



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA  
ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**“EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO  
DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) CONTRA *Staphylococcus aureus* ATCC  
25923”**

Tesis para optar el título de

**LICENCIADO TECNOLOGO MEDICO EN EL AREA DE LABORATORIO  
CLINICO Y ANATOMIA PATOLOGICA**

Bach: **FRANCO ROBERTO FRIAS FERNANDEZ**

ASESOR:

**Mg. WILDER ADAMIR REYES ALFARO**

TRUJILLO – PERÚ

2018

**HOJA DE APROBACION**

**Bach. FRANCO ROBERTO FRIAS FERNANDEZ**

**“EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO  
DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) CONTRA *Staphylococcus aureus* ATCC  
25923”**

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de  
Licenciado Tecnólogo Médico en el Área de Laboratorio Clínico y  
Anatomía Patológica de la Universidad Alas Peruanas.

---

---

---

TRUJILLO – PERÚ

2018

## DEDICATORIA

Se dedica este trabajo a:

Dios, porque por El y para El son todas las cosas.

También a mi mejor Amiga y mi Hermosa Novia: Karen Jazmín Seminario Pacheco, gracias por todo tu apoyo reina.

Además a mi familia en general, son los mejores, y especialmente mis padres, los amo.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta Tesis a:

Mg. Wilder Adamir Reyes Alfaro primeramente por la calidad de persona además del excelente profesional y por la guía en cada paso para el desarrollo de este trabajo que también en suyo.

A mi alma mater “UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS” en cuyas aulas recibí la formación adecuada para mi realización como profesional.

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de *Minthostachys mollis* (muña) contra *Staphylococcus aureus* atcc 25923, con el fin de recabar nueva información de agentes antibióticos contra esta cepa bacteriana. La actividad antibacteriana se determinó usando extractos de agua y etanol de la materia vegetal en mención, mediante el método Kirby-Bauer (método de difusión en agar), es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Los resultados que se obtuvieron fueron:

Extracto acuoso de *Minthostachys mollis* (muña): 0.04g/ml, dando como halo de medición: 15mm.

Extracto etanólico de *Minthostachys mollis* (muña): 0.02g/ml, dando como halo de medición: 10mm.

El halo de medición del blanco de antibiótico (Amoxicilina 20ug + Acido Clavulánico 10ug): 30mm.

Mediante este trabajo se puede concluir que los extractos acuosos y etanólico de *Minthostachys mollis* (muña) tiene una considerable actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* atcc 25923. Por lo cual se recomienda ampliar investigación dirigida a la purificación del extracto y obtención del metabolito secundario responsable de la actividad antibacteriana, así también ampliar el tipo de agentes microbianos (hongos u otras bacterias).

**Palabras clave:** Extracto, *Staphylococcus aureus*, *Minthostachys mollis* (muña)

## SUMMARY

The objective of this test is to evaluate the antibacterial activity of the aqueous and ethanolic effects of *Minthostachys mollis* (muña) against *Staphylococcus aureus atcc 25923*, in order to gather new information of antibiotic agents against this bacterial strain. The antibacterial activity was determined using extracts of water and ethanol of the vegetal matter in the mention, by means of the Kirby-Bauer method (agar diffusion method), it is used to determine the sensitivity of a microbial agent against an antibiotic or chemotherapeutic agent. The results that were obtained were:

Aqueous extract of *Minthostachys mollis* (muña): 0.04 g / ml, giving as measuring halo: 15 mm.

Ethanolic extract of *Minthostachys mollis* (muña): 0.02g / ml, giving as measuring halo: 10mm.

The measurement range of the antibiotic blank (Amoxicillin 20ug + Clavulanic Acid 10ug): 30 mm.

Through this work it can be concluded that the aqueous and ethanolic extracts of *Minthostachys mollis* (muña) have a considerable antibacterial activity against *Staphylococcus aureus atcc 25923*. Therefore, the research directed to the purification of the extract and the obtaining of the secondary metabolite responsible for antibacterial activity, also expand the type of microbial agents (fungi or other bacteria).

Key words: Extract, *Staphylococcus aureus*, *Minthostachys mollis* (muña)

## INDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
RESUMEN.....	iv
SUMMARY.....	v
INTRODUCCION.....	01
<b>CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	
I.1. Planteamiento del Problema.....	02
I.2. Formulación del Problema.....	04
I.3. Objetivos.....	04
I.3.1. Objetivo General.....	04
I.3.2. Objetivos Especificos.....	04
I.4. Justificación.....	04
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	
II.1. Bases Teóricas.....	06
II.2. Antecedentes.....	16
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b> .....	20
III.1. Diseño del Estudio.....	20
III.2. Variables, Dimensiones e Indicadores.....	20
III.3. Procedimientos y Técnicas.....	21
III.4. Plan de Análisis de Datos.....	26
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS ESTADÍSTICOS</b> .....	27
IV.1. Resultados.....	27
IV.2. Discusión de resultados.....	32
IV.3. Conclusiones.....	34
IV.4. Recomendaciones.....	34
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36
<b>ANEXOS</b> .....	39

## INTRODUCCION

*Staphylococcus aureus* es el mayor patógeno humano causante de infecciones a la piel y tejidos, neumonía, septicemia e infecciones por dispositivos asociados. La emergencia de cepas resistentes a meticilina y otros agentes antibacterianos ha llegado a ser una preocupación mayor especialmente en el ambiente hospitalario, esto es por la alta mortalidad debido a las infecciones sistémicas ocasionadas por *Staphylococcus aureus*. Infortunadamente, las opciones terapéuticas para pacientes con infecciones por *Staphylococcus aureus* son limitadas; la opción primaria es terapia con vancomicina intravenosa, ya que otros antimicrobianos, incluyendo las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación, son inefectivas contra *Staphylococcus aureus*. Lo cual subraya la necesidad de nuevos antibióticos. *Staphylococcus aureus* merece un análisis y vigilancia especiales por ser el segundo microorganismo aislado en pacientes hospitalizados y por la aparición de cepas resistentes con alta morbilidad y mortalidad. El alto grado de resistencia a la oxacilina y a otros antimicrobianos de forma concomitante, limita las opciones terapéuticas con un grave impacto en la mortalidad en pacientes críticos, La variabilidad de *Staphylococcus aureus*, la rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, y su continua adquisición de determinantes de resistencia antibiótica, han hecho de éste un residente habitual del hábitat hospitalario, donde origina problemas de multirresistencia.



## I) PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### I.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Uno de los grandes problemas actuales y futuros de salud pública y en general un problema social, es la resistencia de las bacterias frente a los diferentes grupos de antibióticos, una de las bacterias más representativas en cuanto a resistencia es el género *Staphylococcus* que ya para el año 1997 desarrolló resistencia intermedia a vancomicina y para el 2000, alto nivel de resistencia a éste antibiótico.<sup>1</sup>

Por ello es necesario conocer que la variabilidad de *Staphylococcus aureus*, la rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, y su continua adquisición de determinantes de resistencia antibiótica, han hecho de éste un residente habitual del hábitat hospitalario, donde origina problemas de multiresistencia, ocasionalmente importantes. Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados  $\beta$ -lactámicos, las cepas de *Staphylococcus aureus* *meticilino resistentes* (SARM) presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. A través de diversos mecanismos, estos aislados presentan resistencia al cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos e, incluso, quinolonas, describiéndose cada vez con mayor frecuencia brotes SARM sensibles sólo a los glucopéptidos.<sup>1</sup>

El interés actual del estudio de este patógeno deriva, bien de su elevada frecuencia, o por representar, en el caso de cepas resistentes a meticilina

(aislados SARM), una de las principales causas de brotes de infección nosocomial en nuestro país. Los primeros brotes de infección nosocomial se describieron en hospitales europeos al inicio de los años sesenta. Desde entonces, su prevalencia ha ido creciendo en la mayoría de áreas geográficas, convirtiendo determinadas áreas hospitalarias, sobre todo aquéllas consideradas de alto riesgo, como las Unidades de Cuidados Intensivos, en zonas endémicas para este tipo de infección. Algunos estudios realizados en determinados períodos elevan estas cifras hasta un 40%.<sup>2</sup>

La situación ante esta creciente resistencia del *Staphylococcus aureus* hoy en día representa un problema muy complejo, tanto por el aumento de los costos del tratamiento como por el grado de las complicaciones infecciosas.<sup>3</sup>

## **I.2. Formulación Del Problema**

¿Tendrá efecto antibacteriano el extracto acuoso y etanólico de *Minthostachys mollis* (muña) contra *Staphylococcus aureus* atcc 25923?

## **I.3. Objetivo de la Investigación**

### **I.3.1 Objetivo General**

EVALUAR EL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANOLICO DE MINTHOSTACHYS MOLLIS (MUÑA) CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 25923.

### **I.3.2 Objetivos Especificos**

- Obtener extracto acuoso y etanólico *Minthostachys Mollis* (muña)
- Determinar el efecto del extracto acuoso y etanólico, sobre el crecimiento de bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## **I.4. Justificación**

Este trabajo tiene mucha importancia en la realidad actual debido a que la resistencia bacteriana ha aumentado en los últimos años, especialmente en los gérmenes implicados en la infección hospitalaria, lo cual crea gran preocupación debido al impacto que conlleva en la morbimortalidad y en los costos. *Staphylococcus aureus* merece un análisis y vigilancia especiales por ser el segundo microorganismo aislado en pacientes hospitalizados y por la aparición de cepas resistentes con alta morbilidad y mortalidad.

El alto grado de resistencia a la oxacilina y a otros antimicrobianos de forma concomitante, limita las opciones terapéuticas con un grave impacto en la mortalidad en pacientes críticos, además de ello *Staphylococcus aureus* es el mayor patógeno humano causante de infecciones a la piel y tejidos, neumonía, septicemia e infecciones por dispositivos asociados. La emergencia de cepas resistentes a metilina y otros agentes antibacteriales ha llegado a ser una preocupación mayor especialmente en el ambiente hospitalario, esto es por la alta mortalidad debido a las infecciones sistémicas ocasionadas por *Staphylococcus aureus*. Infortunadamente, las opciones terapéuticas para pacientes con infecciones por *Staphylococcus aureus* son limitadas; la opción primaria es terapia con vancomicina intravenosa, ya que otros antimicrobianos, incluyendo las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación, son inefectivas contra *Staphylococcus aureus*. Es por ello que ante la eminente resistencia del *Staphylococcus aureus* a los antibióticos farmacológicos, es relevante realizar investigación en otras áreas como es la medicina alternativa, mediante el uso de extracto acuoso y etanólico de MINTHOSTACHYS MOLLIS (MUÑA), conocida por su producción de aceite esencial, glicósidos, mucílagos, saponinas, taninos, alcaloides y esteroides, Por ello es que se realiza este trabajo con la esperanza de encontrar nuevas sustancias no sintetizadas por el hombre.

## II: MARCO TEÓRICO

### II.1. Bases Teóricas

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston<sup>12</sup> introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos.<sup>4,5,6</sup>

Los estafilococos fueron clasificados inicialmente en un género común en la familia Micrococacea además de los géneros *Micrococcus*, *Stomacoccus* y *Planococcus*. Sin embargo, en estudios recientes se observaron diferencias con estos géneros, una de las principales es la cantidad de guanina-citocina (G+C de 30 a 39%), mientras que los *Micrococcus* tienen un contenido mayor de G+C de 63 a 73%. Los estudios de homología

genética, secuenciación del DNA, hibridación DNA-rRNA, y la secuenciación comparativa del RNAr 16S, han permitido demostrar que los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* están poco relacionados. Por otro lado, la pared celular de los estafilococos tienen unidos los ácidos teicoicos, los cuales no existen en los micrococcos; otra diferencia es la composición del citocromo y menaquinona de la cadena respiratoria presentes en los estafilococos.<sup>4,5,6</sup>

Estudios recientes demuestran que el género *Staphylococcus* se encuentra más cercano a los géneros *Bacillus* y *Streptococcus*. El género *Staphylococcus* contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo entre la flora de otros mamíferos y aves. Algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños<sup>5,6</sup>

El *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus saprophyticus* son comúnmente responsables de infecciones relacionadas con dispositivos e infecciones del tracto urinario, siendo éstos menos infecciosos que *S. aureus*. (7,8) Algunas especies tienen preferencia por sitios específicos, los cuales son indicados por su nombre como *Staphylococcus epidermidis* que coloniza la piel, *Staphylococcus capitis* que coloniza el cuero cabelludo. El *S. aureus* se encuentra ampliamente distribuido entre los primates, pero no está restringido únicamente a ellos; por ejemplo, les produce mastitis en el

ganado bovino y En el hombre, la localización nasal del *S. aureus* permite su diseminación y, como consecuencia, la multirresistencia a los antibióticos como a la meticilina (MRSA).<sup>7, 8, 9, 10,11</sup>

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en el *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra.<sup>12</sup>

### Mecanismos de resistencia

1) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En los gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas.

También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas. <sup>11, 12,13</sup>

2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios).

En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente. <sup>11, 12,13</sup>

3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos). Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos. <sup>11, 12,13</sup>



La resistencia en los principales grupos de antibacterianos betalactámicos.

Las bacterias desarrollan al menos tres mecanismos para hacerse resistentes a ellos, que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente: alteración de las enzimas diana (PBPs), alteración de la membrana externa y producción de enzimas inactivantes (betalactamasas). Las PBPs son necesarias para que la bacteria forme su pared celular, y los antibióticos betalactámicos se fijan en estas enzimas impidiéndolo. Si la bacteria modifica sus PBPs de modo que no fijen antibiótico, se hará resistente; otros mecanismos serían la hiperproducción o la adquisición de PBPs resistentes. La resistencia a meticilina en estafilococos, a betalactámicos en neumococo y enterococos y en algunas bacterias gram negativas (*Haemophilus*, gonococo), pueden ser debidas a alteraciones de PBPs.

La modificación de la membrana externa, cuando es el único mecanismo implicado no suele ser importante, pero sí cuando se asocia a la producción de betalactamasas, siendo especialmente decisiva en los gram negativos, pues los betalactámicos entran a través de las porinas, que al modificarse o desaparecer.<sup>13</sup>

La producción de enzimas inactivantes es sin duda el mecanismo más importante de los betalactámicos ya que la adquisición de betalactamasas

(plasmídicas o cromosómicas), es la causa más frecuente de resistencias. Las betalactamasas plasmídicas de gram negativos producen alto nivel de resistencia y están muy extendidas sobre todo entre las enterobacterias, algunas son de espectro ampliado y confieren resistencia a la práctica totalidad de los antibióticos betalactámicos. Desde que se puso de manifiesto la importancia de las betalactamasas, se buscaron inhibidores de estas enzimas. Incluyéndose en este término diferentes compuestos químicos, entre los que destacan ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam, sin embargo ya se han detectado una nueva clase de betalactamasas que confiere resistencia a estos inhibidores.<sup>14</sup>

Aminoglucósidos: La inactivación enzimática mediada por plásmidos representa el principal mecanismo de resistencia en enterobacterias, Pseudomonas, estafilococos y enterococos, pero existen otros mecanismos como alteraciones en la permeabilidad de la membrana y/o mutaciones cromosómicas. Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos.<sup>13</sup>

Glucopéptidos: Las micobacterias, los hongos y las bacterias gram negativas son resistentes debido a la incapacidad de la molécula de atravesar la membrana externa y por lo tanto de llegar a la diana, siendo excepción algunas cepas de *Flavobacterium meningosepticum* y de *Neisseria gonorrhoeae*. En cuanto a los enterococos existen tres fenotipos

de resistencia: el fenotipo VanA o cepas de alto nivel de resistencia tanto a vancomicina como a teicoplanina; el fenotipo VanB sensibles a teicoplanina y con niveles variables a vancomicina y el fenotipo VanC resistente a bajo nivel sólo a vancomicina.<sup>15</sup>

Macrólidos y lincosamidas: Estos grupos de antibióticos por ser hidrofóbicos atraviesan mal la membrana externa por lo que los bacilos gram negativos presentan resistencia natural, aunque modificaciones en las nuevas moléculas como azitromicina parecen disminuir este hecho. Existen además mecanismos de exclusión activa. La resistencia por metilaciones que impiden la unión de los fármacos al ribosoma 50S está codificada por plásmidos en transposones, es cruzada y puede ser inducible (en macrólidos de 14 y 15 átomos) o constitutiva (también para los de 16 y lincosamidas) y aparece en cocos gram positivos y bacilos anaerobios gram positivos y negativos; también la producción de enzimas transferasas puede determinar resistencia de estafilococos para lincomicina y clindamicina.<sup>13</sup>

Quinolonas: La resistencia está relacionada con la diana principal de acción, la topoisomerasa II o girasa y fundamentalmente en la subunidad A del ribosoma. No obstante cada vez se da más importancia a la presencia de mecanismos de expulsión que impiden alcanzar concentraciones intracelulares de antibiótico suficientes o dificultan el paso a través de la

pared; recientemente se ha descrito también la presencia de plásmidos e incluso una cepa de *Klebsiella pneumoniae* con un plásmido de resistencia múltiple que incluía también quinolonas.<sup>13</sup>

Tetraciclinas: Aunque existe resistencia por modificación enzimática codificada por transposones, el mecanismo de resistencia más importante en enterobacterias es por expulsión activa y en gram positivos y en algunos gram negativos como *Neisseria*, *Haemophilus*, *Campylobacter* y *Bacteroides*, por producción de proteínas citoplásmicas que impiden la unión de la molécula al ribosoma. En general la resistencia es cruzada para todas las tetraciclinas.<sup>13</sup>

Cloranfenicol: La modificación enzimática (plasmídica o cromosómica es el mecanismo de resistencia principal, aunque también se han detectado cambios en la permeabilidad de la membrana externa.<sup>17</sup>

#### *Minthostachys mollis*

Se denomina en la lengua Quechua “muña”, y en la Aymara tiene dos nombres: “Coa” y “Huaycha”. Debido a sus características semejantes al póleo y orégano, los españoles la denominaban póleo silvestre. Otros nombres vulgares con los que se le conoce a esta planta son: "muña 30 negra", "polco silvestre", "coz", "muña-muña", "arash muña", "kon" "orccomuña".<sup>18, 19</sup>

La muña es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3500 m.s.n.m. <sup>19</sup>

Habita entre los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, comportándose como tal; existe en gran abundancia. Así como es una planta hemicriptófila que durante la época más fría del invierno y seco desaparecen sus órganos aéreos para brotar nuevamente con las primeras lluvias de la primavera. <sup>20</sup>

Alcanza una altura de 0.80 a 1.50 m, desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, crece en lugares cercanos a acequias, manantiales sin tener grandes requerimientos de agua.

Se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, bien drenados, con buena retención de humedad, con un pH entre 5-8 y un clima con elevada luminosidad, florece en época de lluvia, se multiplica por semilla y por codo.<sup>21</sup>

#### Clasificación sistemática

Reino : Vegetal	Familia : lamiaceae (labiatae)
Sub reino : Embryophyta	Género : Minthostachys
División : Magnoliophyta	Especie : Minthostachys mollis
Clase : Magnoliopsida	(Spach) Griseb
Subclase : Methachlamydeae	Nombre vulgar : “Muña”
Orden : Tubiflorae	

## Características botánicas del género en estudio

Es una planta arbustiva, leñosa, frondosa en la parte superior, de aspecto general glauco, erecta y pubescente, su tallo es ramificado desde la base. La hoja es el elemento vegetativo simple ligeramente aserrado, carece de estípulas, cortamente pedunculares de filotaxia opuesta. Su peciolo mide entre 4 y 6 mm de largo, pubescente acanalada en la parte superior y convexo en la parte inferior, es aquí donde se deposita la mayor cantidad de aceite, que al estrujarlos dejan sentir su aroma característico. Las flores son hermafroditas. El limbo es ovoidal 1.7 a 2.5 cm en su mayor ancho, y de 2 a 4 cm de largo; su base es atenuada de bordes aserrados, ápice agudo de nerviación penninervia. El limbo es pubescente tanto en el haz como en el envés, debido a lo cual la hoja presenta una coloración verde pálida; sus nervaduras secundarias son muy desarrolladas y ligeramente reticuladas. El cáliz soldado con 13 venaciones terminado en 5 lóbulos dentados casi iguales entre sí con pelos cerellosos en la base, la corola raramente es de 6 mm de largo, dividida en 2 labios: 2 lóbulos o labio superior y 3 lóbulos o labio inferior. Los pelos de las partes aéreas, o sea de las hojas y tallos, parece que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial, de aquí que al estrujarlos dejen sentir su aroma o el sabor picante que da una impresión de frío que es característico. Las flores son pequeñas, reunidas en verticilos falsos, situados en la parte superior de las ramas con pedúnculos cortos, 2 en cada axila.<sup>22</sup>

## II.2. Antecedentes

**MORA & Col. (2009-Venezuela)** Examinaron y analizaron los componentes químicos del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb var Vaughth. Recogidos en enero del 2008 en la localidad de Tuñame, estado de Trujillo, Venezuela, fueron separados e identificados por el análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Trece componentes (98.5 % de la muestra) fueron identificados por comparación. Los dos componentes principales son pulegona (55.2 %) y trans-mentona (31.5 %). El aceite esencial mostró efecto inhibitorio significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (4 ug/ml).<sup>23</sup>

**ALCALÁ & Col. (2011- Lima)** Demostró el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación con el Fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. El efecto antimicótico se estudió midiendo 80 halos de inhibición distribuidos en 5 grupos mediante el método Kirby-Bauer. Se utilizó una cepa clínica de *Candida albicans*. Los grupos de estudio fueron grupo muña 25 % (GM25 %), grupo muña 50 % (GM50 %), grupo muña 100 % (GM100 %), un grupo control positivo (Fluconazol), y un grupo control negativo (aceite mineral). El análisis estadístico se realizó mediante la Prueba de Kruskal-Wallis y el Test de

Dunn usando el paquete SPSS v.17.0. Se consideró un nivel de significancia  $< 0,05$ . Se obtuvo La mediana de los halos de inhibición del GM25 % fue de 32,00 mm (31,00 a 33,75); del GM50 %: 40,00 mm (39,25 a 41,00); del GM100 %: 46,80 mm (46,00 a 48,00), y del grupo Fluconazol: 39,00 mm (38,00 a 40,75). No se obtuvo halos de inhibición en el grupo control negativo. Se encontró diferencia significativa entre GM25 %, GM100 % y el grupo Fluconazol ( $p < 0,001$ ), más no entre este último y GM50 % ( $p > 0,05$ ). Se concluyó que el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (al 100 %) tuvo mayor efecto contra la *Candida albicans* que el Fluconazol; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25 %, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50 %.<sup>24</sup>

**CARHUAPOMA & Col. (2009-Lima)** Determinó la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antibacteriana se determinó por el método de excavación placa cultivo; resultando en orden de sensibilidad, *Shigella dysenteriae* es la que presenta más sensibilidad al extracto con un promedio de 21,41 mm, seguido de *Helicobacter pylori* con 17,07 mm, *Salmonella typhi* con 14,25 mm y la que menos sensibilidad presentó fue *Pseudomonas aeruginosa* con 11,45 mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para *H. pylori*



se determinó por el método de dilución en microplacas, resultando 2 µg/mL. Para las demás bacterias se determinó por el método de dilución, siendo para *S. dysenteriae* 4 µg/mL, *S. typhi* 4 µg/mL, y *P. aeruginosa* 9 µg/mL de CMI y 10 µg/mL de CMB. Observándose que a mayor concentración es mayor el efecto inhibitorio; es así que la concentración 450 µg/mL produjo en promedio 22,48 mm de halo de inhibición, mientras que para una concentración de 4,5 µg/mL fue de 11,99 mm en la prueba de Duncan. Los porcentajes de inhibición comparados con ciprofloxacino, fueron: *H. pylori* 177,27; *S. dysenteriae* 126,11; *S. typhi* 63,44 y *P. aeruginosa* 42,29 lo que estaría demostrando que el extracto acuoso tiene mayor actividad que el ciprofloxacino; esto posiblemente se deba a que los constituyentes del extracto de *Minthostachys mollis*, como el timol, acetato de timol, metileugenol, pulegona, mentona, limoneno, linalol, entre otros, actúan en sinergismo; y comparado con cloranfenicol: *P. aeruginosa* de 225,56; *S. dysenteriae* 171,97; *S. typhi* 135,95 y *H. pylori* 92,86 a una concentración de 450 µg/mL del extracto.<sup>24</sup>

**AZAÑA I. & Col. (2010-Lima)** El extracto acuoso de *Minthostachys mollis* “muña” 100 % presentó una efectividad antibacteriana, tanto cuantitativamente como cualitativamente mayor, en comparación a las diluciones del 50 % y 25 % frente a las cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular.<sup>25</sup>

**PAREDES N. & Col. (2009-Lima)**, Determinó la efectividad antibacteriana salival mixta de las infusiones a base de té verde, y té verde y muña, no encontró efectividad en la infusión a base de muña, y que existían diferencias significativas entre las medias de las muestras. Así mismo, la infusión a base de té verde resultó ser similar en cuanto a su efectividad antibacteriana con respecto a la Clorhexidina.

De los resultados obtenidos se concluye que se ha evidenciado la efectividad antibacteriana de una infusión a base de té verde y muña sobre la flora salival mixta, sin embargo, se observó una efectividad antibacteriana menor con respecto a la infusión a base de té verde y la Clorhexidina. Debido a los resultados del presente estudio que demuestran la efectividad del té verde similar a la Clorhexidina.<sup>27</sup>

## CAPITULO III METODOLOGIA

### III.1 DISEÑO DE ESTUDIO Descriptivo.

### III.2.Variables, Dimensiones e Indicadores

	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de Medición
<b>Variable Independiente</b>					
Extracto Acuoso de Muña	Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, por diversos procedimientos teniendo como compuesto liquido agua.	Sustancia a base de Muña obtenida a partir de la maceración de la planta en agua.	Maceración	Cambio de color del líquido	Nominal
Extracto Etanolico de Muña	Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, por diversos procedimientos teniendo como compuesto liquido etanol.	Sustancia a base de Muña obtenida a partir de la maceración de la planta en etanol.	Maceración	Cambio de color del líquido	Nominal
<b>Variable Dependiente</b>					
Actividad Antibacteriana	Capacidad de una sustancia para eliminar microorganismos o inhibir su crecimiento, tales como bacterias, hongos o parásitos.	Capacidad del extracto de muña para inhibir el crecimiento del <i>Staphylococcus aureus</i>	Tiene actividad antibacteriana  No tiene actividad antibacteriana	No se produce crecimiento bacteriano  Se produce crecimiento bacteriano	Nominal

### III.3 Procedimiento y técnicas

#### **Obtención del Extracto:**

El primer paso para empezar el análisis es moler toda la planta hasta procurar que la muestra sea lo más fina posible, el fundamento por el cual se realiza esta operación es porque a mayor superficie en contacto con el solvente se podría obtener mayor cantidad de extracción de metabólicos de la planta.

Luego de ello el producto tiene que ser pesado primero 5 gramos de material de planta y luego colocarlo en dos solventes diferentes en este caso se usó etanol de 96° y agua destilada, etanol en uno y en el otro agua destilada cada uno de ellos con una medida de 100ml es decir se obtiene una suspensión al 5% con relación al extracto, en el caso del agua destilada se coloca el agua destilada caliente para que si la solución está saturada o sobresaturada, al aplicar calor la solución aceptará mayor obtención de metabolitos.

Las razones por las que uso estos dos solventes es porque el agua por su propiedad de solvente universal nos iba a dar la posibilidad de obtener la mayor cantidad de metabolitos, pero existen metabolitos que no puede extraer el agua y para ello se usaba el etanol ya que este no permitía obtener metabolitos que el agua no, y por ello es que obtuve la mayor

cantidad de metabolitos, es en el caso del agua se deja solamente un día, por ello también se aplicaba agua caliente, para acelerar el proceso de extracción de metabolitos, y también por la fácil putrefacción del material en el interior del frasco; y luego se filtra. Para el etanol se puede dejar 5 días porque a diferencia del agua el etanol actúa como preservante y a mayor contacto del solvente con el material mayor obtención de metabolitos; y luego éste también se filtra.

Luego se seca el filtrado en el caso de los extractos etanolicos el filtrado se seca en rotavapor que es un equipo que crea un vacío con menor presión atmosférica y permite que el líquido en este caso suspensión de etanol se evapore más rápido, sabiendo que a la presión atmosférica normal el etanol hierve a 78°C con el rotavapor éste solamente tendrá su punto de ebullición a solamente 40°C permitiéndome así el ahorro de tiempo, y también evitar la pérdida de más metabolitos por la exposición a altas temperaturas.

Luego de secar bien todos los extractos, el siguiente paso a realizar es el de reconstituir con 5ml de agua destilada el material que había sido secado.

Posteriormente también mide a que concentración se encuentran nuestros extractos obtenidos.

**Etapa de análisis:**

Lo que se hace en esta fase es a lo que en microbiología se puede llamar un antibiograma o prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.

**Método Kirby-Bauer:**

El método de difusión en agar, es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

**Escala de Mc Farland:**

Los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos, para asegurar la densidad correcta se puede controlar usando espectrofotómetros.

Los estándares pueden ser visualmente comparados con suspensiones de bacterias en salina estéril o en caldos.

Si la suspensión es demasiado turbia, puede añadirse diluyente, y si no es lo suficiente turbia, se puede agregar más bacterias. La ventaja es que no es necesario incubar ni usar equipo especial para estimar el número de bacterias.

La desventaja de este método es que no discrimina a las bacterias vivas de las muertas en la solución, por lo que se puede sobreestimar la población de bacterias.

Casos específicos en los que se usa es en el de antibiogramas o pruebas de sensibilidad, donde es necesario para estandarizar el método y se eviten falsos positivos o negativos.

Para todo trabajo de investigación se prepara una suspensión de bacterias basadas en la escala de Mc Farland al 0,5 en turbidez que corresponde a un desarrollo de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

### **Preparación de medios de cultivo:**

Para la susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar se prepara un tipo de medio de cultivo llamado Mueller Hinton, la preparación de este se realiza diluyendo el medio en agua destilada con la proporción de 38gr en un litro de agua destilada que es lo que indica en el frasco. Posteriormente el medio de cultivo es autoclavado o también llamado esterilización con calor húmedo, además también se tiene que preparar otro medio de cultivo llamado Agar base sangre el cual se prepara con la dilución de 40gr

del medio en un litro agua destilada y luego se esteriliza; y antes de que se enfríe y se solidifique, más o menos a 45°C, se agrega 5ml de sangre humana o de carnero por cada 100 ml de medio, y automáticamente servir placas petri estériles.

El agar sangre es un medio enriquecido por no tener ningún tipo de inhibidor y así pueden crecer todo tipo de bacterias pero en este caso lo usamos para preservar nuestra cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **Obtención de los discos de sensibilidad**

Podemos obtener pequeños discos de 6mm de diámetro de papel filtro los cuales se pueden realizar fácilmente con la ayuda de un perforador luego de eso se esterilizan dichos discos y se embeben con 10ul del extracto que habíamos obtenido reconstituyéndolo y se deja secar a 37°C un día, luego de ello se prepara una suspensión de bacterias basadas en la escala de Mc Farland al 0,5 en turbidez que corresponde a un desarrollo de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml,

Luego de ello se coge una placa de Mueller Hinton y se estría con un hisopo estéril previamente embebido con la suspensión bacteriana por toda la superficie de la placa, se espera que se fije por 10 minutos y luego se agregan los pequeños discos secos con extracto y también un disco con



antibiótico como marcador de blanco antimicrobiano y se ponen a incubar las placas en una estufa a 37°C por un lapso de 18 a 24 horas que es el lapso en el cual las bacterias se desarrollaran y darán a notar por medio de halos de inhibición la actividad bactericida o no de los extractos, luego de eso se realizan las anotaciones de los resultados midiendo los halos de inhibición expresados en milímetros.

#### **III.4. Plan de Análisis de Datos**

Los resultados fueron tabulados mediante una hoja de cálculo Excel 2013. Se determinó rendimiento de los solventes, comparación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a la actividad del blanco de antibiótico (Amoxicilina 20ug + Acido Clavulánico 10ug), comparación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso frente a la actividad del blanco de antibiótico, comparación de actividad antibacteriana de ambos extractos, acuoso y etanólico, frente al blanco de antibiótico.

## **CAPITULO IV: RESULTADOS ESTADISTICOS**

### **IV.1. Resultados**

Durante el periodo de tiempo comprendido entre marzo y abril del 2018, se realizó la experimentación y evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos acuosos y etanólicos de la planta *Minthostachys mollis* (muña) contra *Staphylococcus aureus* atcc 25923, con un blanco de antibiótico Amoxicilina 20ug + Acido Clavulánico 10ug, obteniéndose los siguientes resultados.

**TABLA N°01**

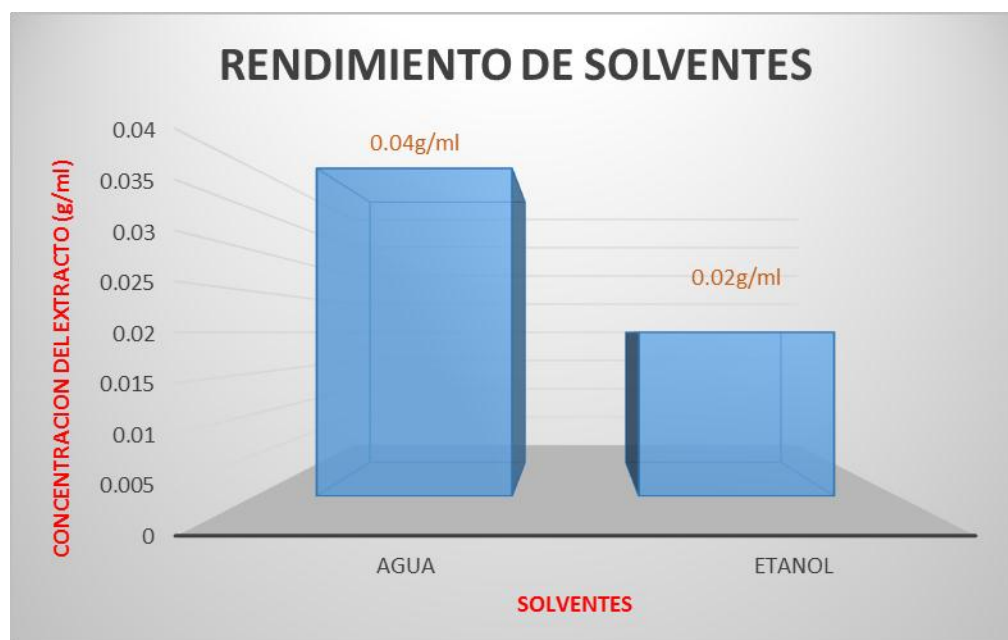
**RENDIMIENTO DE LOS SOLVENTES: AGUA, ETANOL.**

<b>RENDIMIENTO DE SOLVENTES</b>	
<b>SOLVENTES</b>	<b>CONCENTRACION DEL EXTRACTO</b>
<b>AGUA</b>	<b>0.04g/ml</b>
<b>ETANOL</b>	<b>0.02g/ml</b>

Fuente: Datos del autor

**GRÁFICO N°01**

**RENDIMIENTO DE LOS SOLVENTES: AGUA, ETANOL.**



Fuente: Datos del autor

**TABLA N°02**

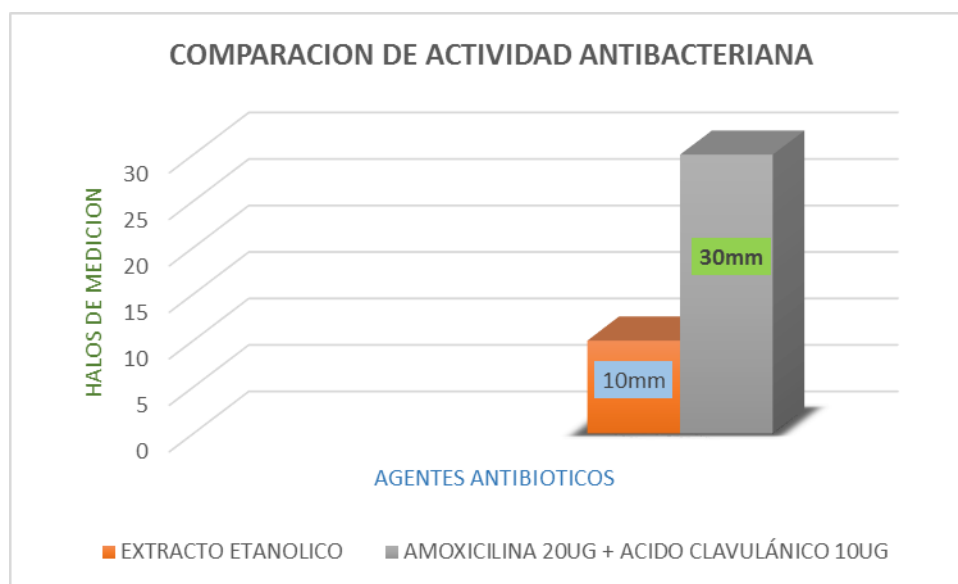
**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO FRENTE A LA ACTIVIDAD DEL BLANCO DE ANTIBIÓTICO (AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG).**

<b>COMPARACION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA</b>	
<b>AGENTES ANTIBIOTICOS</b>	<b>HALOS DE MEDICION</b>
<b>EXTRACTO ETANOLICO</b>	<b>10mm</b>
<b>AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG</b>	<b>30mm</b>

Fuente: Datos del autor

**GRÁFICO N°02**

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO FRENTE A LA ACTIVIDAD DEL BLANCO DE ANTIBIÓTICO (AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG).**



Fuente: Datos del autor

**TABLA N°03**

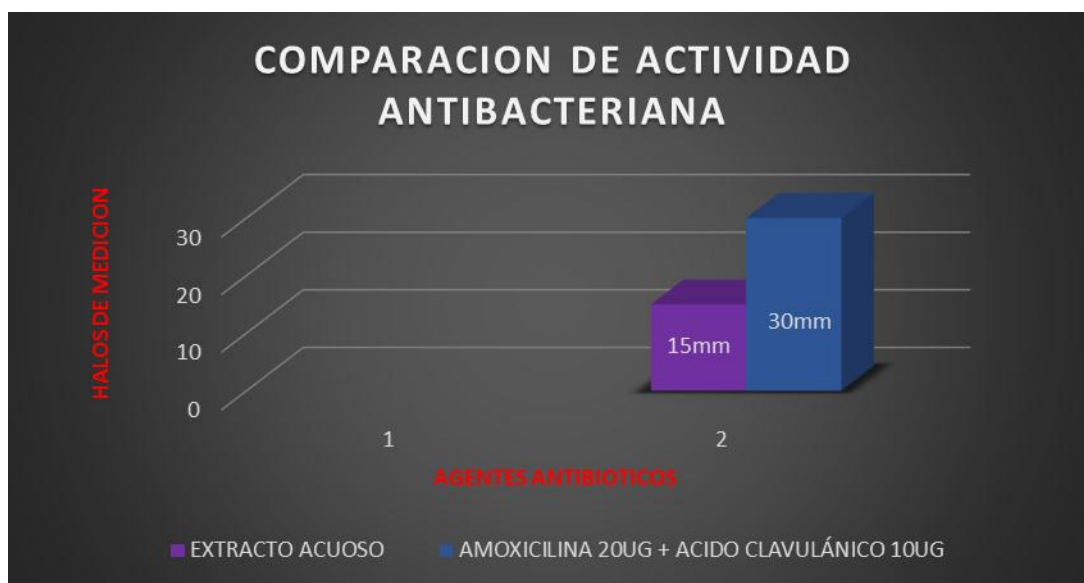
**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ACUOSO FRENTE A LA ACTIVIDAD DEL BLANCO DE ANTIBIÓTICO (AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG).**

COMPARACION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	
AGENTES ANTIBIOTICOS	HALOS DE MEDICION
EXTRACTO ACUOSO	15
AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG	30

Fuente: Datos del autor

**GRÁFICO N°03**

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ACUOSO FRENTE A LA ACTIVIDAD DEL BLANCO DE ANTIBIÓTICO (AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG).**



Fuente: Datos del autor

**TABLA N°04**

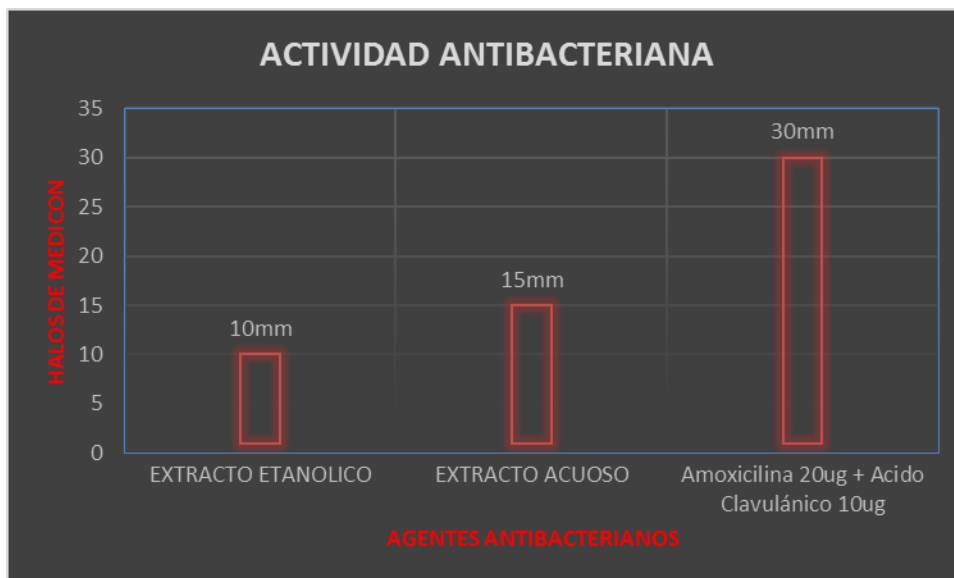
**COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO, MEDIANTE LOS HALOS DE MEDICION, FRENTE AL BLANCO DE ANTIBIÓTICO (AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG).**

<b>ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA</b>	
<b>AGENTES ANTIBACTERIANOS</b>	<b>HALOS DE MEDICION</b>
EXTRACTO ETANOLICO	10 mm
EXTRACTO ACUOSO	15 mm
Amoxicilina 20ug + Acido Clavulánico	30 mm

Fuente: Datos del autor

**GRÁFICO N°04**

**COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO, MEDIANTE LOS HALOS DE MEDICION, FRENTE AL BLANCO DE ANTIBIÓTICO (AMOXICILINA 20UG + ACIDO CLAVULÁNICO 10UG).**



Fuente: Datos del autor

## IV.2 DISCUSION DE RESULTADOS

Se obtuvieron resultados positivos en ambos casos, tanto en extracto acuoso como en extracto etanolico, lo cual confirma los resultados obtenidos en otras investigaciones tales como:

INGA A. Y GUERRA B. (2000), demostraron mediante un estudio las propiedades bactericidas/bacteriostáticas del extracto acuoso y etanólico de *Minthostachys mollis* frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. cereus* MC, *Salmonella typhi*, *S. sonnei* MC, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031, además de la acción fungistático/fungicida para *Fusarium moniliforme* y *Aspergillus niger*.

Además también se han publicado trabajos de investigación relacionados a la presencia de flavonoides y evidente actividad antibacteriana, como el realizado por:

RAVO Y COL (2004) realizaron una investigación para estudiar la presencia de flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Concluyendo que el *Minthostachys mollis* sí contiene flavonoides y que presenta actividad antibacteriana como consecuencia de la presencia de aquellos.

Inclusive hay trabajos en los cuales se realizaron mayores diluciones seriadas con presencia de actividad bactericida a menores concentraciones:

PALACIOS Y COL (2004) evaluaron la capacidad bactericida in vitro de preparados a base de *Minthostachys mollis* y agua destilada a varias concentraciones (2, 4, 6 y 8 gr), frente a *Streptococcus* orales. Encontraron muy poca efectividad antibacteriana.

En la presente investigación se trabajó con cepa estándar de *Staphylococcus aureus* atcc 25923, usando el método de difusión estandarizado por Kirby-Bauer coincidente con:

Díaz-González. En la prueba de susceptibilidad con las diluciones del extracto acuoso de *Minthostachys mollis* se empleó el método de Difusión, estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados Unidos en 1966, se demuestra la gran utilidad de los ensayos in vitro, el cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros.

Investigaciones como las de Díaz, Cano, Guiza – Rincón y Mora avalan el buen funcionamiento del método Difusión en agar con disco en trabajos similares de *Minthostachys mollis*.



### **IV.3 CONCLUSIONES:**

- Tanto el extracto acuoso como el etanólico de *Minthostachys mollis*, tiene efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* atcc 25923
- El extracto acuoso de *minthostachys mollis* (muña) a la concentración 0.04g/ml, obtenemos como halo de medición (inhibición): 15mm.
- El extracto etanólico de *minthostachys mollis* (muña) a la concentración 0.02g/ml, obtenemos como halo de medición (inhibición): 10mm.

### **IV.4 RECOMENDACIONES:**

- Para ampliar investigación y posterior producción de nuevos fármacos a base de *minthostachys mollis*, se recomienda purificación del extracto y obtención del metabolito secundario responsable de la actividad antibacteriana.

- Se recomienda usar otros solventes para la mayor obtención y variabilidad de metabolitos secundarios.
- Además recomendamos evaluar la actividad antibacteriana de *minthostachys mollis*, frente a otros microorganismos como pueden ser, hongos o bacterias de otro tipo ( bacilos)
- Recomendamos ampliar la investigación realizando otros extractos con la incorporación de otra planta con actividad antibacteriana, para un posible sinergismo entre ellas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Hiramatsu K, Hanki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemoter.* 1997; 40: 135-136.
- 2) Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de Resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *ACIN.* 2008; 12(3)
- 3) Tenover F, Weigel L, Appelbaum P, McDougal L, Chaitran J, McAllister S, Clark N. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Jan 2004; 275-280.
- 4) Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 357: 1225-1240.
- 5) Kloss WE, Schleir KH, Goirtz F. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. *The Prokaryotes*, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag; 1992.
- 6) Kloss We, Bamerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murra PR, Baron EJ, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM PressM;1995.
- 7) Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998; 339: 520-532.
- 8) Moreillon P, Que Y, Glauser M. *Staphylococcus aureus*. In Mandell GL, Bennett JE, Olin R. *Principles and practice of infectious diseases*. 6a ed. Philadelphia, Churchill Livingston; 2005.
- 9) Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Infect.* 2003; 111: 1265-1273.
- 10) Hiramatsu K, Cui L, Kuorda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 486-493.

- 11) Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Foulter VG. Staphylococci in human disease. 2nd Edition. Wiley-Blackwell; 2009.
- 12) Martínez Freijo P. Integrones: nueva causa de resistencia a antibióticos. Rev Esp Quimioterapia 1997; 10: 191-194.
- 13) García Rodríguez JA, García Sánchez E. Resistencias bacterianas y antibioterapia. En: Eficacia in vivo Eficacia in vitro. Madrid-Barcelona: ed Doyma, S.A., 1997; 39-50.
- 14) Gómez-Lus R, Gil J, Castillo J, Rubio MC. Impacto de los inhibidores de betalactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes. En: Betalactamasas: su importancia para el clínico. Madrid: Smith Kline&French S.A.E., 1992; 109-127
- 15) Navarro F. Mecanismos de resistencia a glucopéptidos. Enferm Infec Microbiol Clin 1996; 14: 317-323.
- 16) Muñoz Bellido JL. Mecanismo de resistencia a quinolonas. Rev Esp Quimioterapia 1997; 10: 348-349.
- 17) García Sánchez JE, Fresnadillo MJ, García García MI, Muñoz Bellido JL. Resistencia a los antimicrobianos que no inhiben la síntesis de la pared celular. En: Tratamiento Antimicrobiano. Madrid. Emisa 1997; 35-50.
- 18) Bardales A, Yarlequé M, Rueda L. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de *Minthostachys mollis* "Muña". I Congreso Internacional de Biología - XIII Congreso Nacional de Biología- VII Simposium de Educación en Ciencias Biológicas. Lima: Perú; 1999
- 19) Sotta N. Plantas aromáticas y medicinales de la. región Arequipa. 1ª edición. Arequipa: Editorial Akuaella; 2000: 99-100.
- 20) Oviedo F. Ensayos toxicológicos preliminares con aceite esencial de 'muña'. Tesis de bachiller. Cuzco: UNSAAC; 1979
- 21) Morales A. Estudio de la extracción y características de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y de *S. Sagittata* (hierba buena). Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNALM; 1973

- 22) Inga A y Guerra B. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. Tesis de bachiller para Químico Farmacéutico. Lima: UNMSM; 2000
- 23) Mora F.et al. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil *Minthostachys mollis* from Venezuela Andes. *Natural Product Communications*, Mora F.et al, 2009; 4(7): 997-1000.
- 24) Alcalá-Marcos Katherine M, Alvarado-Gamarra A. Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el Fluconazol en cultivo de *Candida albicans*, Universidad Nacional Federico Villarreal. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, vol. 16, núm. 2, 2011, pp. 83-86, Federación Latinoamericana de Sociedades Científicas de Estudiantes de Medicina Organismo Internacional.
- 25) Isaac Azaña Espinoza, Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico, Tesis de bachiller para Cirujano Dentista, Facultad de Odontología-UNMSM 2010.
- 26) Mario Carhuapoma, Sofía López, Mirtha Roque, Billie Velapatiño, Carlos Bell, Delia Whu, Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb "ruyaq muña", Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM. *Ciencia e investigación* 2009;12(2)83-89
- 27) Ney Alberto Paredes Sampen, Efectividad antibacteriana IN VITRO de una infusión a base de *Camellia sinensis* y *Minthostachys mollis* sobre flora salival mixta. Tesis de bachiller para Cirujano Dentista, Facultad de Odontología-UNMSM 2009.

# ANEXOS

## Anexo N° 1

### MATERIALES USADOS Y METODOLOGÍA:

**Estufa:**



**Autoclave:**



## Anexo n° 2:

PROCESO:

Reconstitución del  
extracto con 5ml de  
Agua caliente;



Depositando el reconstituido en viales:





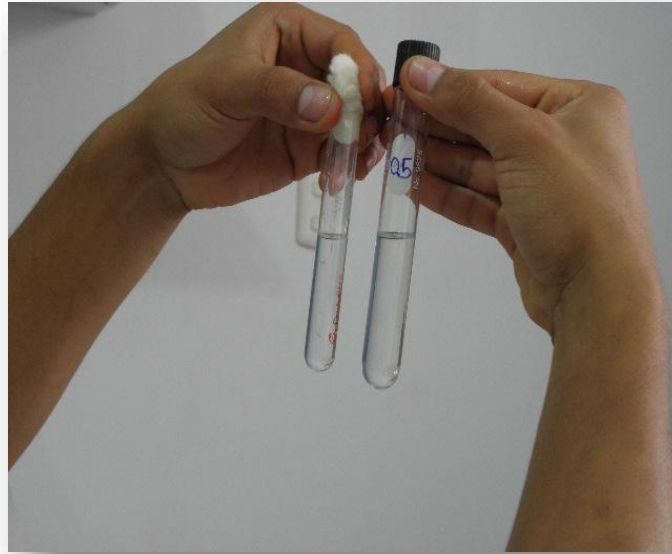
**Rotulando el vial:**



**Evaluando la Concentración del extracto- Balanza Analítica:**



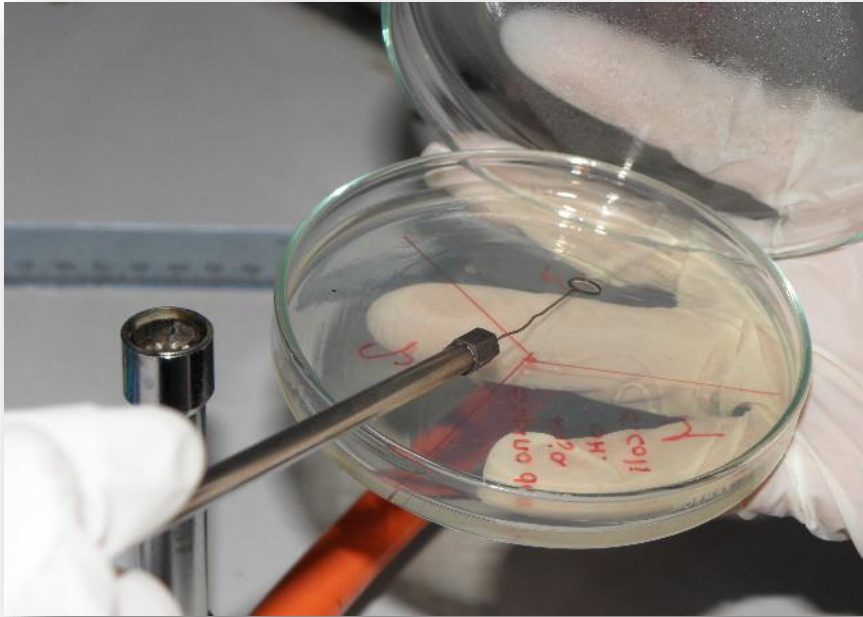
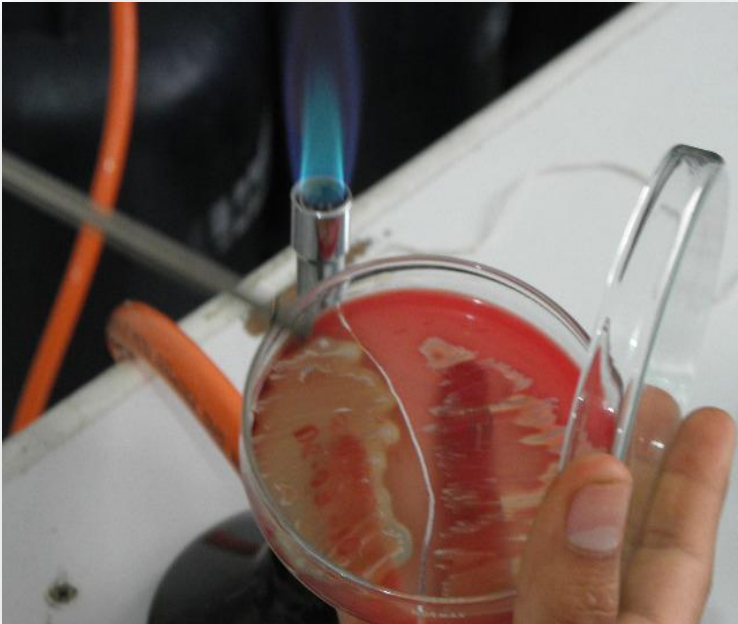
**Escala de turbidez con McFarland:**



**Preparando medios de cultivo:**



**Medio de cultivo con las bacterias:**



**Anexo n°3:**

RESULTADOS DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO:

