

Análisis de la composición del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae, y evaluación de su actividad biológica

María Elena Maldonado R.¹
Cesare Dacarro²

1 Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad, Universidad Politécnica Salesiana, Quito

2 Laboratorio de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Pavia

Resumen

El estudio de la composición química del aceite esencial de la planta reconocida con el nombre vernáculo de arrayán y que pertenece a la especie *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh, familia *Myrtaceae*, fue realizado mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas, la que permitió identificar una mezcla de componentes mono y sesquiterpenos. Es así, que los principales compuestos que se destacaron fueron Linalol, Eucaliptol, D -Limoneno y Terpineol; seguidos, en menor proporción, de 4 Terpineol, cis Mirtanol, Cariofileno, --Cariofileno, Cadineno y Espatulenol.

El efecto de la actividad antimicrobiana del aceite de arrayán evidenció una acción fuerte sobre microorganismos como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, menor sobre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, y ausente sobre *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Introducción

En la mayoría de los países en desarrollo es frecuente el uso de plantas medicinales o de sus derivados en casi todos los programas de salud. La identificación del valor curativo de las plantas proviene, comúnmente, de la información recopilada a partir del conocimiento médico tradicional, ya que éste



es una fuente importante para el desarrollo de investigaciones fitoquímicas, especialmente en lo que concierne a la identificación de principios activos.

El saber ancestral, relacionado con la etnomedicina usada por los indígenas en Ecuador y en América Latina, está fundamentado en una concepción particular de salud-enfermedad, la que ha permitido desarrollar una terapéutica basada en la utilización de plantas que tiene como sustento una cosmovisión particular que se manifiesta en creencias mágico-religiosas. En este sentido, se debe resaltar que a través de la historia se puede comprobar que los conocimientos prácticos de la etnomedicina por tradición se transmiten de manera oral de generación en generación.

En Ecuador existe un basto conocimiento en la utilización de las plantas como medicamento, especialmente por ser una terapéutica muy difundida en los estratos poblacionales de bajos recursos económicos rurales y urbanos; sin embargo, son pocas las especies de plantas que han sido estudiadas de acuerdo a los parámetros científicos modernos y las normas éticas internacionales. Por esta razón, una planta de uso popular que es empleada como medicamento debe ser estudiada con un análisis fitoquímico

para: comprobar su efectividad, determinar su potencial de toxicidad y evaluar la relación riesgo-beneficio en los seres humanos. Además, se debe considerar que el uso frecuente de una especie de planta no es garantía de su actividad, primero porque pueden existir diferentes variedades de una misma especie, luego porque una planta puede ser usada como placebo y por último, si los componentes activos de una planta se desconocen inclusive puede ser tóxica.

Por lo antes expuesto, este estudio se propuso relacionar el conocimiento ancestral de la utilización de las plantas medicinales con las técnicas modernas de evaluación de actividad biológica y análisis fitoquímico, porque de esta manera consiguió identificar los principios activos de una planta responsables de la actividad biológica evaluada. Así, el objetivo de esta investigación fue determinar la composición química del aceite de arrayán [*Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh] y su acción antibacteriana contra las bacterias de infecciones propias de la cavidad oral. La selección del arrayán se basó en la etnomedicina, ya que es una planta ampliamente usada para la limpieza bucal en las comunidades indígenas de las provincias de Cotopaxi y Chim-

borazo; por lo tanto, se decidió comprobar cuál es su eficiencia o ineficiencia contra los virus y bacterias.

Métodos empleados para determinar la actividad biológica y la composición fitoquímica de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh

1. Recolección del material: Las hojas de arrayán fueron recolectadas en la provincia de Cotopaxi en el mes de marzo de 2006, la identificación taxonómica fue realizada por el biólogo Marco Cerna, Botánico de la UPS, y el material vegetal fue liberado de impurezas para luego realizar la extracción del aceite esencial.

2. Screening antibacteriano: En esta prueba se usó el método de los discos de papel, porque el uso de discos de papel aumenta la diversidad de antimicrobianos que pueden usarse simultáneamente (Vincent y Vincent 1944; Bauer y Kirby 1966; CYTED 1995). Las bacterias y levaduras utilizadas fueron diferentes (Tablas 1 y 2) para estudiar el tipo de reacción.

La clasificación de las bacterias y levaduras se realizó de acuerdo a su respuesta morfológica y tintorial (Tabla 3).



Tabla 1. Bacterias utilizadas en el estudio de la actividad bactericida del aceite de arrayán.

Nombre científico	Familia
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	Micrococaceae
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Micrococaceae
<i>Streptococcus mutans</i>	Streptococaceae
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Streptococaceae

Tabla 2. Levaduras utilizadas en el estudio de la actividad bactericida del aceite de arrayán.

Nombre científico	Familia	Orden	Phylum
<i>Candida albicans</i>	Saccharomycetaceae	Saccharomycetales	Ascomycota

Tabla 3. Clasificación morfológica y tintorial de las bacterias y levadura.

Bacterias y levadura	Morfología y coloración
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos Gram-negativos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram-positivos
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cocos Gram-positivos
<i>Streptococcus mutans</i>	Cocos Gram-positivos
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cocos Gram-positivos
<i>Candida albicans</i>	Levadura/No se utiliza el método Gram de coloración

3. Métodos para determinar la actividad biológica de inhibición del aceite de arrayán: En esta prueba, se determinó por el método Bauer-Kirby de discos de papel la respuesta de los microorganismos a diferentes concentraciones del aceite de arrayán de acuerdo al halo de inhibición que presentan las bacterias y la levadura (Tabla 4). Además, se aplicó la técnica en medio líquido para observar cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceite de arrayán por partes de millón (ppm) requerida para inhabilitar el crecimiento de las bacterias y la levadura (Tabla 5).

Tabla 4. Respuesta de las bacterias y levadura al aceite esencial de arrayán.

Bacterias/ Levadura	Estándar (10 ug)	Halo de inhibición estándar (mm)	Concentración estándar (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
<i>E. coli</i>	Gentamicina	26	5	—
<i>E. coli</i>	Gentamicina	26	10	—
<i>E. coli</i>	Gentamicina	26	25	—
<i>E. coli</i>	Gentamicina	26	50	17,9
<i>E. coli</i>	Gentamicina	26	70	24,0

Bacterias/ Levadura	Estándar (10 ug)	Halo de inhibición estándar (mm)	Concentración estándar (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
<i>S. aureus</i>	Gentamicina	26	5	—
<i>S. aureus</i>	Gentamicina	26	10	7,23
<i>S. aureus</i>	Gentamicina	26	25	11,36
<i>S. aureus</i>	Gentamicina	26	50	14,3
<i>S. aureus</i>	Gentamicina	26	70	14,5
<i>S. epidermidis</i>	Gentamicina	26	5	—
<i>S. epidermidis</i>	Gentamicina	26	10	8,0
<i>S. epidermidis</i>	Gentamicina	26	25	7,88
<i>S. epidermidis</i>	Gentamicina	26	50	—
<i>S. epidermidis</i>	Gentamicina	26	70	14,07
<i>S. pyogenes</i>	Gentamicina	26	5	9,7
<i>S. pyogenes</i>	Gentamicina	26	10	11,7
<i>S. pyogenes</i>	Gentamicina	26	25	25,11
<i>S. pyogenes</i>	Gentamicina	26	50	22,2
<i>S. pyogenes</i>	Gentamicina	26	70	31,5
<i>C. albicans</i>	Clotrimoxazole	16	5	—
<i>C. albicans</i>	Clotrimoxazole	16	10	7,7
<i>C. albicans</i>	Clotrimoxazole	16	25	15,6
<i>C. albicans</i>	Clotrimoxazole	16	50	17,4
<i>C. albicans</i>	Clotrimoxazole	16	70	27,23

Tabla 5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por partes por millón (ppm) del aceite esencial de arrayán sobre las bacterias y la levadura

Concentración de aceite esencial de arrayán (ppm)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>C. albicans</i>
50	crece	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	crece
25	crece	crece	crece	ausencia	ausencia	crece
12,5	crece	crece	crece	ausencia	ausencia	crece
6,25	crece	crece	crece	ausencia	ausencia	crece
3,125	crece	crece	crece	ausencia	ausencia	crece
1,5625	crece	crece	crece	crece	crece	crece
0,78125	crece	crece	crece	crece	crece	crece
0,390625	crece	crece	crece	crece	crece	crece
0,1953125	crece	crece	crece	crece	crece	crece
0,09765625	crece	crece	crece	crece	crece	crece

4. Análisis de la composición química del aceite esencial extraído de las hojas de arrayán: Primero se realiza un tamizaje fitoquímico de acuerdo al manual de Miranda (2000). Las condiciones para realizar el análisis cromatográfico fueron con el uso de: un

cromatógrafo de gases acoplado a masas Modelo Saturn 2001 programado a: T inyector 250°C Columna (Tabla 6), Factor four VF-5ms (30m x 0,25mm), gas transportador Helio 1ml/min, Split 200, energía de ionización 70 eV, corriente de emisión

40mA, rango de masas 40 – 650 m/z e ion source a una temperatura de 220 °C. Las condiciones de la muestra fueron de una inyección de 1 µL a una solución de 1:50 de aceite esencial en n-hexano.

Tabla 6. Condiciones de la columna del cromatógrafo de gases acoplado a masas para análisis del aceite de arrayán

Temperatura (°C)	Velocidad (°C/min)	Permanencia (min)	Total (min)
50	0	2	2
100	20	0	4,50
220	5	1,50	30

Resultados de la actividad biológica y del análisis fitoquímico de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh

En este proyecto se ha realizado la primera investigación sobre la actividad antimicrobiana del arrayán [*Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh], recolectando la planta en la provincia de Cotopaxi, puesto que hasta el momento existen

realizó primero por la técnica de Bauer-Kirby, midiendo los halos de inhibición y comparándolos con el halo producido por una sustancia control, en el caso de las bacterias fue un antibiótico de amplio espectro como la gentamicina y en el caso de la levadura fue Clotrimoxazole. En esta prueba, se evidenció que la acción del aceite esencial es fundamentalmente sobre las bacterias *Staphilococcus* y *Streptococcus*.

El aceite esencial de las hojas de arrayán se obtuvo mediante la técnica de arrastre de vapor, obteniéndose un rendimiento del 2% de extracción del material vegetal seco y pulverizado. La técnica de cromatografía de gases acoplada a masas identificó como principales componentes del aceite esencial alcoholes como linalol, eucaliptol, limoneno y α -terpineol (Tabla 8).

El linalol (monoterpeno) es un alcohol terpénico ($C_{10}H_{18}O$) terciario insaturado y está presente en un porcentaje del 19%, por lo tanto sería un buen marcador químico en las pruebas de control de calidad del aceite; además, es un componente reconocido en los aceites esenciales de lavanda y menta. El eucaliptol (monoterpeno) es un alcohol terpénico ($C_{10}H_{18}O$) y está presente en un porcentaje del 11,73%; además, es un componente mayoritario en la esencia de eucalipto que se caracteriza por sus propiedades como balsámico, expectorante y antiséptico. El limoneno es un hidrocarburo terpénico principal componente de muchos aceites esenciales, principalmente cítricos, y está presente en una concentración del 8,56%. El α -terpineol es un monoterpeno ($C_{10}H_{18}O$) presente en numerosos aceites esenciales y está presente en una concentración del 7,31%.

En el aceite de arrayán se detectaron con la cromatografía de gases acoplada a masas un total de 52 componentes, de los cuales 31 fueron identificados comparándose con la base de datos del "Scientific Instrument Services, Inc." (<http://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>).

Tabla 7. Tamizaje fitoquímico del aceite de arrayán para identificación de compuestos

Compuesto	Presencia
Alcaloides	presencia
Compuestos fenólicos	presencia
Flavonoides	presencia
Azúcares reductores	presencia
Saponinas	ausencia
Mucílagos	ausencia
Principios amargos	presencia
Catequinas	presencia
Resinas	ausencia
Compuestos lactónicos	ausencia
Triterpenos-esteroides	presencia
Aminoácidos libres	ausencia
Quinonas	presencia
Cardenólicos	negativo
Antocianidinas	presencia
Aceites esenciales	presencia

pocos trabajos con relación a estudios de la actividad biológica del género *Myrcianthes*, registrándose algunos en Argentina (Kott *et al.* 1999; Penna *et al.* 2001).

La evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite de arrayán se

La investigación fitoquímica a través del tamizaje del aceite de arrayán evidencia la presencia de diversos compuestos químicos (Tabla 7), entre los que se destacan alcaloides, azúcares y compuestos fenólicos.

Actividad antibacteriana del aceite de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh

En las provincias de Cotopaxi y Chimborazo, las comunidades indígenas mastican la hoja de arrayán para la limpieza bucal, acción que de acuerdo a los estudios de actividad antimicrobiana realizados se comprueba, pues el aceite esencial de esta planta tiene acción bactericida sobre *Streptococcus mutans* que es el agente causal de las caries dentales.

La colonización bacteriana de las superficies lisas de los dientes se pro-

duce como consecuencia de un anclaje firme de células bacterianas individuales, seguido de un crecimiento en forma de microcolonias. A partir de una superficie dentaria recién limpia, el primer evento es la formación de una fina película orgánica de varias micras de espesor como resultado de la fijación de glicoproteínas ácidas de la saliva. Esta película proporciona un sitio de anclaje más firme para la colonización por microcolonias bacterianas. La colonización de esta película glicoproteica es muy específica y sólo implica a unas cuantas especies de *Streptococcus*, principalmente el

S. sanguis, *S. sobrinus*, *S. mutans* y *S. mitis*, por lo que se recomienda continuar con los estudios de actividad antiadherente del aceite de arrayán.

El aceite esencial de arrayán presenta un amplio espectro de acción antibacteriano, pues los análisis realizados comprueban su acción bactericida sobre microorganismos Gram (+), principalmente por la actividad del eucaliptol sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* que patógenos típicos de las vías respiratorias superiores. Así, estos datos se convierten en una base para estudios posteriores diri-

Tabla 8. Compuestos químicos identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Compuestos	Método de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificado/ abundancia relativa (%)	No identificado (NI)/ abundancia relativa (%)
Cis 3-hexanol	CG-MS	4,766	0,090	
Metil-butiril oxirano	CG-MS	4,901	0,078	
Butiril acetona	CG-MS	5,146	0,071	
2-heptanol	CG-MS	5,277	0,973	
1R α - pineno pineno	CG-MS	5,767	0,237	
NI	CG-MS	6,404		0,617
β -pineno	CG-MS	6,449	0,276	
Cimeno	CG-MS	7,069	0,265	
D-Limoneno	CG-MS	7,146	8,563	
Eucaliptol	CG-MS	7,231	11,730	
α - terpineno	CG-MS	7,602	0,162	
n-octanol	CG-MS	7,727	0,187	
α metil α (4 metil-3 pentil- 7 oxirano metanol)	CG-MS	7,829	1,565	
NI	CG-MS	8,106		0,765
Linalol	CG-MS	8,258	19,691	
R+ novinone	CG-MS	9,240	1,270	
Borneol	CG-MS	9,874	0,164	
Citral c	CG-MS	9,940	0,255	
4 terpineol	CG-MS	9,995	2,266	
oxido de β -pineno	CG-MS	10,139	0,628	
α terpineol	CG-MS	10,280	7,310	
NI CG-MS	10,361			4,540
cis carveol	CG-MS	10,772	0,336	
cis mirtanol	CG-MS	11,832	2,645	
NI CG-MS	11,989			0,532
Mirtenil acetato	CG-MS	13,050	0,916	
α cubebeno	CG-MS	13,608	0,400	
NI CG-MS	14,209			0,230
NI CG-MS	14,335			1,497

Compuestos	Método de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificado/abundancia relativa (%)	No identificado (NI)/abundancia relativa (%)
NI CG-MS	14,512			0,330
NI CG-MS	14,609			0,169
NI CG-MS	15,104			0,345
cariofileno	CG-MS	15,417	3,918	
NI CG-MS	15,586			0,292
NI CG-MS	15,851			1,140
α cariofileno	CG-MS	16,250	2,179	
NI CG-MS	16,360			1,151
NI CG-MS	16,613			1,364
NI CG-MS	17,035			4,084
NI CG-MS	17,108			0,554
NI CG-MS	17,178			4,870
NI CG-MS	17,295			1,331
τ cadineno	CG-MS	17,532	1,369	
β cadineno	CG-MS	17,603	3,028	
NI CG-MS	17,744			1,373
NI CG-MS	18,055			0,211
Neroidol	CG-MS	18,476	0,406	
Espatulenol	CG-MS	19,069	1,144	
Óxido de cariofileno	CG-MS	19,221	1,136	
NI CG-MS	20,495			0,619
α Eudesmol	CG-MS	20,842	0,358	
NI CG-MS	20,900			0,629
TOTAL			73,616	26,643

gidos a la formulación de preparaciones de uso tópico, especialmente para la limpieza y la desinfección de la cavidad oral. En este sentido, se recomienda continuar con los estudios de toxicidad y estabilidad de un producto que sirva como desinfectante bucal ya que se lo podría desarrollar bajo las exigencias y normativas vigentes para productos farmacéuticos.

Es importante señalar que los resultados obtenidos en este trabajo son aún preliminares, por lo tanto se requieren estudios más profundos que confirmen todas las acciones que tiene el aceite de arrayán como inhibidor de la actividad microbiana.

Por último, cabe señalar que al ser Ecuador uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo es prioritario continuar con investigaciones sobre su flora nativa, porque esto permitirá al país dejar de ser un

simple proveedor de materias primas que luego regresan como productos de alta calidad y con un alto valor agregado. Sumándose, que cuando la investigación se desarrolla localmente permite que el conocimiento quede en el país y que los beneficiarios directos sean las comunidades locales que son las dueñas del conocimiento ancestral y las productoras de los recursos vegetales.

Literatura citada

Abdelgaleil, S.A.M.; T. Iwagawa, M. Doe y M. Nakatani. Antifungal limonoids from the fruits of *Khaya senegalensis*. *FITOTERAPIA (The Journal for the Study of Medicinal Plants)* 75(6): 566-572.

Berkow, R.; M. Beers y A. Fletcher. 2000. *Manual Merck de información médica*. Editorial Océano. Barcelona, España.

Cáceres, A.; O. Cabrera; O. Morales; P. Mollinedo y P. Mendia. 1991. Pharmacological properties of *Moringa Oleifera* Preliminary Screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 33(3): 212-216.

CYTED. 1995. *Manual de técnicas de investigación*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma de Química Fina Farmacéutica. Proyecto X1: Búsqueda de Principios Bioactivos de la Región. Mimeógrafo no publicado.

Gilvert, D.; R. Moellering y M. Sanders. 1999. *Guía terapéutica antimicrobiana*. Ediciones Días Santos S.A. Madrid, España.

Kott, V.; L. Barbini; M. Cruañes; J. de D. Muñoz; E. Vivot; J. Cruañes; V. Martino; G. Ferraro; L. Cavallaro y R. Campos. 1999. Antiviral activity in Argentine medici-

- nal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 64 (1999) 79–84.
- Miranda, M. 2000. *Farmacognosia y productos naturales*. Manual de Práctica, Facultad de Farmacia, Universidad de la Habana. Habana, Cuba.
- Pelczar, M.J.; R.D. Reid y E.C.S.Chan. 2000. *Microbiología*. Editorial Zanichelli. Bologna, Italia.
- Penna, C.; S. Marino; E. Vivot; M.C. Cruaños; J. de D. Muñoz; J. Cruaños; G. Ferraro; G. Gutkind y V. Martino. 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 77 (2001) 37–40.
- Scientific Instrument Services, Inc. 2006. *Mass Spectral Library*. En línea: <<http://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>>. Consulta: 10 de noviembre del 2006.
- Senatore, F. 2000. *Oli essenziali: provenienza, estrazione ed analisi chimica*. Editorial Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali. Roma, Italia.
- Tyler, V.; L. Brady y J. Robbers. 1979. *Farmacognosia*. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
- Vanden B.D. y A. VLITEINCK. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry* 6: 47-69.

Agradecimientos

Los autores agraden por su colaboración en el desarrollo de la investigación a los profesores Paola Vita Finzi y Giovanni Vidari del Departamento de Química Orgánica, Universidad de Pavía, Italia, y por la revisión del texto a Marco Cerna y Paco Noriega, quienes ayudaron con los aspectos botánicos y las pruebas de espectros de cromatografía de gases acoplada a masas.

