *M. verticillata* cosechado en la región de Santa Rosa de Calamuchita durante el mes de abril, determinaron que el AE obtenido alcanzó un rendimiento del 4,8% y con densidad de 8,42 mg/ml, (Astesano, 2002). Dichos resultados demuestran que el mayor rendimiento se obtiene a partir del vegetal colectado en el mes de febrero, con el AE al doble en volumen; y la densidad altamente superior a la observada en plantas recolectadas en el mes de abril.

La tabla 6 muestra los tiempos de retención y el área porcentual de los componentes mayoritarios del AE obtenido a partir de *M. verticillata*, identificados y cuantificados por cromatografía gaseosa (figura 3).

El porcentaje total o de estos constituyentes fue de 89% el restante 11% representó a otros componentes del AE no identificados en este estudio. De los 6 componentes mayoritarios identificados pudimos demostrar la presencia de monoterpenos, siendo mentona y pulegona los oxigenados; α -pineno, β -pineno y limoneno los hidrocarbonados. Mentona y pulegona fueron los componentes más abundantes presentes en la muestra, 87% del AE.

Cuando los datos obtenidos en este estudio se compararon con lo realizado por Astesano (2002), empleando el mismo vegetal y lugar de recolección a diferente mes de colecta, se pudo observar que si bien el porcentaje total de los componentes mayoritarios fue el mismo, se encontraron diferencias marcadas en la concentración de cada uno de ellos. Durante el mes



de abril, la presencia de mentona en el AE representó el 16% y pulegona 63%, en febrero los porcentajes fueron 35% y 52%, respectivamente.

Según lo descrito por Bandoni y col. en 1998 existe una estrecha relación entre la cantidad de mentona y la edad de la planta. La proporción elevada de mentona, aquí determinada, coincide con el estado de floración de *M. verticillata*, colectada en febrero, mientras que en el mes de abril, en etapa de fructificación, éste compuesto se halla en menor cantidad. Esto demuestra los distintos quimiotipos dependientes del clima y el estado de desarrollo de la planta aromática.

La relación pulegona/mentona obtenida fue 1,5 veces la informada por Zygadlo et al., 1996, quienes analizaron la misma planta en diferentes regiones de Argentina, y a los encontrados por De Feo et al., 1998, en el mismo vegetal pero de la zona serrana de Mina claver. Comparando el presente estudio con los resultados hallados por Astesano, 2002, si bien la única variable de los ensayos fue el mes de recolección del vegetal, las proporciones de AE obtenidas fueron diferentes. Se puede inferir que el quimiotipo estaría en estrecha relación con numerosos factores tales como el clima, época estacional y edad de la planta.

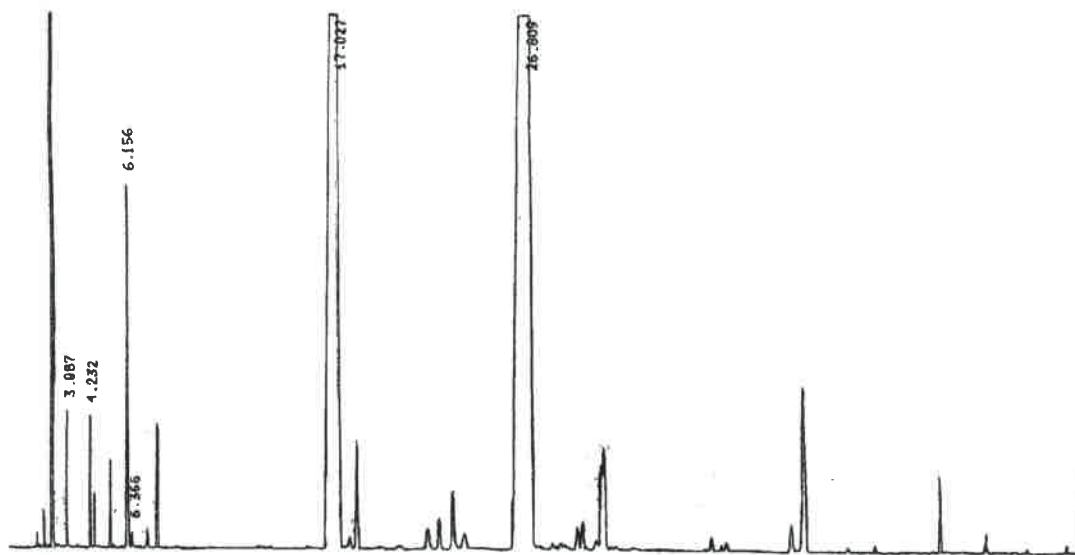


Figura 3: Perfil de la cromatografía gaseosa del aceite esencial de *Minthostachys verticillata*. Los tiempos de retención indicados corresponden a los componentes mayoritarios: α -pineno, β -pineno, limoneno, cíneol, mentona y pulegona en este orden y de izquierda a derecha. El primer pico corresponde al de inyección de la muestra. Los tiempos de retención que no se indican corresponden a los componentes no identificados, en este ensayo.

Tabla 6: Tiempos de retención y área porcentual de los componentes mayoritarios del AE de *Minthostachys verticillata*

Componentes del AE:	Tiempo de retención	Área %
α -pineno	3,087	0,33552
β -pineno	4,232	0,44416
limoneno	6,156	1,79836
cíneol	6,366	0,07374
mentona	17,027	34,86331
pulegona	26,809	51,92429
Total		89,43



5.3- Determinación de la actividad de las decocciones de *Minthostachys verticillata* frente a hongos filamentosos de importancia clínica.

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos de la actividad antifúngica de las dos preparaciones A (34,59 mg/ml) y B (2,14 mg/ml) de decocción frente a especies aisladas de casos clínicos recientes en la región.

A las especies que fueron sensibles a la decocción de 2,14 mg/ml se estudió su comportamiento frente a una concentración menor: 1,07 mg/ml. Estas decocciones se denominaron fracciones A, B y C con concentración decreciente: 34,59, 2,14 y 1,07 mg/ml, respectivamente. La figura 4 muestra la inhibición de *T. rubrum* c.r. frente a la decocción de 34,59 mg/ml.

Se observó que el desarrollo de *T. rubrum* fue inhibido por las preparaciones A y B, siendo este efecto menor al producido por los controles positivos. Cuando se calculan los porcentajes de inhibición del desarrollo fúngico como lo describe Quiroga et al., (2001), el valor obtenido es del 10%, siendo el límite de lo considerado sensible a la fracción ensayada, según estudios realizados por el investigador en plantas medicinales del nordeste Argentino. Los autores definieron la inhibición del desarrollo fúngico cuando el porcentaje que se alcanza se encuentra entre un 10% y un 20% respecto del crecimiento del control negativo, con ensayos de 5 días de duración. En este estudio se realizaron mediciones hasta que el desarrollo fúngico, en el control negativo, se extendiera a toda la placa de Petri.

Los resultados demostraron que la especie *M. canis* no fue inhibida significativa en su desarrollo por ninguna de las preparaciones, comportándose la fracción A como un inductor del desarrollo fúngico o bien un nutriente, ya que el crecimiento de esta especie resultó ser estimulada en relación al control negativo del ensayo.

Con estos resultados podría considerarse a la especie *T. rubrum*, aislado de casos clínicos de nuestra región como sensible a la acción de la decocción de *Minthostachys verticillata* y no así a la especie *M. canis* que fue inhibida solo en un 8% en su crecimiento. En cuanto a la relación entre el porcentaje de inhibición producido por la decocción y los controles positivos, se encontró que



en el día 10 post tratamiento, la acción inhibitoria de la fracción A se asemejó a la actividad del antifúngico nistatina y 1,5 veces menor que el valor arrojado frente a la anfotericina B, por lo que se podría decir que los resultados obtenidos fueron promisorios en la decocción, que llegaría en un futuro a ser una alternativa terapéutica para las dermatofitosis donde el agente causal sea *T. rubrum*.

T. rubrum pudo recuperarse de la inhibición en el día 15 post tratamiento, esto sugiere que la regularidad de administración de esta fracción vegetal como terapia debería realizarse con dosis que lleven a la eliminación del patógeno dentro de los 10 días de comenzada la infección.

M. canis a los 15 días post tratamiento logró revertir la mínima acción antagonica de la fracción A. Esta terapia no sería efectiva en las dermatomicosis causadas por *M. canis* demostrando una vez más que no solo el huésped, sino la especie implicada es de suma importancia en los tratamientos de las micosis.



Tabla 7: Inhibición del crecimiento radial de *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis* aislados de casos clínicos, por decocciones de *Minthostachys verticillata*.

Especies fúngicas	Días post tratamiento	Diámetro de las colonias (cm)				Inhibición de desarrollo fúngico*: (%)				
		Control negativo (sin tratar)	Decocción 34,59 mg/ml	Decocción 2,14 mg/ml	Nistatina 0,02 mg/ml	Anfotericina B 0,02 mg/ml	Decocción 34,59mg/ml	Decocción 2,14 mg/ml	Nistatina 0,02 mg/ml	Anfotericina B 0,02 mg/ml
<i>T. rubrum</i>	3	1,75	1,28	1,53	1,22	1,15	26,89	12,60	30,30	34,29
	7	3,67	2,60	3,16	2,37	2,02	29,15	13,90	35,42	44,96
	10	5,12	3,55	4,35	3,25	2,82	30,66	15,00	36,52	44,93
	15	6,90	6,10	6,21	4,10	3,45	11,60	10,00	40,58	50,00
<i>M. canis</i>	3	2,37	2,35	2,57	1,07	0,8	0,84	-	54,85	66,24
	7	5,02	4,77	5,08	1,80	1,55	5,00	-	64,14	69,20
	10	7,00	6,47	6,95	2,45	1,87	7,60	-	65,00	73,29
	15	8,45	8,77	8,95	3,00	2,45	3,00	-	64,50	71,00

*: Según fórmula de Quiroga *et al*, 2001.

-: no hubo inhibición del desarrollo fúngico.



Con respecto a la acción de la decocción frente a otros hongos filamentosos causantes de dermatofitosis (cepas de referencia) y de micosis oportunistas como *Aspergillus fumigatus* provenientes de muestras humanas y animales, se pudo corroborar que las cepas de referencias *T. rubrum* y *M. canis* se comportaron de igual manera que las cepas aisladas de casos clínicos recientes en la región, tabla 8. Sin embargo *T. rubrum*, cepa de referencia, no fue sensible al tercer día post tratamiento a ninguna de las concentraciones de la decocción, al igual que el antifúngico anfotericina B en el mismo día, manifestándose a los 15 días una diferencia en la inhibición entre las preparaciones A y B y los controles positivos del 6 y el 10%. Se pudo observar que esta inhibición fue en progresivo aumento durante el período de tratamiento.

T. rubrum, cepa de referencia, fue más sensible, esto probablemente se deba a los cambios fisiológicos inducidos por el cultivo y conservación en el laboratorio. Hay que tener en cuenta además que la cepa recientemente aislada ha sufrido probablemente la agresión de la automedicación y tratamientos caseros que los pacientes realizan para controlar esta infección, como así también la mayor sensibilidad que presenta esta cepa frente a los antifúngicos del control positivo.

Trichophyton mentagrophytes resultó resistente a ambas concentraciones de la decocción, contrariamente a lo esperado esta preparación vegetal se comportó como un inductor del crecimiento fúngico o bien un nutriente en este caso. En el caso de *T. terrestre*, estas preparaciones vegetales demuestran ser más efectivas al séptimo día post tratamiento recuperándose de esta inhibición en los días posteriores al tratamiento, al igual que ocurre frente a nistatina y no así a anfotericina B, que fue progresivamente más inhibidor del crecimiento al aumentar el período de incubación.

En esta evaluación *Microsporum gypseum* resultó ser sensible a la decocción siendo más inhibido en su crecimiento al séptimo día post tratamiento y decayendo esta actividad a medida que aumentaba el tiempo de incubación con la concentración de la decocción de 34,59 mg/ml. En cuanto a la concentración de 2,14 mg/ml ocurrió lo mismo pero la mayor actividad



inhibitoria se dio al tercer día de tratamiento, habiendo una diferencia del 10% y 16% con respecto a los controles positivos. En cuanto a *M. nanum* también mostró ser sensible a la decocción, siendo la fracción A más efectiva al día 10 de incubación, la fracción B aumentó progresivamente su acción medida que aumentaba el período de incubación, siendo más efectivo a los 15 días post tratamiento y superando significativamente la acción de la nistatina hasta la finalización del ensayo.

Nuevamente podemos inferir que las diferencias de sensibilidad observadas entre *M. canis* y *T. rubrum* para esta fracción vegetal no están en relación con las características del género ya que distintas especies del mismo género se comportan de modo diferente.

Para el caso de *Aspergillus fumigatus*, agente causal de micosis oportunistas en el hombre y que afecta además a animales, resultó ser resistente a la acción de la decocción, la inhibición no superó el 8%. Se observó además que esta especie resultó sensible a nistatina y anfotericina B, pero con el transcurrir de los días la inhibición efectuada por cualquier componente evaluado disminuyó significativamente de 74% al 49%.

De acuerdo a los resultados podríamos concluir que, las decocciones demostraron ser efectivas sobre ambas cepas de *T. rubrum*, *M. gypseum*, *M. nanum* y *T. terrestre*, considerándose así como un potencial fitofármaco para el control de estos patógenos. Aunque no se observa una relación lineal entre dosis y respuesta en estas especies, si se evalúa en el caso de *T. rubrum*, la fracción A (34,5 mg/ml) al día 15 ejerció su máxima actividad (34%) y en el mismo día la fracción B (2,14 mg/ml) fue más efectiva (39%). Esta variación justificó los ensayos utilizando la fracción C con una concentración de 1,07 mg/ml, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 9.



Tabla 8: Inhibición del crecimiento radial de hongos filamentosos por decocciones de *Mintostachys verticillata*.

Especies fúngicas	Días post tratamiento	Diámetro de las colonias en cm:				Inhibición de desarrollo fúngico* (%)				
		Control negativo ^s /tratar	Decocción 34,59mg/ml	Decocción 2,14 mg/ml	Nistatina 0,02 mg/ml	Anfotericina B 0,02 mg/ml	Decocción 34,59mg/ml	Decocción 2,14 mg/ml	Nistatina 0,02mg/ml	Anfotericina B 0,02 mg/ml
<i>T. rubrum</i> c.r.	3	1,22	1,10	1,30	0,92	1,27	9,84	-	24,60	-
	7	2,77	2,25	2,62	1,82	1,97	18,77	5,41	34,30	28,88
	10	4,10	2,98	3,47	2,47	2,45	27,30	15,36	39,76	40,24
	15	6,70	4,40	4,08	3,85	3,67	34,33	39,10	42,53	45,22
<i>T. mentagrophytes</i> c.r.	3	1,47	1,62	1,83	0,95	1,00	-	-	35,37	31,97
	7	3,32	4,03	3,50	2,02	1,65	-	-	39,16	50,30
	10	5,07	6,05	6,25	2,60	2,42	-	-	48,70	52,30
	15	7,07	7,57	7,85	3,20	2,77	-	-	54,73	60,82
<i>M. canis</i> c.r.	3	1,85	1,68	1,75	0,67	0,65	9,20	5,4	63,80	64,86
	7	4,82	4,42	4,43	1,87	1,22	8,30	8,09	61,20	74,69
	10	6,90	6,65	6,97	2,97	1,90	3,62	-	56,96	72,46
	15	8,35	8,23	8,50	4,20	2,02	1,44	-	49,70	75,80
<i>M. gypseum</i> c.r.	3	1,90	1,48	1,28	0,92	0,72	22,1	32,60	51,60	62,10
	7	5,17	2,88	3,97	2,07	2,20	44,30	23,21	59,96	57,45
	10	7,17	4,95	6,00	3,27	2,92	30,96	16,32	54,39	59,27
	15	8,25	6,50	7,00	4,15	3,50	21,22	15,15	49,69	57,60
<i>M. nanum</i> c.r.	3	0,87	0,83	0,82	0,87	0,72	4,59	5,74	0	17,24
	7	1,80	1,08	1,23	1,25	0,70	40,00	31,66	30,50	61,10
	10	2,55	1,35	1,73	1,80	0,97	47,00	32,16	29,41	61,96
	15	3,32	1,87	2,10	2,02	1,12	43,70	36,75	39,15	66,96
<i>T. terrestre</i> (a)	3	1,65	1,20	1,5	1,0	1,17	27,27	9,09	39,39	29,09
	7	3,27	2,32	2,10	2,0	2,02	29,05	35,78	38,84	38,23
	10	4,25	3,35	2,73	2,77	2,45	21,17	35,76	34,82	42,35
	15	7,62	6,25	5,90	4,67	4,15	17,97	22,57	38,71	45,55
<i>A. fumigatus</i> (a)	3	6,12	5,95	5,62	2,15	1,57	2,77	8,17	64,86	74,35
	7	8,92	9,46	9,13	5,37	3,4	-	-	39,80	61,88
	10	9,0	9,6	9,13	8,35	4,6	-	-	7,22	48,88

*: Según fórmula de Quiroga et al, 2001.

-: no hubo inhibición del desarrollo fúngico, c.r.: cepa de referencia y (a): aislado de muestras animales.



Los resultados obtenidos en esta última experiencia demostraron que *T. rubrum* aislado en pacientes del Hospital Regional de Río Cuarto no fue sensible a la decocción de concentración 1,07 mg/ml, y sí lo fue la cepa de referencia. *T. terrestre* mostró ser resistente a esta fracción, observándose por el contrario una estimulación de su crecimiento. En el caso de *M. gypseum* y *M. nanum* fueron sensibles a 1,07 mg/ml de la decocción, aunque su valor fue el mínimo para ser considerado efectivo.

Cuando se evaluaron los porcentajes de inhibición para cada concentración de la decocción sobre los dermatofitos sensibles, se observó que los resultados fueron controvertidos en cuanto a la relación de la concentración de la decocción y el porcentaje de inhibición ejercida por la misma. La tabla 10 muestra la comparación de la inhibición del desarrollo fúngico de las tres concentraciones de la decocción. En el caso de *T. rubrum* (cepa de referencia), *M. gypseum* y *T. terrestre* la mayor actividad antifúngica de la decocción fue a una concentración intermedia (2,14mg/ml). Si pudo observarse linealidad en la cepa de *T. rubrum* aislado de casos clínicos y para *M. nanum*, a partir del día 7 post tratamiento para este último.

Es de destacar que *T. rubrum* fue en forma limitada sensible a la fracción C de la fracción y siendo esta 33 veces más diluida que la fracción A, debería esperarse que esta especie no fuese sensible a la fracción C, aunque inhibió 2 veces menos que a la fracción A. Evaluando estos resultados, se observa que no hubo relación entre dosis-respuesta.

Aunque la naturaleza química de la decocción no se conoce, si puede suponerse que se encuentren polipéptidos, almidón y lectina, entre otros componentes (Cowan M., 1999). Esta preparación vegetal tendría un comportamiento diferente según las concentraciones en las que se encuentren sus constituyentes. Así entre ellos podrían ejercer acción sinérgicas o antagónicas para inhibir el patógeno, como ha sido demostrado por otros investigadores, (Lee et al., 1997; Karpouhtsis et al., 1998). Esto fue demostrado con el comportamiento de la especie *T. rubrum*, cepa aislada recientemente y *M. canis* a los 15 días post tratamiento cuando una fracción más concentrada



inhibió su desarrollo y en una menos concentrada estimuló el desarrollo micelial de ambos patógenos.

Conociéndose que la decocción tiene un valor de concentración máxima no citotóxica de 7 mg/ml, (Escobar, 2004), si se establece la relación entre este valor y el de la concentración activa frente a los hongos filamentosos patógenos estudiados, la misma arroja un valor de 3 para la fracción B y de 6,5 para la fracción C. Teniendo en cuenta lo sugerido por Andrei y col (1985), que un valor de 1 o superior es significativo para que una droga pueda ser aplicada en un tratamiento sin que el paciente sufra algún daño, este valor de 3 obtenido con la decocción de *Minthostachys verticillata* nos muestra selectividad y especificidad de acción para el tratamiento de estas afecciones.

Por lo que se demuestra que la decocción de *Minthostachys verticillata* podría ser empleada como un futuro fitofármaco con la seguridad de que no provocaría alteraciones en las células del huésped.



Tabla 9: Inhibición del crecimiento radial de hongos filamentosos por decocción (1,07mg/ml) de *M. verticillata*.

Especies fúngicas	Días post tratamiento	Diámetro de las colonias en cm				Inhibición del crecimiento fúngico*(%)		
		Control negativo (sin tratar)	Decocción 1,07 mg/ml	Nistatina 0,02 mg/ml	Anfotericina B 0,02 mg/ml	Decocción 1,07 mg/ml	Nistatina 0,02 mg/ml	Anfotericina B 0,02 mg/ml
<i>T. rubrum</i> c.a.	3	1,35	1,47	1,22	1,15	-	9,63	14,81
	7	2,65	2,85	2,37	2,02	-	10,57	24,04
	10	4,15	4,42	3,25	2,82	-	21,69	32,05
	15	6,10	6,45	4,10	3,45	-	32,79	43,44
<i>T. rubrum</i> c.r.	3	1,50	1,42	0,92	1,27	5,33	38,67	15,33
	7	3,25	2,95	1,82	1,97	9,23	44	39,38
	10	4,85	4,27	2,47	2,45	11,96	49	49,48
	15	7,40	6,52	3,85	3,67	11,89	47,97	50,40
<i>M. gypseum</i> c.r.	3	2,25	2,05	0,92	0,72	8,89	59,11	68
	7	5,20	4,82	2,07	2,20	7,31	60,19	57,60
	10	8,25	7,32	3,27	2,92	11,27	60,36	64,60
	15	9,25	9,35	4,15	3,50	-	55,13	62,16
<i>M. nanum</i> c.r.	3	1,65	1,52	0,87	0,72	7,88	47,27	56,36
	7	3,75	3,42	1,25	0,70	8,80	66,67	81,33
	10	5,40	4,82	1,80	0,97	10,74	66,67	82,04
	15	7,95	7,10	2,02	1,12	10,69	74,60	85,91
<i>T. terrestris</i> (a)	3	1,2	1,55	1,0	1,17	-	16,66	2,5
	7	2,65	2,85	2,0	2,02	-	24,52	23,77
	10	4,25	4,07	2,77	2,45	9	34,82	42,35
	15	4,75	5,15	4,67	4,15	-	1,68	12,63

*: Según fórmula de Quiroga et al., 2001

-: porcentaje de desarrollo fúngico por arriba del valor control negativo, c.r.: cepa de referencia, c.a.: cepa aislada en humanos, y (a): aislada en animales.



Tabla 10: Análisis Comparativo de la actividad antifúngica de las tres preparaciones de decocción de *M. verticillata* sobre dermatofitos

Especies fúngicas	Días post tratamiento	Porcentaje de inhibición de desarrollo fúngico*:		
		Decocción 34,59 mg/ml	Decocción 2,14 mg/ml	Decocción 1,07 mg/ml
<i>T. rubrum c.a.</i>	3	26,89	12,60	-
	7	29,15	13,90	-
	10	30,66	15,00	-
	15	11,60	10,00	-
<i>T. rubrum c.r.</i>	3	9,84	-	5,33
	7	18,77	5,41	9,23
	10	27,30	15,36	11,96
	15	34,33	39,10	11,89
<i>M. gypseum c.r.</i>	3	22,1	32,60	8,89
	7	44,30	23,21	7,31
	10	30,96	16,32	11,27
	15	21,22	15,15	-
<i>M. nanum c.r.</i>	3	4,59	5,74	7,88
	7	40,00	31,66	8,80
	10	47,00	32,16	10,74
	15	43,70	36,75	10,69
<i>T. terrestre (a)</i>	3	27,27	9,09	-
	7	29,05	35,78	-
	10	21,17	35,76	9
	17	17,97	22,57	-

*: Según fórmula de Quiroga et al., 2001

-: porcentaje de desarrollo fúngico por arriba del valor control negativo, c.r.: cepa de referencia, c.a.: cepa aislada recientemente y (a): aislada en animales.

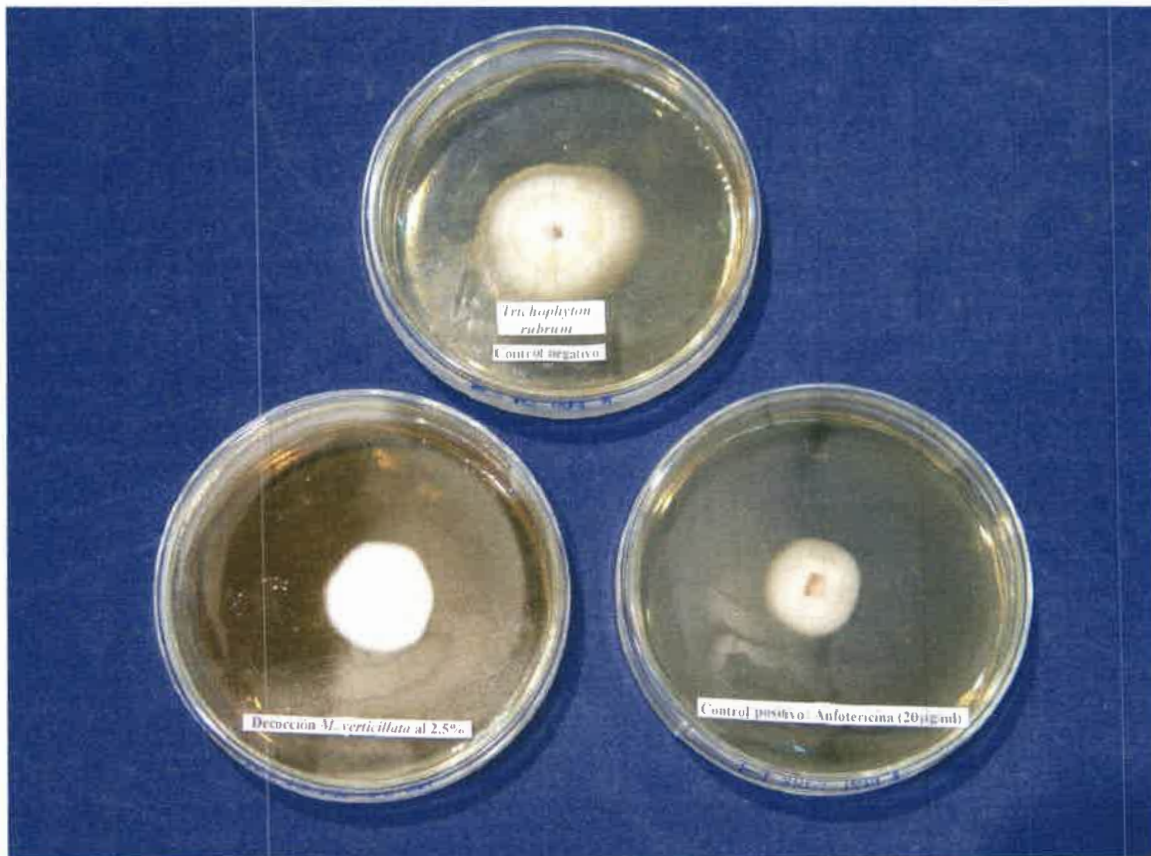


Figura 4: Efecto de la decocción de *Minthostachys verticillata* frente a *Trichophyton rubrum* c.r.: a- control negativo (sin tratar), b- decocción (34,5mg/ml) y c- control positivo (anfotericina B, 0,02mg/ml). 10 días post-siembra.



5.4- Determinación de la actividad del extracto etanólico crudo y aceite esencial de *Minthostachys verticillata* frente a hongos filamentosos de importancia clínica.

Los resultados obtenidos en este ensayo determinaron que todas las especies fúngicas estudiadas son sensibles al EEC, con valores de inhibición del desarrollo superiores al 10%, con respecto al control negativo. En relación al AE todas las especies estuvieron inhibidas en un 100%. Así también el AE demostró ser más activo que los antifúngicos convencionales, no así el EEC el cual fue activo de manera similar a los controles positivos (tabla 11).

El porcentaje de inhibición obtenido con anfotericina B no superó el 50% para la mayoría de las especies tratadas, a diferencia de lo encontrado cuando se utilizó como control en el estudio de las decocciones, donde algunas especies se inhibieron hasta en un 75% en su desarrollo. Resultados similares se obtuvieron con el antifúngico nistatina. Estas diferencias observadas entre los valores de los controles podrían deberse a las diferentes metodologías empleadas, así también como el tiempo de incubación, ya que en esta última experiencia la lectura se realizó a las 72 horas. En la primera medición del ensayo de las decocciones a los 3 días se registró menor porcentaje de inhibición de la decocción para la mayoría de las especies estudiadas.



Tabla 11: Inhibición del crecimiento fúngico de hongos filamentosos por EEC y AE de *Minthostachys verticillata*.

Especies fúngicas:	Porcentaje de inhibición del desarrollo fúngico				
	EEC (47mg/ml)	AE (229,24 mg/ml)	Anfotericina B (0,02mg/ml)	Nistatina (0,02 mg/ml)	Control negativo
<i>T. rubrum c.a.</i>	100	100	100	100	-
<i>T. rubrum c.r.</i>	20	100	20	10	-
<i>M. canis c.a.</i>	30	100	40	30	-
<i>M. canis c.r.</i>	30	100	30	30	-
<i>M. nanum c.r.</i>	30	100	30	20	-
<i>M. gypseum c.r.</i>	10	100	15	10	-
<i>T. mentagrophytes c.r.</i>	20	100	15	10	-
<i>T. terrestre (a)</i>	100	100	100	90	-
<i>A. fumigatus (a)</i>	50	100	100	-	-

EEC: extracto etanólico crudo, AE: aceite esencial, c.a.: cepa aislada recientemente; c.r.: cepa de referencia, (a): aislada de muestras animales, -: sin inhibición (desarrollo fúngico normal).

Según la National Comité for Clinical Laboratory Standards para este método de la microdilución para hongos filamentosos (M38-P), se podría determinar el valor de CIM para anfotericina B a las concentraciones más bajas capaces de producir el 100% de inhibición del desarrollo fúngico y para los azoles aquella que produzca el 50% de inhibición del crecimiento con respecto al control. Pero no se ha podido fijar aún un punto de corte definido ya que para cada especie fúngica el valor CIM encontrado fue diferente, (Canton Lacasa y col., 2001).

En cuanto a los datos bibliográficos que reportan estudios de la actividad antifúngica de diferentes plantas medicinales tampoco establecen cual es el porcentaje de inhibición a partir del cual debería considerarse activo al componente vegetal estudiado frente a los hongos. Razón por la cual se decidió enfrentar nuevamente a todas las especies fúngicas al EEC y AE para la determinación de valores de CIM para cada especie. En la determinación de los valores CIM se enfrentaron diluciones seriadas factor 2 de EEC y AE.



5.5- Determinación de CIM del extracto etanólico crudo de *Minthostachys verticillata* frente a hongos filamentosos de importancia clínica.

Los porcentajes de inhibición del desarrollo fúngico de los hongos filamentosos obtenidos cuando se los enfrentó al EEC se muestran en la tabla 12. Como puede observarse los valores de CIM variaron en las distintas cepas ensayadas. Los máximos valores de inhibición obtenidos con el EEC fueron idénticos a los obtenidos para los controles positivos. Si bien el EEC no logró inhibir el 100% del crecimiento fúngico, podría de todas maneras tener la misma utilidad que los antifúngicos anfotericina B y nistatina.

Las imágenes obtenidas por microscopia de estos resultados para *Trichophyton rubrum* c.a., se muestran en la figura 5.

Pudo determinarse entonces valores de CIM de 0,74 mg/ml para *T. rubrum* c.a., se obtuvo CIM de 3 mg/ml para *M. canis* c.r. y *T. terrestre*, un valor de 6 mg/ml para *T. rubrum* c.r., *M. nanum* y *M. gypseum*, 12 mg/ml para *T. mentagrophytes* y de 24 mg/ml para las especies de *M. canis* c.a. y *A. fumigatus*.

Trichophyton rubrum c.a. y *T. terrestre* fueron las cepas que a una concentración mayor a la de la CIM fueron inhibidas en un 100% al igual que los controles positivos, por lo que este extracto, como se mencionó anteriormente, en estos casos podría ser utilizado como fitofármaco natural.

De todas las especies estudiadas *T. rubrum* c.a. aislado recientemente en la región, fue la que demostró ser más sensible al EEC, con un CIM de 0,74 mg/ml. Se conoce que 0,88 mg/ml del EEC de *M. verticillata* es el valor de la máxima concentración no citotóxica, (Astesano, 2002), puede determinarse entonces el IT con el valor de CIM obtenido frente a *T. rubrum* c.a.. Este valor corresponde a 1,19 y aunque se encuentre en el límite favorable, puede considerarse que el EEC de *M. verticillata* sería efectivo para el tratamiento de las micosis producidas por *T. rubrum* como así también selectivo en su toxicidad.

Como el valor de IT resultó mayor a 1 para *T. rubrum* c.a. se buscó determinar la concentración fungicida del EEC. Los resultados obtenidos



mostraron que 6 mg/ml y 12 mg/ml del EEC inhibieron fuertemente el desarrollo fúngico, pero no eliminó a esta especie completamente, por lo que se consideran fungiestáticas frente a *T. rubrum* c. a.. La concentración de 24 mg/ml fue letal para esta cepa fúngica, debido a que se vio inhibido en un 100% su crecimiento, comportándose así como fungicida para dicha cepa.

Por los valores de CIM obtenidos en el género *Microsporum* frente al EEC no sería fungicida pero si es importante destacar que este extracto vegetal fue tan activo como los antifúngicos anfotericina B y nistatina frente a las especies evaluadas de este género. Esta homogeneidad no se observó en las especies del género *Trichophyton* ensayadas.

Los resultados obtenidos en este estudio con el EEC frente a hongos filamentosos, se correlacionan con varios trabajos realizados con extractos alcohólicos de otras plantas medicinales. En general estos extractos no presentan gran actividad frente a hongos filamentosos, y cuando ejercen esta acción se obtienen valores de CIM de 0,5 a 1 mg/ml y en varias ocasiones mayores concentraciones, (Navarro García et al., 2003; Feresin et al. 2001; Dabur et al, 2004), valores en los cuales se encuentran las especies aquí evaluadas, especialmente para *T. rubrum* c.a.,. Las diferencias encontradas en las CIM para ambas cepas de *T. rubrum*, esto es 0,74 mg/ml y 6 mg/ml, concuerdan con los datos obtenidos por otros investigadores que enfrentaron a 4 cepas de *T. rubrum* a un mismo extracto alcohólico de otro vegetal, obteniendo valores de CIM que variaron entre 4 mg/ml y 32 mg/ml y solo frente a una cepa no fue activo, (Camacho Hernández et al. 2002).



Al utilizar etanol como solvente de extracción de compuestos activos, se obtienen fracciones ricas en taninos, polifenoles, poliacetilenos, flavonoles, terpenoides, esteroides y alcaloides. Estos compuestos químicos serían activos contra constituyentes de la célula fúngica y actuarían alterando principalmente las proteínas y algunos reaccionarían con grupos lipofílicos de la membrana desestabilizándola, en el caso de los alcaloides se unen al ácido nucleico. Se puede por esto inferir que la actividad del EEC de *M. verticillata* frente a estos hongos filamentosos podría deberse a la acción de estos compuestos químicos obtenidos a partir del vegetal.

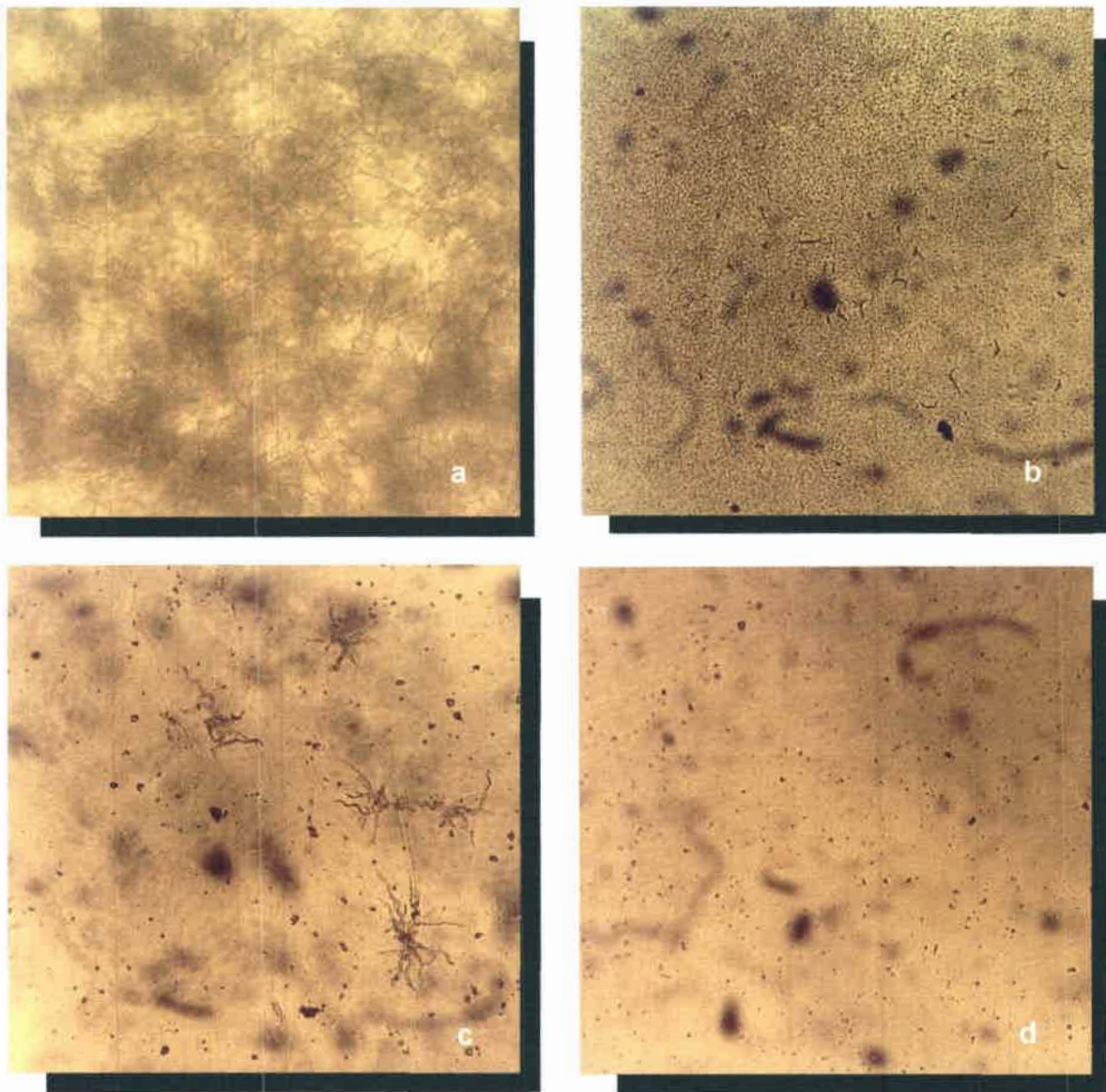


Figura: 5: Inhibición del desarrollo fúngico de *Trichophyton rubrum* c.a. frente a EEC de *Minthostachys verticillata*. a- control negativo (sin tratar), b- control positivo (anfotericina B 0,02mg/ml), c- tratado con 5,94mg/ml y d- tratado con 11,87mg/ml. 3 días post-tratamiento



Tabla 12: Inhibición del crecimiento de hongos filamentosos por EEC de *M. verticillata*

Especies fúngicas	Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico producido por distintas concentraciones del EEC (mg/ml)								Anfotericina B 0,02mg/ml	Nistatina 0,02mg/ml	Control negativo
	47,5	23,75	11,87	5,94	2,97	1,48	0,74	0,37			
<i>T. rubrum c.a.</i>	100	100	100	70	60	30	10	-	100	100	-
<i>T. rubrum c.r.</i>	20	15	10	5	-	-	-	-	20	10	-
<i>M. canis c.a.</i>	30	20	-	-	-	-	-	-	40	30	-
<i>M. canis c.r.</i>	30	20	15	15	5	-	-	-	30	30	-
<i>M. nanum c.r.</i>	30	25	20	5	-	-	-	-	30	20	-
<i>M. gypseum c.r.</i>	10	15	15	15	-	-	-	-	15	10	-
<i>T. mentagrophytes c.r.</i>	20	7	5	-	-	-	-	-	15	10	-
<i>T. terrestre (a)</i>	100	100	100	50	5	-	-	-	100	100	-
<i>A. fumigatus (a)</i>	50	40	-	-	-	-	-	-	100	65	-

EEC: extracto etanólico crudo, c.r.: cepa de referencia, c.a.: cepa aislada en humanos
(a): aislada de muestra animales, -: sin inhibición (desarrollo fúngico normal).



5.6- Determinación de CIM del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* frente a hongos filamentosos de importancia clínica.

Como se puede observar en la tabla 13, el AE de *Minthostachys verticillata* mostró tener una fuerte actividad antifúngica. Esta actividad demostró ser más efectiva cuando se comparó con los controles positivos. A valores de 1,79 mg/ml, el AE inhibió fuertemente el desarrollo fúngico de la mayoría de las especies ensayadas, solo *T. rubrum* c.r. fue menos sensible con un 20% de inhibición de crecimiento a la misma concentración. Así mismo resultó, para dicha especie, más efectivo que nistatina. En el caso de las dos cepas de *M. canis* analizadas, ambas resultaron igualmente sensibles a las distintas concentraciones del AE observándose que la cepa de referencia fue más sensible a los controles positivos.

Cuando el AE estuvo a una concentración de 1,79 mg/ml la mayoría de las especies fúngicas aquí ensayadas demostraron un porcentaje de inhibición mayor o igual al 60%, por lo que se supone que dos veces más diluido, podría detectarse también actividad frente a estos agentes patógenos. En cuanto al valor del CIM en este estudio fue de 1,79 mg/ml para todas las especies probadas, presentando un 100% de inhibición a esta concentración para la especie de *T. terrestre*, aislada de muestra animal.

Las imágenes obtenidas por microscopia de este ensayo frente a *M. gypseum* se muestran en la figura 6.

La máxima concentración no citotóxica del AE de *M. verticillata* determinada en células mamíferas Vero es de 0,68 mg/ml, valor que se toma para calcular el IT. Para este caso, como todas las especies fueron ensayadas hasta la dilución cuya concentración fue de 1,79 mg/ml, valor del CIM, el IT no sería el adecuado para recomendar a este AE como fitofármaco debido a que la concentración efectiva sería mayor que la tolerada por el huésped que recibirá el tratamiento. Sin embargo se observó que a esta concentración el AE inhibe más del 60% del crecimiento de la mayoría de las especies. Esto nos llevaría a sugerir que a 2 diluciones sucesivas se alcanzaría una concentración de AE de 0,45 mg/ml y se produciría también la inhibición del crecimiento



fúngico. Por lo tanto se podría recomendar al AE de *M. verticillata* para el tratamiento natural de las micosis producidas por estos patógenos.

Se determinó la capacidad fungicida o fungiestática de AE, y se observó que la concentración de 14,33 mg/ml resultó fungicida frente a *M. gypseum* y las dos cepas de *M. canis*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* c.r. Para *T. terrestre* la concentración fungicida fue de 3,5 mg/ml, siendo de 7 mg/ml para *Aspergillus fumigatus* y *T. rubrum* c.a.

Otras investigaciones realizadas con AE de *Ocimum tenuiflorum* mostraron valor de CIM en 0,15 mg/ml para *M. canis*, 1,25 mg/ml para *T. rubrum*. En el caso del AE de *Pimenta dioica* L. una CIM de 0,31 mg/ml para *M. canis*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. En la especie vegetal *Ocimum gratissimum* el valor de CIM para estas últimas tres especies fúngicas fue de 0,62 mg/ml, (Rhaman, 1999). Otros estudios realizados con AE de *Thymus vulgaris* L., *Mentha virialis* y *Ocimum basilicum* L. miembros de la familia *Labiatae*, cuando se enfrentó a *Aspergillus flavus*, arrojaron los valores de CIM de 0,125 mg para *T. vulgaris* L. y de 0,5 mg para los dos vegetales restantes, (Soliman and Badeaa, 2002). Los resultados obtenidos de este estudio no resultan dispares con nuestra experiencia, especialmente si se considera a la menor concentración del AE de *M. verticillata* ensayada, donde la mayoría de las especies fúngicas resultaron inhibidas en más del 60% en su crecimiento, por lo que resultarían también efectivos en la cercanía del 50% de inhibición cuando se consideraría una dilución mayor.



La mayoría de los AE están constituidos principalmente por terpenos, oxigenados e hidrogenados. En el AE de *M. verticillata* pulegona, mentona, limoneno, cineol, α -pineno y β -pineno son los componentes mayoritarios. Estos terpenos serían los que tienen la actividad antifúngica probablemente por desestabilizar la membrana fúngica al alterar los componentes lipofílicos de la misma. Así también podrían estar modificando los canales de iones calcio, las enzimas, afectando de esta manera la viabilidad de la célula fúngica, (Cowan M, 1999). Es de destacar que este efecto se potencia a medida que se aumenta la concentración del AE, por lo que en este caso hay una relación dosis-respuesta.

De todos los AE de especies vegetales estudiadas hasta el momento, la que virtualmente es atóxica es la menta por lo que se utiliza con fines alimenticios y terapéuticos, (Alonso J., 2002). Esto hace promisorio el postular al AE de *M. verticillata* como fitofármaco para el tratamiento de las micosis superficiales, especialmente para las especies más frecuentes en la región sur de la provincia de Córdoba. De acuerdo también a estos resultados podría considerarse el tratamiento de micosis oportunistas y dermatofitias animales producidas por *A. fumigatus* y *T. terrestre*.



Tabla 13: Inhibición del crecimiento de hongos filamentosos por el AE de *M. verticillata*

Especies fúngicas	Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico producido por distintas concentraciones del AE (mg/ml):									Anfotericina B 0,02mg/ml	Nistatina 0,02mg/ml	Control negativo
	229,24	114,62	57,31	28,65	14,33	7,16	3,58	1,79				
<i>T. rubrum c.a.</i>	100	100	100	100	100	100	90	80	90	90	-	
<i>T. rubrum c.r.</i>	100	100	100	100	100	50	30	20	80	10	-	
<i>M. canis c.a.</i>	100	100	100	100	100	100	90	60	80	80	-	
<i>M. canis c.r.</i>	100	100	100	100	100	100	90	60	90	90	-	
<i>M. nanum c.r.</i>	100	100	100	100	100	95	90	80	100	80	-	
<i>M. gypseum c.r.</i>	100	100	100	100	90	70	50	40	60	10	-	
<i>T. mentagrophytes c.r.</i>	100	100	100	100	100	95	90	80	80	50	-	
<i>T. terrestre (a)</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	-	
<i>A. fumigatus (a)</i>	100	100	100	100	100	100	90	70	100	50	-	

AE: aceite esencial, c.r.: cepa de referencia, c.a.: cepa aislada en humanos (a): aislada en animales, -: desarrollo fúngico normal.

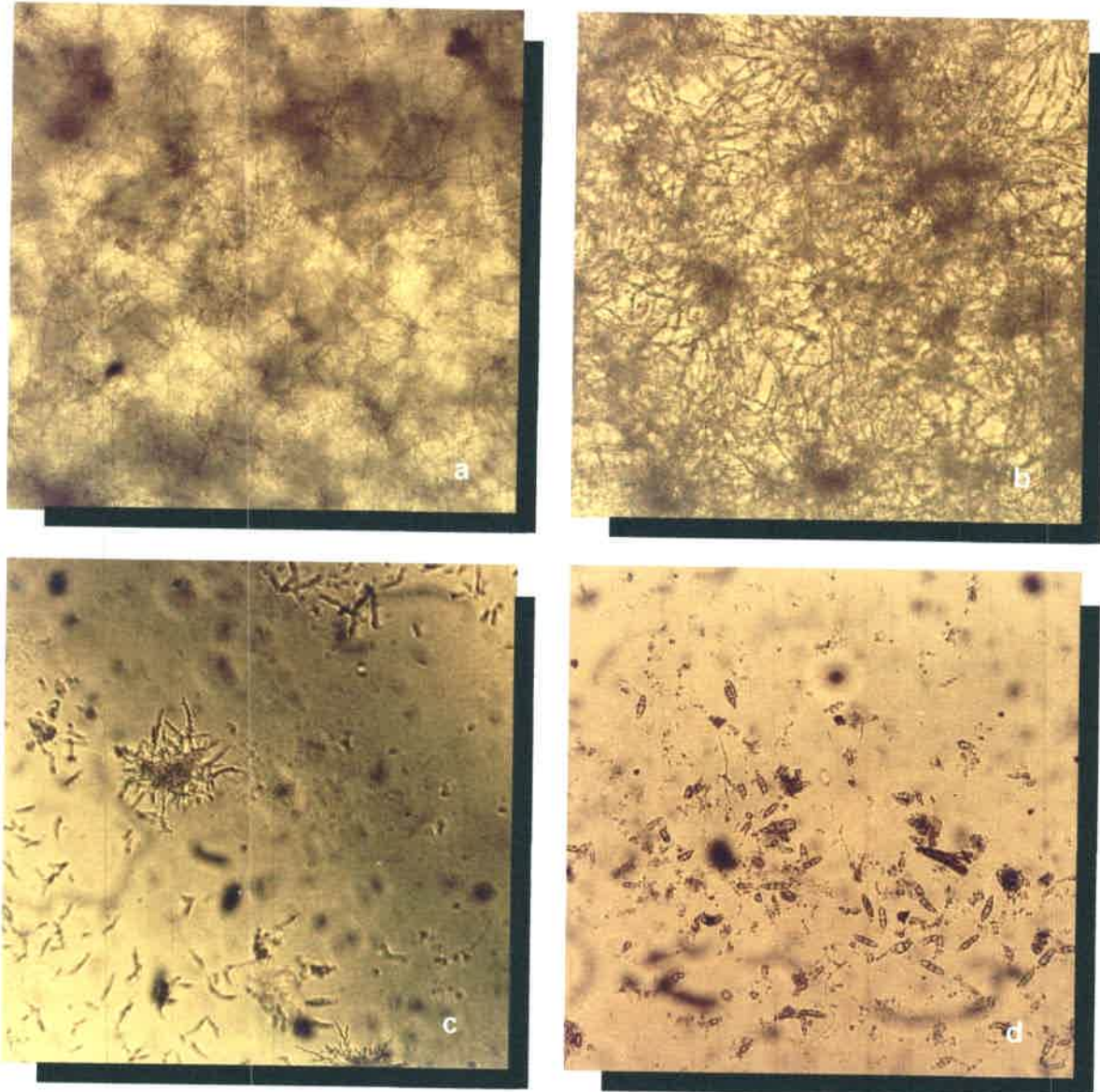


Figura 6: Inhibición del desarrollo fúngico de *Microsporium gypseum* frente al AE de *Minthostachys verticillata*: a- control negativo (sin tratar), b- control positivo (anfotericina B 0,02mg/ml), c- tratado con AE a 7,16mg/ml y d- tratado con AE a 28,65mg/ml. 3 días post-tratamiento



5.7- Determinación de CIM de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* frente a hongos filamentosos.

Los resultados obtenidos por cromatografía gaseosa realizada con el AE, mostraron la presencia de α -pineno, β -pineno, limoneno, cineol, mentona y pulegona como constituyentes mayoritarios. Considerando la fuerte actividad que presenta este AE frente a hongos filamentosos, se procedió a determinar la actividad de los tres componentes más abundantes presentes en el AE frente a las especies de *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum* aisladas en la región. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 14 y 15.

Comparando las susceptibilidades de las especies ensayadas, *M. canis* resultó ser más sensible a la concentración de mentona y limoneno probadas, con CIM de 0,87 mg/ml y 0,65 mg/ml respectivamente. En el AE se encuentra un 35% de mentona y 1,8% de limoneno, sin embargo no reveló que estos porcentajes de actividad se sumaran para que *M. canis* resulte más inhibido frente al aceite. Pulegona el componente más abundante (52%) también presentó mayor actividad frente a *Trichophyton rubrum*.

Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico de pulegona, mentona y limoneno frente a *M. canis* y *T. rubrum* aisladas de casos clínicos recibidos en el Hospital Regional de Río Cuarto durante el año 2003. Frente a pulegona (el componente más abundante en el AE), ambas especies fúngicas fueron inhibidas un 80%, a una concentración de 0,93 mg/ml. Este valor igualó al de los controles positivos.

Las imágenes obtenidas por microscopia de la actividad de pulegona frente a *T. rubrum* c.a. se muestran en la figura 7.

En la tabla 16 se observan los porcentajes de inhibición del desarrollo fúngico de *M. canis* c.a. y *T. rubrum* c.a. frente al AE y sus componentes mayoritarios. La inhibición ejercida por el AE tiene un fuerte efecto de pulegona probablemente porque esta representa el 52% del AE, y el menor efecto es causado por mentona y limoneno (35% y 1,8% del AE, respectivamente). Sin embargo pulegona en estado puro produjo un porcentaje de inhibición mayor que el AE, probablemente algún tipo de antagonismo se genere entre los



componentes presentes en la mezcla que redunde en un menor efecto inhibitorio del AE. O bien, actuarían también otros componentes minoritarios del AE disminuyendo la actividad de estos terpenos, logrando posiblemente que estos compuestos mayoritarios no tengan efecto aditivo en la mezcla en la que se encuentran en el AE.

La máxima concentración no citotóxica de pulegona, mentona y limoneno fueron 0,06 mg/ml, 0,4 mg/ml y 0,25 mg/ml, respectivamente; estos valores fueron determinados en células Vero por Vogt, (2004). Teniendo en cuenta estas concentraciones y las CIM obtenidas para cada componente frente a las dos especies fúngicas evaluadas, se deduce que el IT no sería el adecuado para recomendar a estos compuestos químicos puros para la aplicación terapéutica. Sin embargo pulegona resultó ser la más abundante y efectiva, ya que a una concentración de 0,93 mg/ml produjo un 80% de inhibición, probablemente diluida a una concentración inferior de 0,06 mg/ml podría resultar en un IT adecuado.

Si se realiza la sumatoria de la máxima concentración no citotóxica de cada componente mayoritario resulta un valor de 14 mg/ml, mayor que la del AE por lo que al estar combinados en el AE estos componentes antagonizarían también en su capacidad citotóxica. Por lo que resulta entonces más valorable la actividad antifúngica del AE que de los componentes mayoritarios por separado.



Tabla 14: Inhibición del crecimiento de *Trichophyton rubrum* c.a. por mentona, pulegona y limoneno.

Concentración (mg/ml)	Inhibición (%)	Concentración (mg/ml)	Inhibición (%)	Concentración (mg/ml)	Inhibición (%)
Mentona:		Pulegona:		Limoneno:	
111,63	100	118,66	100	105	100
55,81	100	59,33	100	42	100
27,90	100	29,66	100	21	95
13,95	90	14,83	100	10,5	90
6,97	80	7,42	100	5,25	50
3,48	40	3,71	100	2,62	20
1,74	20	1,85	100	1,31	10
0,87	-	0,93	80	0,65	-
Anfot. B*	70	Anfot. B*	70	Anfot. B*	70
Nistatina*	60	Nistatina*	60	Nistatina*	60
Control Neg.	-	Control Neg.	-	Control Neg.	-

*: 0,02mg/ml, -: desarrollo fúngico normal



Tabla 15: Inhibición del crecimiento de *Microsporium canis* c.a. por mentona, pulegona y limoneno.

Concentración (mg/ml)	Inhibición (%)	Concentración (mg/ml)	Inhibición (%)	Concentración (mg/ml)	Inhibición (%)
Mentona:		Pulegona:		Limoneno:	
111,63	100	118,66	100	105	100
55,81	100	59,33	100	42	100
27,90	100	29,66	100	21	95
13,95	95	14,83	100	10,5	90
6,97	90	7,42	100	5,25	80
3,48	40	3,71	100	2,62	20
1,74	30	1,85	100	1,31	10
0,87	20	0,93	80	0,65	5
Anfot. B*	80	Anfot. B*	80	Anfot. B*	80
Nistatina*	80	Nistatina*	80	Nistatina*	80
Control Neg.	-	Control Neg.	-	Control Neg.	-

*: 0,02mg/ml, -: desarrollo fúngico normal

Tabla 16: Actividad antifúngica del AE y los componentes mayoritarios frente a especies fúngicas de la región.

	<u>Inhibición del desarrollo fúngico (%):</u>	
	<i>M. canis</i> c.a.	<i>T. rubrum</i> c.a.
Aceite esencial 1,79mg/ml	60	80
Pulegona 1,85mg/ml	80	100
Mentona 1,74mg/ml	30	20
Limoneno 1,31mg/ml	5	10

c.a.: cepa aislada de casos clínico del la región sur de la provincia. de Córdoba.

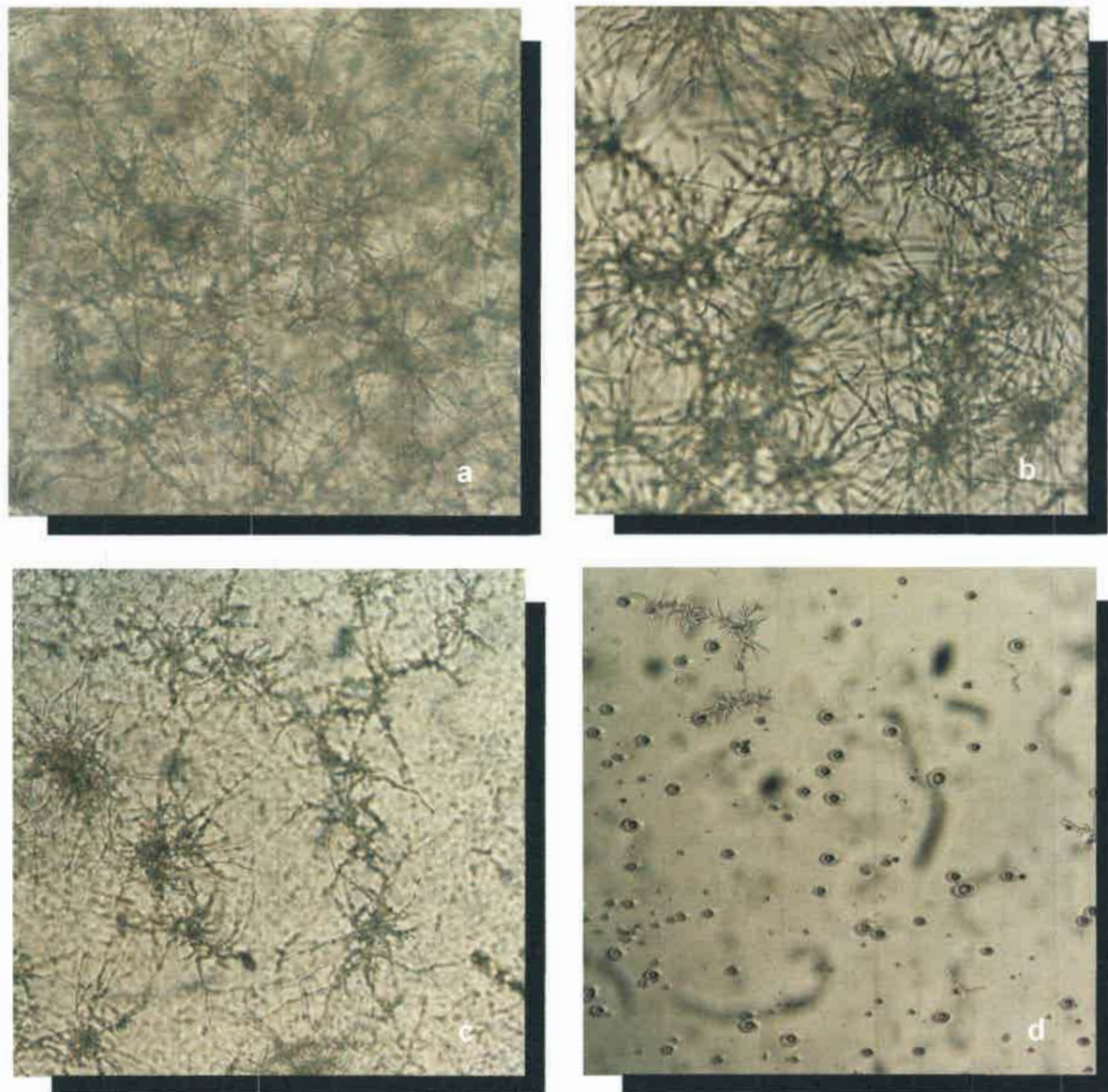


Figura 7: Inhibición del desarrollo fúngico de *Trichophyton rubrum* c.a, frente a pulegona: a- control negativo (sin tratar), b- control positivo (anfotericina B 0,02mg/ml), c- tratado con pulegona a 1,88mg/ml, d- tratado con pulegona a 3,71mg/ml. 3 días post-tratamiento.



5.8- Determinación de la actividad de la decocción de *Minthostachys verticillata* frente a levaduras de importancia clínica.

Los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de diferentes géneros levaduriformes se muestran en la tabla 17. Las dos cepas de *Candida albicans*, tanto la aislada de muestras clínicas humana como la de animal, no presentaron sensibilidad alguna y sí fueron fuertemente inhibidas por los controles positivos, al igual que el resto de las especies estudiadas. El valor de CIM obtenido para *Rhodotorula* sp. fue de 0,033 mg/ml y de 0,067 mg/ml para *Cryptococcus neoformans*. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados con decocciones de plantas medicinales de la Amazonia Peruana a los que *C. albicans* fue resistente, (Mongelli y col., 1995).

Estos patógenos adquirieron más importancia en las últimas décadas donde el número de pacientes inmunodeprimidos aumentó considerablemente. Entre las lesiones que pueden causar estos agentes de micosis oportunistas están las producidas por levaduras del género *Rhodotorula* que causan afecciones pulmonares, renales, pudiendo dar hasta endocarditis y afectar además el sistema nervioso central. *C. neoformans*, es el agente causal de la criptococcosis pulmonar y luego se disemina al sistema nervioso central, los huesos y la piel, por lo que resulta frecuentemente mortal, (Negróni and Negróni, 1988; López Martínez y col., 1995). Por esto resulta de interés calcular el valor del IT para las levaduras que muestran sensibilidad para esta fracción vegetal.

La máxima concentración no citotóxica de la decocción de *M. verticillata* fue de 7 mg/ml, determinada en células Vero. Los valores de IT fueron 212 para *Rhodotorula* sp. y 104 para *C. neoformans*. Estos resultados sugieren que la decocción de *M. verticillata* tiene una fuerte actividad antifúngica frente a 2 especies levaduriformes, con una alta selectividad de acción, que la vuelve más promisoría en postular a la misma como fitofármaco. Más aun cuando se tiene en cuenta que el tratamiento de estas patologías, en especial de la criptococcosis, se torna complicado ya que los antifúngicos convencionales



disponibles no dan resultados totalmente satisfactorios y su aplicación por vía sistémica ha sido restringida por su alta toxicidad, (Alonso Vargas R., 2000).

Solo en el caso de *C. neoformans*, que resultó inhibido a la más alta concentración de la decocción en un 100% de su desarrollo, se realizó el cultivo posterior en ASG del inóculo expuesto al tratamiento, su crecimiento fue un 5% con respecto al control negativo, por lo que se considera que la decocción de 1, 07 mg/ml tendría una acción fungiestática para esta especie patógena.

Se conoce que esta fracción vegetal es rica en polipéptidos, almidón y lectinas, entre otros componentes. Estos componentes aparentemente actúan generando canales iónicos en la membrana de las levaduras o alterando las proteínas de la membrana celular, (Cowan M., 1999). Generando de esta manera la inhibición del desarrollo fúngico de estas especies sensible a la decocción de *M. verticillata*, acción que no se lograría en las cepas de *C. albicans*.



5.9- Determinación de la actividad del extracto etanólico crudo de *Minthostachys verticillata* frente a levaduras de importancia clínica.

Los resultados obtenidos del EEC frente a levaduras de importancia clínica se muestran en la tabla 18. Como se puede observar, al igual que frente a la decocción, las cepas menos sensibles fueron las de *Candida albicans*, con valores de CIM de 47,5 mg/ml y 12 mg/ml para las cepas aisladas de muestras clínicas humanas y animal, respectivamente. Es de destacar que todas las especies ensayadas resultaron inhibidas en un 100% por anfotericina B y nistatina. *C. neoformans* fue la especie más fuertemente inhibida por esta fracción vegetal, seguida por *Rhodotorula* sp. Fue determinada una CIM de 0,74 mg/ml para las dos especies, la menor concentración del extracto estudiada en este ensayo.

Comparando con estudios llevados a cabo por otros investigadores con extracto de plantas medicinales de Camerún, donde la CIM para *C. albicans* fue de 2 mg/ml, hubo diferencias con el determinado para esta misma especie frente al extracto de *M. verticillata*, donde *C. albicans* resultó ser menos inhibida, (Ngono Ngane et al., 2000). La mayoría de los estudios realizados con extractos alcohólicos de diferentes plantas medicinales en nuestro país y el resto del mundo, demuestran que son poco efectivos para *C. albicans*, (Penna et al., 2001; Rojas et al., 2003; Jones et al., 2000).

El valor CIM obtenido en este ensayo para *C. neoformans*, 0,74 mg/ml, resultó ser levemente superior a la CIM de 0,60 mg/ml encontrado con extracto de *Baccharis grisebachii*, planta medicinal Argentina, (Feresin, et al., 2001). Se observó que los extractos alcohólicos o los obtenidos con otros solventes de diferentes plantas medicinales, en su mayoría no son efectivos frente a este patógeno como también ocurre con *C. albicans*. Esto aumenta el interés por determinar el IT para el EEC de *M. verticillata* frente a *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp. La máxima concentración no citotóxica del EEC de *M. verticillata* fue de 0,88 mg/ml, y la CIM para estas especies levaduriformes fue 0,74 mg/ml, resultando un IT de 1,19; se sugiere que este valor mejoraría si se expusieran dichos patógenos a una concentración menor del EEC, ya que



resultaron inhibidas en un 40% y 50% para *Rhodotorulla* sp. y *C. neoformans*, respectivamente. Aunque el IT se encuentra en el límite de lo esperado resulta interesante postular a este extracto como tratamiento alternativo para las micosis oportunistas que estos agentes pueden causar.

Se realizó la siembra en ASG del inóculo tratado con EEC y que produjo una fuerte inhibición del desarrollo de las especies *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp. El desarrollo de estas levaduras no se inhibió totalmente, observándose que este extracto resulta fungiestático a las concentraciones expuestas frente a los patógenos. Es de destacar que el crecimiento de *Rhodotorula* sp., previamente expuesta a 7,16 mg/ml fue estar escasamente pigmentado; se pudo determinar que el EEC altera el metabolismo de esta levadura aunque no alcanza a inhibir completamente su desarrollo.

Los componentes mayoritarios presentes en el EEC son taninos, polifenoles, flavonoles, terpenoides, esteroides y alcaloides entre otros. Estos componentes tienen aparente capacidad de alterar las proteínas y de formar complejos con ellas. En el caso de los flavonoides lipofílicos alterarían los lípidos de membrana, siendo los alcaloides los que jugarían un rol con el ácido nucleico ya que se intercala en el ADN, estos eventos provocarían una desestabilización de los constituyentes celulares de las levaduras sensibles a este extracto.



5.10- Determinación de la actividad del aceite esencial de *M. verticillata* frente a levaduras de importancia clínica.

En la tabla 19 se expresan los valores porcentuales de inhibición del crecimiento de las levaduras de importancia clínica.

Candida albicans resultó más sensible al AE que a las otras preparaciones vegetales, la CIM para ambas cepas fue de 7,16 mg/ml. Para *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp. la CIM fue de 0,22 mg/ml. Todas las especies estudiadas resultaron inhibidas en el 100% de su crecimiento por anfotericina B y nistatina.

Otros ensayos informados en la literatura involucran el estudio de aceites esenciales de otras plantas frente a levaduras, con diferentes metodologías de ensayo. Esto hace difícil la comparación de nuestros resultados con los de otros investigadores. A pesar de esto, se pudo determinar que *C. albicans* es sensible a la mayoría de los AE de diversas plantas medicinales con valores de CIM que variaron de 1,5 μ g a 3 μ g de AE de diferentes vegetales de Turquía, cuando se trabajó con la prueba de difusión en disco, (Bagei and Drigak, 1996). El AE de *M. verticillata* resultó menos efectivo para *C. albicans* que los mencionados en dicho estudio.

Teniendo en cuenta que la máxima concentración no citotóxica del AE de *M. verticillata*, determinada en células Vero es de 0,68 mg/ml y la CIM para *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp. es de 0,22 mg/ml, el valor del IT es de 3,09; un valor mayor al obtenido para estas mismas especies con el EEC del vegetal en estudio. Por lo que el aceite esencial de *M. verticillata* promete ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento de las micosis oportunistas producidas por estos agentes fúngicos.

Cuando se extrajo un inóculo de las levaduras expuestas al aceite esencial y se sembró en ASG, solo la cepa de *C. albicans* aislada de animales y enfrentada a una concentración de 7,16 mg/ml de AE y *Rhodotorula* sp. expuesta a 1,79 mg/ml no lograron iniciar su desarrollo, por ello tales concentraciones ejercieron una acción fungicida. *C. neoformans* resultó inhibido en un 99% de su crecimiento con respecto al control, a una



concentración de 7,16 mg/ml de AE, por lo que podría considerarse un buen fungicida para estas especies, como lo consideran algunos autores MCF₉₀: mínima concentración fungicida capaz de matar el 99,9% el inóculo (Hammer et al., 1998). En el caso de la cepa de *C. albicans* aislada en humanos tratadas con una concentración de 7,16 mg/ml, solo se vio inhibido un 90% su crecimiento con respecto al control cuando se sembró la levadura tratada en ASG, por lo que resultaría esta concentración fungiestática.

Los aceites esenciales están constituidos principalmente por terpenos y terpenoides como se mencionó anteriormente. La acción de los terpenos no está aún bien dilucidada pero se presume que actuarían desestabilizando los compuestos lipofílicos de la membrana, modificando los canales de iones calcio, al interactuar con la membrana con sus propiedades fisicoquímicas influyendo también sobre las enzimas y receptores celulares, (Cowan M., 1999).

Tabla 17: Inhibición del crecimiento de levaduras frente a la decocción de *Minthostachys verticillata*.

Especies fúngicas:	Inhibición del crecimiento fúngico (%)							Anfot. B*	Nistat.*	Control Neg.
	Decocción (mg/ml):									
	1,07	0,53	0,27	0,13	0,067	0,033	0,017			
<i>C. albicans</i> (h)	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-
<i>C. albicans</i> (a)	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-
<i>C. neoformans</i> (a)	100	60	50	45	40	-	-	100	100	-
<i>Rhodotorula</i> sp. (a)	50	40	35	30	25	20	-	100	100	-

*: 0,02mg/ml, (h): aislado de muestra humana, (a): aislado de muestra animal, -: sin inhibición (desarrollo fúngico normal)



Tabla 18: Inhibición del crecimiento de levaduras frente al EEC de *Minthostachys verticillata*.

Especies fúngicas:	Inhibición del crecimiento fúngico (%)							Anfot. B*	Nistat.*	Control Neg.
	EEC (mg/ml):									
	47,5	23,75	11,87	5,94	2,97	1,48	0,74			
<i>C. albicans</i> (h)	30	-	-	-	-	-	-	100	100	-
<i>C. albicans</i> (a)	50	30	10	-	-	-	-	100	100	-
<i>C. neoformans</i> (a)	100	100	100	100	100	60	50	100	100	-
<i>Rhodotorula sp.</i> (a)	100	100	80	60	50	45	40	100	100	-

*: 0,02mg/ml, (h): aislado de muestra humana, (a): aislado de muestra animal, -: sin inhibición (desarrollo fúngico normal)

Tabla 19: Inhibición del crecimiento de levaduras frente al AE de *Minthostachys verticillata*.

Especies fúngicas	Inhibición del crecimiento fúngico (%)						Anfot. B*	Nistat.*	Control Neg.
	AE (mg/ml):								
	7,16	3,58	1,79	0,89	0,45	0,22			
<i>C. albicans</i> (h)	100	80	40	-	-	-	100	100	-
<i>C. albicans</i> (a)	100	100	40	-	-	-	100	100	-
<i>C. neoformans</i> (a)	100	100	100	85	50	40	100	100	-
<i>Rhodotorula sp.</i> (a)	100	100	100	90	60	50	100	100	-

*: 0,02mg/ml, (h): aislado de muestra humana, (a): aislado de muestra animal, -: sin inhibición (desarrollo fúngico normal).



5.11- Discusión

Las micosis superficiales y oportunistas son consideradas como las infecciones más frecuentes que se producen en el hombre y los animales. En los últimos años han adquirido mayor importancia debido a que con los avances de la medicina se logró que pacientes con patologías crónicas puedan mejorar sus condiciones y calidad de vida, generando esto un aumento en el número de pacientes que requieren de cuidados intensivos y un alto número de personas inmunocomprometidas por infecciones como el HIV. Esto ha conducido que los casos de micosis aumenten, principalmente las micosis oportunistas. El problema lo generan aquellas cepas fúngicas que son resistentes a drogas convencionales y la disponibilidad reducida de drogas antifúngicas que sean efectivas y de toxicidad baja.

Las micosis superficiales son las más frecuentes en el hombre, según la OMS el 20% de la población mundial padece de estas micosis. Los principales agentes causales son *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* con diferentes localizaciones en el organismo, (Davel y col., 1999).

A partir de las 23 muestras clínicas obtenidas en la región sur de la provincia de Córdoba se aislaron e identificaron: *Trichophyton. rubrum* (75%) y *Microsporum canis* (25%) a partir de las 8 muestras que resultaron positivas en el cultivo. La mayoría de las especies de *T. rubrum* se aislaron de uñas principalmente y *M. canis* tanto de piel lisa como de cuero cabelludo. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de estos patógenos en función del sexo.

La recuperación de las muestras en cultivo fue mucho menor que las que fueron diagnosticadas como positivas al examen directo, esto está en relación a lo esperado dado que en la anamnesis mayoría de los pacientes adultos reconocen la automedicación o autotratamiento. Las lesiones en piel lisa se encontraron principalmente en niños, y las especies aisladas fueron *M. canis* y *T. rubrum*; por lo que podemos inferir que la fuente de infección podrían ser el contacto directo con los animales domésticos o la tierra ya que estas especies son geófilas y zoófilas. En los adultos la mayoría de las



muestras fueron obtenidas de uñas de donde se pudo aislar a la especie *T. rubrum*.

Cuando se determinó la frecuencia de estos patógenos en el período de un año, mientras duró el muestreo, podemos sugerir que el clima de la región fue la característica más notable a considerar, en los meses de primavera el porcentaje de humedad ambiental se encontró por debajo de los registros normales para dicha estación en esta región, lo que llevó probablemente a la menor disponibilidad de casos clínicos detectados en el Hospital.

La colecta de *M. verticillata* se realizó en el mes de febrero del 2003, y a partir de ella se realizó el análisis de la actividad antifúngica de la decocción, EEC y AE. En el caso del AE su composición se analizó por cromatografía gaseosa pudiendo identificar como componentes mayoritarios a α -pineno, β -pineno, limoneno, cineol, mentona y pulegona en este orden de elusión. Se detectó un rendimiento del 9% (ml/100grde hierba seca), valor que estuvo en el doble del obtenido con muestras del mismo vegetal pero colectado el mes de abril. La densidad obtenida fue de 917 mg/ml, mucho mayor a la de 8,5 mg/ml calculada para la misma muestra obtenida en el mes de abril, determinada por Astesano A., (2002). La relación pulegona /mentona en la muestra analizada en este estudio fue de 1,5, relación en la que el porcentaje de mentona se encuentra aumentado coincidente con la floración del vegetal.

La decocción de *M. verticillata* ensayada frente a las especies aisladas de *T. rubrum* y *M. canis* no inhibió completamente su desarrollo, pero logró superar el porcentaje de inhibición producido por los antifúngicos nistatina y anfotericina B. En la evaluación de los resultados de las otras especies pertenecientes a los géneros *Trichophyton* y *Microsporium* no se encontraron diferencias entre los géneros pero sí entre especies. *A. fumigatus*, agente causal de micosis oportunistas que no fue sensible a la decocción. *T. rubrum*, *M. gypseum*, *M. nanum* y *T. terrestre* resultaron sensibles a 34,5 mg/ml y 2,14 mg/ml. Frente a 1,07 mg/ml de decocción solo resultó escasamente inhibido en su crecimiento *T. rubrum* c.r., *M. gypseum* y *M. nanum*. Al comparar las tres concentraciones de decocción no se encontró una relación dosis-respuesta. Probablemente esto pudo deberse a que los componentes de estas



preparaciones se comportarían diferentes según la concentración en la que se encuentran, pudiendo ejercer entre los compuestos acciones sinérgicas o antagónicas al inhibir al patógeno como lo demostraron otros investigadores, (Lee et al., 1997; Karpouhtsis et al., 1998). El índice terapéutico obtenido para la fracción B fue de 3 y para la C de 6,5 con la seguridad de la baja toxicidad determinada "in vitro" se podría postular a esta fracción vegetal como un fitofármaco para las micosis superficiales y oportunistas que padecen el hombre y los animales producidas por estos hongos filamentosos.

Frente al EEC, de las especies fúngicas ensayadas, *T. rubrum* c.a. fue la cepa más sensible, con un valor de CIM de 0,74 mg/ml determinando un IT de 1,19, y aunque se encuentra en el límite favorable, esto indica que este EEC sería efectivo y de baja toxicidad para el tratamiento de las micosis superficiales producidas por *T. rubrum*. Esta fracción vegetal actúa como fungiestático a 11,87 mg/ml para dicha especie fúngica, cuando se ensayó frente a las otras especies filamentosas, éstas resultaron inhibidas pero no superaron el 50% de la inhibición del crecimiento. Solo frente a *T. terrestre* se logró un 100% de inhibición pero con un valor de CIM que no dio lugar a un IT favorable.

Cuando las especies fúngicas filamentosas se expusieron al AE se encontró una fuerte inhibición que fue mayor al 60% del crecimiento y a la más baja concentración ensayada de 1,79 mg/ml, por lo que esta concentración resulta ser el valor CIM para todos los hongos estudiados. A pesar de esta baja concentración del AE ensayado con alta efectividad no se obtiene un IT favorable pero se presume que a una concentración más baja también se encontraría inhibido el crecimiento fúngico en un 50% ya que en la concentración de 1,79 mg/ml la mayoría de las especies resultaron inhibidas en más de un 60%. Por lo que el AE podría comportarse como un fitofármaco potencial para el tratamiento de las micosis superficiales y oportunistas producidas por las especies fúngicas filamentosas ensayadas. Los valores de actividad obtenidos con el EEC y AE de *M. verticillata* coinciden con los datos informados en relación a los dermatofitos por otros investigadores para otros vegetales de la misma familia *Labiatae*.



Frente a los componentes mayoritarios del AE tanto *M. canis* c.a. como *T. rubrum* c.a. fueron más sensibles a la acción de pulegona, el terpeno más abundante del AE de *M. verticillata* con una CIM de 0,93 mg/ml. Frente a mentona y limoneno *M. canis* manifestó mayor sensibilidad con una CIM de 0,87 mg/ml y 0,65 mg/ml, respectivamente. Comparando la acción del AE y estos tres componentes mayoritarios en similares concentraciones se determinó que el componente del AE más efectivo es la pulegona, aunque no se observa un efecto aditivo a estos compuestos cuando están en el AE. Por lo que se sugiere que actuarían antagónicamente entre ellos, también podría ocurrir que los componentes no identificados en este ensayo disminuyan la acción de estos tres componentes mayoritarios cuando se encuentran en el AE.

En el ensayo con levaduras de importancia clínica en las micosis oportunistas frente a la decocción (2,14 mg/ml) se determinó que ésta fue escasamente efectiva frente a *Candida albicans*. Para las otras especies levaduriformes analizadas los valores de CIM obtenidos fueron 0,033 mg/ml y 0,067 mg/ml para *Rhodotorula* sp. y *C. neoformans*, respectivamente. Por lo que el IT para esta decocción fue de 212 y 104 respectivamente. Estos resultados se vuelven más interesantes si se tiene en cuenta que estas levaduras producen micosis oportunistas en pacientes inmunodeprimidos y además esta fracción vegetal demuestra muy baja toxicidad en células Vero. Postulando a la decocción como efectiva y de muy baja toxicidad para el tratamiento de las micosis causadas por estos agentes.

Cuando se enfrentaron estas levaduras al EEC las dos cepas de *C. albicans* resultaron escasamente sensibles a este extracto con CIM mayor a 12mg/ml, las levaduras restantes fueron sensibles con CIM de 0,74 mg/ml, determinándose así un IT de 1,19, valor que se aumentaría si se probara la actividad de una dilución mayor del EEC, ya que a 0,74 mg/ml *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp. fueron inhibidas en un 40% y 50%, respectivamente. Se demostró que la actividad de este extracto fue fungiestática y no fungicida frente a las especies que se inhibieron en su desarrollo en el 100% en la determinación del CIM.



El AE de *M. verticillata* inhibió el desarrollo de *C. albicans*, pero no lo suficiente para obtener un IT favorable, para las otras especies fúngicas se obtuvo una CIM de 0,22 mg/ml produciendo un IT de 3. El AE fue fungicida a la concentración de 7 mg/ml frente a *C. albicans*, cepa aislada de muestras animales y a 1,8 mg/ml frente *Rhodotorula* sp. Para *C. neoformans* la concentración de 7mg/ml inhibió el 99% del desarrollo, por lo que podría considerarse a esta concentración como fungicida, capaz de matar al 99% del inóculo, (Hammer et al., 1998). Mientras que el AE fue fungiestático para la cepa de *C. albicans*, aislada a partir de humanos.

Por lo expuesto el AE promete ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento de micosis oportunistas producidas por estas especies levaduriformes, fundamentalmente por su baja toxicidad en las células de mamíferos.

La decocción está constituida principalmente por polipéptidos, almidón y lectinas que actuarían alterando a las membranas fúngicas por la generación de canales iónicos o por la desestabilización de las mismas.

En las extracciones etanólicas se obtiene una mezcla que esta constituida principalmente por taninos, polifenoles, flavonoles, terpenoides, esteroides y alcaloides, que generarían alteración de las proteínas y en el caso de los flavonoides desestabilizarían a los lípidos de las membranas fúngicas, siendo los alcaloides los que se intercalarían en el ADN. Estos mecanismos serían los que comprometen la viabilidad de la célula y podrían llegar a ser letales en dosis altas para algunos patógenos causantes de micosis.

Los AE se caracterizan por estar constituidos principalmente por terpenos, diterpenos, triterpeno, hemiterpenos, sesquiterpenos y terpenoides, aunque no se conoce la acción de estos componentes se propone que desestabilizarían a las membranas por alteración de los componentes lipofílicos de la misma. Además modificarían los canales de iones calcio, enzimas y receptores celulares, (Cowan M., 1999). Estos posibles mecanismos jugarían un rol importante en la viabilidad de la célula fúngica tanto para los hongos filamentosos como para los levaduriformes.



Podemos concluir que las distintas fracciones ensayadas de *M. verticillata* podrían ser propuestas como fitofármacos potenciales para el tratamiento natural de las micosis superficiales y oportunistas debido a su baja toxicidad frente a células eucarióticas de mamíferos, y su efectividad frente a agentes causales de las afecciones micóticas.

Dado los resultados promisorios que se obtuvieron durante el desarrollo de este estudio sería conveniente plantear objetivos futuros como determinar la actividad del AE a concentraciones inferiores a las que fueron evaluadas, así también como determinar la composición química de la decocción y del EEC. Sería de importancia también evaluar las actividades sinérgicas o antagónicas en la mezcla de los componentes mayoritarios del AE.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

- La manifestación clínica más frecuente de micosis superficial, en esta región sur de Córdoba ha sido tinea unguium, siendo *Trichophyton rubrum* el agente aislado en todos los casos; seguido por tinea corporis y tinea capitis donde se identificó tanto a *Trichophyton rubrum* como a *Microsporum canis* como agentes causales de estas dos tineas.
- En el diagnóstico, el examen directo demostró ser más sensible que el aislamiento en cultivo.
- El análisis cromatográfico del aceite esencial de *Minthostachys verticillata*, determinó un área porcentual elevada para mentona de 35%, coincidente con el quimiotipo característico del estado de floración en la época de la colecta. Se obtuvo una relación pulegona/mentona de 1,5 propio de este quimiotipo.
- La fracción decocción de *Minthostachys verticillata* a 1,07 mg/ml resultó efectiva en la inhibición del desarrollo fúngico de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* y *Microsporum nanum*. A 2,14 mg/ml antagonizó el desarrollo fúngico de las dos cepas de *T. rubrum*, *M. gypseum*, *T. terrestre*, *C. neoformans* y *Rhodotorula* sp.
- El índice terapéutico fue de 3 para hongos filamentosos y de 104 y 212 para las levaduras *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, respectivamente, demostrando efectividad y baja toxicidad. La fracción decocción a estas concentraciones podría ser utilizada para el tratamiento de estos patógenos sin que el paciente sufra ningún daño.
- En las tres fracciones de decocción a diferentes concentraciones, no se encontró una relación dosis-respuesta.



- El extracto etanólico crudo de *Minthostachys verticillata* inhibió el desarrollo fúngico de todas las especies ensayadas con igual efectividad que los agentes antifúngicos nistatina y anfotericina B, siendo *Trichophyton rubrum* c.a., *Cryptococcus neoformans* y *Rhodotorula* sp. las especies más sensibles, con una CIM de 0,74 mg/ml y un índice terapéutico de 1,19, afirmando la posibilidad de aplicación del EEC como un fitofármaco natural.

- El aceite esencial de *Minthostachys verticillata* resultó efectivo para la inhibición del desarrollo fúngico con CIM de 1,79 mg/ml para todas las especies fúngicas filamentosas ensayadas.

- Se considera que una concentración menor del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* resultaría también efectivo y con un índice terapéutico favorable para las especies filamentosas. Por lo que puede postularse a este aceite como un posible fitofármaco para el tratamiento natural de las micosis superficiales y oportunistas causadas por *Aspergillus fumigatus*.

- Las cepas de *Candida albicans* no fueron sensibles a la decocción y al extracto etanólico crudo de *Minthostachys verticillata*, manifestando también una escasa sensibilidad al aceite esencial.

- Las especies de *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis* aisladas de la región resultaron inhibidas en su desarrollo por el extracto etanólico crudo con la misma intensidad que con otros fármacos como nistatina y anfotericina B. Frente al aceite esencial dichas especies demostraron una mayor sensibilidad como así también a los componentes químicos puros mayoritarios del aceite esencial. La especies fúngicas resultaron ser más inhibidas por pulegona a 1,85 mg/ml que con aceite esencial a 1,79 mg/ml.



- El aceite esencial de *Minthostachys verticillata* fue efectivo frente a todas las especies levaduriformes, para *Cryptococcus neoformans* y *Rhodotorula* sp. se determinó una CIM de 0,22 mg/ml, con un índice terapéutico de 3, valor muy favorable para que este aceite esencial se postule como un fitofármaco frente a las micosis oportunistas.
- La sumatoria de las actividades de pulegona, mentona y limoneno en la proporción en la que se encuentran en este aceite esencial no demuestran sinergismo y antagonizan en su toxicidad.
- Las diferentes fracciones vegetales de *Minthostachys verticillata* como los componentes puros mayoritarios del aceite esencial evaluadas, demostraron ser promisorias por poseer actividad antifúngica frente a patógenos causales de micosis superficiales como oportunistas y por su baja toxicidad para células de mamíferos.
- Las propiedades terapéuticas de los principios activos que se encuentran en *Minthostachys verticillata*, algunas conocidas y otras demostradas en este estudio, lleva a valorar aún más el potencial que tiene este vegetal como fitofármaco. Conocimiento que promueve además a la preservación de esta especie vegetal que se encuentra en riesgo de extinción y a la biodiversidad de las serranías cordobesa.



BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFIA

1. Alonso Vargas, R.; González Álvarez, L; Ruesga, M. 2000. Actividad *in vitro* de una formulación liposómica de nistatina (Nyotran) frente a *Cryptococcus neoformans*. *Revista Latinoam. de Micología*. **17**: 90-92.
2. Alonso, J. 2002. Nuevas pesquisas con fitofarmacos para su aplicación en la clínica diaria: http://www.plantasmedicinales.org/farmaconogsia/sept2002/aceites_esenciales.htm
3. Andrei, G.; Coto, C. E.; De Torres, R. 1985. Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extracto crudo y semipurificados de hojas verdes de *Melia azederach* L. *Revista Argentina de Microbiología*. **17**: 187-194.
4. Astesano, A. 2002. Caracterización de la acción tóxica del Aceite Esencial de *Minthostachys verticillata* y de sus componentes mayoritario sobre sistemas celulares. Tesis de Grado. *Biblioteca Central de la Universidad Nacional de Río Cuarto*.
5. Bagei, E.; Digrak, M. 1996. Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* (Fir) species from Turkey. *Flavor and Frag. J.* **11**:251-156.
6. Bamba, D.; Bassière, J.M.; Marion, C.; Pèlissier, Y.; Fourasté, I. 1993. Essential Oil of *Eupatorium odoratum*. *Plan. Med.* **59**:184-185.
7. Bandoni, A. L.; Juárez, M. A.; Elechosa, M. A. y López, M. A. 1998. Composición de esencias de peperina *Minthostachys verticillata* (Gris.) Epling provenientes de Córdoba y San Luis. XII Congreso Nacional de Rec. Nat. Arom. y Medicinales. Córdoba.
8. Baster, J.; Schaller, M.; Korting, H.; Evans, E. 2001. Review Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Intern. Journal of Antimicrob. Agent.* **17**: 81-91.
9. Basualdo, J. A.; Coto, C.; de Torres, R. 1996. Microbiología Biomédica. Sección 4ª Micología. Editorial Atlante Argentina S.R.L.
10. Basualdo, M. C. 1991. Estado actual de las poblaciones de *Minthostachys verticillata* (Gris.) Epling. Tesis de grado. Dpto. de Cs. Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.
11. Bentacour Posada, A. 2002. Explotan laboratorios el conocimiento indígena: <http://www.jornada.UNAM.mx/cien-indigena.html>.



12. Bergoglio, M. 1993. Antibióticos. Editorial Medica Panamericana. 5ª edición.
13. Bocco, M.; Grosso, M. 1994. Plantas medicinales usadas en medicina popular en las zonas serranas del departamento de Río Cuarto. Dpto. de Cs. Naturales. Facultad de Cs. Exactas Físico-Química y Naturales. UNRC.
14. Camacho Hernández, J.; Chavez Velásquez, M.; Uribe Beltrán, A. 2002. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*. *Fitoterapia*. **73**: 411-413.
15. Cambría, J. A. 1993. Historia del intercambio medicinal y farmacobotánico en el período de la conquista y colonización de América. Junta Municipal de Historia. Río Cuarto. p.185.
16. Cantero, J. J.; Núñez, C. 2000. Las plantas medicinales del Sur de la provincia de Córdoba. Ed. de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
17. Canton Lacasa, E.; Martín Mazuelos, E.; Espinel-Ingroff. 2001. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología* 15.1-15.13. www.guia.reviberoammicol.com.
18. Ciccio, J. F.; Poveda, L. J. 1999. Volatile constituents of *Cunila polvantha* (Lamiaceae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **47**:377-379.
19. Cowan, M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**: 564-582.
20. Dabur, R.; Singh, H.; Chillar, A.; Alí, M.; Sharma, G. Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia*. **75**: 389-391.
21. Davel, G.; Perrota, D.; Cantero, C. Córdoba, S.; Rodero, L.; Brudny M.; Abrantes, R. 1999. Estudio multicéntrico de micosis superficiales en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. **31**:173-181.
22. De Feo, Vincenzo; Ricciardi, Armando I.; Biscardi, Dominica; Senatore, Felice. 1998. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl. (Lamiaceae). *Journal Essential Oil Research*. **10**:61-65.
23. del Palacio, A.; Cuétara, S.; Valle, A.; González, A. 1999. Cambios epidemiológicos observados en un decenio en la dermatofitosis del hospital



- universitario "12 de octubre" de Madrid: nuevas especies emergentes. *Revista Latinoamericana de Micología*. **16**: 101-106.
24. Demo, M.; Oliva, M.; Zigadlo, J.; Primo, V.; Ramos, B. 2001. Determinación de actividad antimicrobiana de componentes puros de aceites esenciales. *Revista latinoamericana de Microbiología*. XXXII Congreso Nacional de Microbiología. **43**:1-MXSiN-0034-9771.
25. Drysdale, R., Drysdale, J. 2000. Essential oils 2000. <http://Keepsmilin.com/essentialoils2000.html>.
26. Emmons, Ch.; Binford, C.; Utz, J. 1964. Medical Micology. Cap. 4 y 10. Library of Congress Catalog Card Number 63:12355.
27. Escobar, F. 2004. Análisis de la capacidad citotóxica de aislamientos clínicos humanos de *Helicobacter pylori* y evaluación de derivados de *Minthostachys verticillata* para inhibir la toxina VacA y/o al microorganismo productor. Tesis de Grado. *Biblioteca Central de la Universidad Nacional de Río Cuarto*.
28. Feresin, G.; Tapia, A.; López, S.; Zacchino, S. 2001. Antimicrobial activity of plants used traditional medicine of San Juan province, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. **78**:103-107.
29. García Martos, P.; Fernández del Barrio, M.T.; Paredes Salido, F. 1997. *Microbiología Clínica aplicada*. Ediciones Díaz de Santos S.A. 3ª edición.
30. García, G. H.; Campos, R.; De Torre, R.; Broussalis, A.; Ferraro, G.; Martino, V.; Coussio, J. 1990. Antiherpetic activity of some Argentine medicinal plants. *Fitoterapia* LXI :541-546.
31. Hammer, K.; Carson, C.; Riley, T. 1998. In vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 591-595.
32. Hammer, K.; Carson, C.; Riley, T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. **86**: 985-990.
33. Hayashi, K.; Kamiya, M.; Hayashi, T. 1995. Virucidal effects of HSV-1, Influenza virus and HIV. *Planta Médica*. **61**:237-241.
34. Jones, N.; Arnason, J.; Abou-Zaid, M.; Akpagan, K.; Sánchez- Vindas, P.; Smith, M. 2000. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by



- First Nations Peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology*. **73**: 191-198.
35. Karpouhtsis, Ioannis; Pardali, Evagelia; Feggou, Efi; Kokkini, Stella; Scouras, Zacharias G.; Marvragani-Tsipidou, Penelope. 1998. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **46**:1111-1115.
 36. Lee, S. G.; Kim, S. I.; Ahn, Y. J.; Kim, J. B.; Lee, B. Y. 1997. Effectiveness of carvacrol derived from *Thujopsis dolabrata* var. Holdai Sawdust against *Thecodiplosis japonensis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Pestic. Sci.* **42**:119-124.
 37. López Martínez, R.; Méndez Tovar, L.; Hernández Hernández, F.; Olivares Castañón, R. 1995. *Micología Medica: Procedimientos para el diagnostico de laboratorio*. Cap. 3 y 7. Editorial Trillas.
 38. Lozoya, X. 1997. Fármacos de origen vegetal de ayer y hoy. *Investigación y Ciencia*. **254**:4-10.
 39. Mangiaterra, M.L.; Giusiano, G.; Alonso, J.; Pons de Storni, L.; Waisman, R. 1998. Dermatofitosis en el Área de Gran Resistencia, Provincia del Chaco, Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* **30**: 79-83.
 40. Mímica-Dukié, N.; Gasic, O.; Kite, G.; Fellow, L. And Jancic, R. 1991. A study of the Essential Oil of *Mentha longifolia* Growing in Yugoslavia. *Planta Medica* 57, Posters A 83.
 41. Mongelli, E; Desmarchelier, C; Coussia, J; Ciccía, G, 1995. Actividad antimicrobiana e interacción con el ADN de plantas medicinales de la amazonia Peruana. *Revista Argentina de Microbiología*. **27**: 199-203.
 42. Muñoz, F. 1993. *Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, Cultivo y Procesado*. Mundiprensa.
 43. Murillo Perea, E.; Viña Patiño, A. 1999. Determinación de constituyentes volátiles de la Albahaca (*Ocimum* spp) mediante dos métodos de Extracción. *Revista Colombiana de Química*. **28** 65-74.
 44. Navarro García, V.; González A.; Fuentes, M.; Aviles, M.; Ríos M.; Zepeda, G.; Rojas, M. 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **87**: 85-88.



45. Negroni, P.; Negroni, R.; Micosis cutáneas y viscerales. López Libreros Editores S.R.L. 1988.
46. Ngono Ngane, N.; Biyiti, L.; Bouchet, A.; Nkengfack, A.; Zollo, A. 2000. Antifungal activity of *Piper guineense* of Cameroon. *Fitoterapia* **74**: 464-468.
47. Organización Mundial de la Salud. Medicina Tradicional. Consejo Ejecutivo 111^a reunión. EB111/9, 12 de diciembre de 2002. <http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/vol2>.
48. Penna, C.; Marino, S.; Vivot, E.; Cruañes, M.; Muñoz, J.; Cruañes, J.; Ferraro, G. 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infections diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*. **77**: 37-40.
49. Quiroga, E. N.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **74**: 89-96.
50. Ratera, E.L. and Ratera, M.O. 1980. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Bs. As. Hemisferio Sur. p.189. ill.
51. Retamar, J.A. and Mazzola, E.B. 1963. Hydrogenation of the *M. verticillata* essential oil. Universidad Nacional Litoral, Santa Fe, Argentina. *Rev. Ing. Quim.*, **32**:49-55.
52. Rhaman A.; Choudhary, M.; Farooq, A.; Ahmed, A.; Zafar Iqbal, M. 1999. Antifungal Activities and Essential Oil Constituents of Some Spices from Pakistan. Third International Electronic Conference on Synthetic Chemistry (ECSOC-3). www.reprints.net/ecsoc-3.htm. September 1-30, 1999.
53. Rojas, R.; Bustamante, B.; Bauer, J.; Fernández, I.; Albán, J.; Lock, O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **88**:199-204.
54. Sanglard, D and Odds, F. C. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious Diseases*. **2**:73-85.
55. Sanglard, D. 2002. Resistansce of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*. **5**:379-385.



56. Senatore, F. 1998. Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq) Epl. (Lamiaceae) from Peru. *Flavors and Fragrance Journal*. **13**:263-265.
57. Soliman, K.; and Badeaa, R. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*. **40**: 1669-1675.
58. Soraru, S. B.; Bandoni, A. L. 1978. Plantas de la medicina Popular Argentina. Ed. Albatros. Bs. As.
59. Torres-Rodríguez J. M.; del Palacio-Hernández, A; Guarro-Artigas, J; Negroni-Briz, R; Pereiro-Miguens, M. 1993. Micología Médica. Cap. 1, pp: 1-5; Cap. 2, pp: 7-10; Cap. 3, pp: 11-21; Cap. 5, pp: 29-41; Cap. 12, pp: 103-115. Editorial Masson, S.A.
60. Umamo, K.; Hagi, Y.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T. 2000. Volatile chemicals identified in extracts from leaves of *Japanese mugwort* (*Artemisia princeps* pamp.). *J Agric Food Chem*. **48**:3463-3469.
61. Vanden Berghe, D. A.; Vlietinck, A. J.; Van Hoof, L. 1986. Plant products as potencial antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur* **84**:101-147.
62. Vogt, V. 2004. Estudios de la actividad antiherpética de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Minthostachys verticillata*. Tesis de Grado. *Biblioteca Central de la Universidad Nacional de Río Cuarto*.
63. Yip, L.; Pei, S.; Hudson, J. B. and Towers, G. H. N. 1961. Screening of medicinal plants from Yunnan province in southwest China for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **34**:1-6.
64. Zanon, S.; Ceriatti, F. S.; Rovera, M.; Sabini, L.; Ramos, B. 1999. "Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina". *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, MXISSN-0034-9771, 41(2)59-62. México.
65. Zygadlo, J.; Maestri, D.; Lamarque A., Guzmán, C., Velazco-Negueruela, A., Perez-Alonso, M., García Vallejos, M., Grosso, N. 1996. Essential Oil Variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **24**: 319-323.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



60657

60657

