



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

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS:

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
EXTRACTOS DE MUÑA (*Clinopodium bolivianum*)
OBTENIDA POR DOS MÉTODOS, SOBRE LA CEPA DE
Staphylococcus aureus ATCC 25923 EN LOS
LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS
FILIAL AREQUIPA 2016**

**PRESENTADO POR LA BACHILLER:
MOLLO CHOQUE, EDITD ROXANA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AREQUIPA –PERÚ
2017**

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a Dios nuestro padre celestial, por llenarme de salud, sabiduría y muchas bendiciones que han permitido culminar tan anhelado objetivo.

A mis padres AMADOR y FLOR DE MARÍA, por su esfuerzo, apoyo y confianza, que fueron mi fortaleza para continuar mi carrera profesional; gracias por todo ello y mucho más...

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Alas Peruanas, en especial al personal que labora en el laboratorio de ciencias naturales por toda su paciencia, apoyo y colaboración.

A la plana docente de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas, por las enseñanzas brindadas a lo largo de toda mi carrera profesional.

A mi asesora de tesis la Químico Farmacéutico Shanery Marcilla Truyenque, por su apoyo incondicional y dedicación.

A todas las mis amistades que de una u otra forma me apoyaron durante el transcurso de la ejecución de este proyecto.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña) obtenidos por dos métodos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se inició con la recolección del material vegetal, en el mes de setiembre 2016, distrito de Pocsi (3045 m.s.n.m.) Arequipa - Perú, se realizó el lavado y secado del material vegetal, para proseguir con la obtención del extracto por el método de hidrodestilación e infusión, para realizar la evaluación de la actividad antibacteriana.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en disco (Kirby Bauer), y se utilizó el método de dilución de caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM).

Según la prueba de difusión en disco (Kirby Bauer), el extracto obtenido por el método de hidrodestilación (aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*), presentó un halo de 10 mm sobre a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que el extracto obtenido por el método de infusión no presentó un halo de inhibición.

La concentración mínima inhibitoria del extracto de *Clinopodium bolivianum* (muña) frente la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtenida por

hidrodestilación fue de 6.25% y la CIM del extracto de infusión fue de 12.5% frente a la misma bacteria. Además, la concentración mínima bactericida del extracto de *Clinopodium bolivianum* (muña) frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtenida por hidrodestilación e infusión fue de 25% en ambos extractos.

En conclusión se determinó que ambos extractos presentan efecto antibacteriano, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pero que además existe diferencia en los resultados, donde se muestra que el extracto por hidrodestilación tiene una menor CIM y CBM, que del método de infusión, lo cual, podría indicar la influencia que existe en el uso de diferentes métodos de extracción.

Palabras claves: *Clinopodium bolivianum*, hidrodestilación, *Staphylococcus aureus*, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida.

ABSTRACT

In the present research work was evaluated the antibacterial activity of extracts of *Clinopodium bolivianum* (muña) obtained by two methods against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was evaluated. Beginning with the collection of plant material, in the district of Pocsi, Arequipa – Perú (3045 meters above sea level), on September 2016. The selection, washing and drying of the plant material were carried out in order to proceed with the extraction of the extract by the hydrodistillation and infusion method, in order to evaluate the antibacterial activity.

The evaluation of the antibacterial activity was done by the disc diffusion method (Kirby Bauer) and the broth dilution method. The broth dilution method was use to determine, the minimum inhibitory concentration (CIM) and the minimum bactericidal concentration (CBM).

According to the disc diffusion method (Kirby Bauer), the extract obtained by the hydrodistillation method (essential oil of *Clinopodium bolivianum*), presents a halo with a diameter 10 mm on the strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, while the extract obtained by the infusion method did not present an inhibition halo.

The minimum inhibitory concentration of *Clinopodium bolivianum* extract (muña) against *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923, obtained by hydrodistillation was 6.25% and the CIM of the infusion extract was 12.5% compared to the same

bacteria. In addition, the minimum bactericidal concentration of the extract of *Clinopodium bolivianum* (muña) against the strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtained by hydrodistillation and infusion were 25% in both extracts.

In conclusion, it was determined that both extracts present an antibacterial effect against strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, but there is also a difference in the results, where it is shown that the extract by hydrodistillation has a lower CIM and CBM than the infusion method. This could indicate the influence that exists in the use of different methods of extraction.

Key words: *Clinopodium bolivianum*, hydrodistillation, *Staphylococcus aureus*, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration

ÍNDICE

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
ÍNDICE DE CUADROS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE GRÁFICAS	13
ÍNDICE DE TABLAS.....	14
ÍNDICE DE ANEXOS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	16

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1 Descripción de la realidad problemática.....	01
1.2 Delimitaciones y definición del problema.....	02
1.2.1 Delimitaciones.....	02
1.2.2 Definición del problema.....	03
1.3 Formulación del problema a investigar	03
1.3.1 Problema principal	03
1.3.2 Subproblemas	03
1.4 Objetivo de la investigación.....	04
1.4.1 Objetivo general	04
1.4.2 Objetivos específicos	04
1.5 Hipótesis de la investigación.....	04
1.6 Variables e indicadores.....	05
1.7 Justificación e importancia de la investigación	05
1.8 Limitaciones de la investigación.....	06
1.9 Tipo y nivel de investigación	06
1.9.1 Tipo de investigación.....	06
1.9.2 Nivel de investigación.....	06
1.10 Método y diseño de la investigación.....	07
1.10.1 Método de la investigación	07
1.10.2 Diseño de la investigación.....	17
1.11 Técnicas e instrumentos de recolección de información	18
1.12 Cobertura del estudio.....	18
1.12.1 Universo.....	18
1.12.2 Muestra	18

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos	19
2.2 Marco conceptual.....	22
2.2.1. <i>Clinopodium bolivianum</i> “Muña”	22
2.2.2 Métodos de extracción	24
2.2.3 Actividad antibacteriana o antimicrobiana	27
2.2.4 Grupos químicos aislados de plantas con acción antimicrobiana	29
2.2.5 Compuestos naturales con actividad frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.2.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	31

CAPÍTULO III

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Población y muestra.....	36
3.2 Nivel de confianza y grado de significancia	36
3.3 Tamaño de la muestra representativa	36
3.4 Análisis e interpretación de resultados	36

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones	43
4.2 Recomendaciones	45
Bibliografía.....	46
Anexos.....	49
Glosario de términos.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Operacionalización de la variable.....	05
Cuadro 2. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Clinopodium bolivianum</i> (muña).....	49
Figura 2: Recolección de <i>Clinopodium bolivianum</i> (muña).....	49
Figura 3: Determinación de densidad	50
Figura 4: Determinación de pH	50
Figura 5: Determinación de Índice de refracción	50
Figura 6: Estandarización de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 con escala de McFarland.....	51
Figura 7: Halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	51
Figura 8: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).....	52
Figura 9: Determinación de la concentración mínima bactericida (CBM)	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N°1: Análisis fisicoquímicos de los extractos de muña (<i>Clinopodium bolivianum</i>)	38
Gráfica N°2: Análisis de susceptibilidad antibacteriana de los extractos de muña contra la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	40
Gráfica N° 3: Determinación de concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) de los extractos de muña.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Características organolépticas de los extractos de muña (<i>Clinopodium bolivianum</i>).....	37
Tabla N°02: Análisis físico químicos de los extractos de muña (<i>Clinopodium bolivianum</i>)	38
Tabla N° 03: Análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos de muña contra la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	39
Tabla N° 04: Porcentaje del análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos de muña contra la frente de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	41
Tabla N° 05: Determinación de concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) de los extractos de muña	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 01: Identificación y recolección de la muña.....	49
Anexo N°02:Determinación fisicoquímica del extracto de <i>Clinopodium bolivianum</i>	50
Anexo N° 03Determinación de sensibilidad de los extractos de <i>clinopodium bolivianum</i> ..	51
Anexo N° 04: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).....	52
Anexo N° 05: Determinación de la concentración mínima bactericida (CBM).....	53
Anexo N° 06: Calibración de peachímetro.....	54
Anexo N° 07: Medios de cultivo	55
Anexo N° 08: Preparación del inóculo.....	58
Anexo N°09: Escala de McFarland	59
Anexo N° 10: Discos de sensibilidad antibacteriana	60
Anexo N° 11: Equipo de destilación artesanal	61
Anexo N° 12: Estadístico de sensibilidad de cepa atcc frente a <i>staphylococcus aureus</i> ..	62
Anexo N° 13: Estadístico de densidades de los extractos de muña (<i>clinopodium bolivianum</i>).....	63
Anexo N° 14: Estadístico de pH de los extractos de muña (<i>clinopodium bolivianum</i>) ...	64
Anexo N° 15: Estadístico de índice de refracción de los extractos de muña (<i>clinopodium bolivianum</i>).....	65
Anexo N° 16: Certificado de cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	66
Anexo N° 17: Certificado botánico	67

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de la piel son causadas por bacterias piógenas, principalmente estafilococos y estreptococos. Representan el diagnóstico dermatológico más frecuente y la forma más común es el impétigo. El tratamiento de esta patología puede resultar de elevado costo, por ello que se recurre a la medicina tradicional. Sin embargo, la falta de validación del efecto que se les atribuye, mediante métodos científicos, es una problemática que impacta a la población consumidora.

Clinopodium bolivianum (muña) es una de las especies vegetales que se utilizan para el tratamiento de infecciones en heridas, ya que contienen los metabolitos como: pulegona, linalol, mentona, isomentona, monoterpenos, limoneno; según bibliografía los monoterpenos son compuestos cíclicos que presentan propiedades terapéuticas como el efecto antibacteriano; además la calidad y concentración de estos metabolitos va a depender del método de extracción. Los métodos pueden ser: extracción mecánica, por destilación y con disolventes. Dichos métodos utilizan diferentes equipos, temperaturas y tiempo de extracción, cuya diferencia motivó a realizar la evaluación del extracto obtenido por el método de hidrodestilación, cuya técnica es muy utilizada por su alto rendimiento, por la selectividad de metabolitos en el aceite y porque no requiere tecnología sofisticada,

y la evaluación del extracto obtenido por el método de infusión que es la forma habitual de uso según la medicina empírica, cabe destacar que con este método podemos obtener un extracto con diferentes metabolitos que tengan propiedades hidrofílicas como algunos flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides y terpenoides, los cuales podrían generar el efecto antibacteriano sobre las cepas.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña) obtenidos por dos métodos frente la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Además el trabajo esta segmentado por capítulos, donde los dos primeros nos indican los conceptos, procedimientos y alcances del tema de tesis, en el tercer capítulo encontramos los análisis de los resultados, y en el cuarto capítulo las conclusiones y recomendaciones de la tesis de investigación.

CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1 Descripción de la realidad problemática:

La patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* es un fenómeno complejo debido a la variedad de factores de virulencia que puede expresar este microorganismo. Además, esta bacteria vive en un porcentaje de la población que es portadora permanente en las fosas nasales y en otro porcentaje de manera intermitente, también puede colonizar otras áreas tales como la piel y el tracto gastrointestinal. Cuando la integridad de las barreras mecánicas se rompe, estos microorganismos pueden alcanzar tejidos más profundos y producir infección, ya que el *Staphylococcus aureus* suelen considerarse como una bacteria oportunista¹. La colonización también permite la transmisión entre individuos tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad.

De las diferentes patologías producidas por *Staphylococcus aureus*, la que generalmente se trata con terapia alternativa son las infecciones cutáneas, en estos tratamientos se suelen usar métodos de extracciones como la maceración, infusión, decocción o incluso el contacto directo con las plantas, a quienes se les atribuye propiedades terapéuticas.

1 Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1º Edición. España: Editorial ICG Marge; 2009, pág. 23 – 24

Una de las especies que se utiliza en el Perú es la *Clinopodium bolivianum* (muña), conocida desde tiempos ancestrales por el uso empírico en el tratamiento de heridas infectadas², esta problemática se daría por los costos elevados de los antibacterianos sintéticos y la necesidad de la prescripción médica para su adquisición. Por ello es necesario validar el tratamiento etnobotánico de nuestras plantas medicinales, en particular del *Clinopodium bolivianum* (muña) por ser una planta silvestre y nativa en el Perú.

1.2 Delimitaciones y definición del problema

1.2.1 Delimitaciones

A. Delimitación espacial:

La presente investigación se ejecutó en los laboratorios de la Universidad Alas Peruanas filial Arequipa.

B. Delimitación temporal:

La investigación fue realizada entre los meses de setiembre a diciembre 2016.

C. Delimitación social:

Los resultados de la investigación sobre la actividad antibacteriana de los extractos de muña obtenidos por dos métodos, estarán a disposición de los profesionales de la salud, como de la población en general.

D. Delimitación conceptual:

1. **Área:** Ciencias de la Salud.

2. **Campo:** Farmacia y Bioquímica.

3. **Línea:** Fitoterapia.

4. **Tema general:** Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de muña obtenida por dos métodos sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

² Hernández E. Actividad antiviral y antiinflamatoria de plantas medicinales: aislamiento de polisacáridos activos. [Tesis]. España: Universidad Complutense Madrid; 2014, p. 108

- 5. Tema específico:** Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de muña obtenida por hidrodestilación e infusión, sobre la cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1.2.2 Definición del problema:

Staphylococcus aureus es un colonizador habitual de la piel, constituyendo una de las causas más frecuentes de infecciones en heridas³, por ser considerado como una bacteria oportunista, es importante el tratamiento adecuado de las heridas infectadas, ya que el uso de soluciones preparadas con plantas con posible efecto antibacteriano que se utiliza en medicina tradicional, podría no tener efecto o agudizar la infección.

1.3 Formulación del problema a investigar:

1.3.1 Problema principal

¿Cuáles son los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña) obtenidos por dos métodos frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

1.3.2 Subproblemas:

- ¿Cuáles son los resultados de la determinación de la sensibilidad antibacteriana mediante la prueba de difusión Kirby Bauer de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?
- ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?
- ¿Cuáles la concentración mínima bactericida de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

³Pahissa A. Op. Cit., p. 33

1.4 Objetivo de la investigación:

1.4.1 Objetivo general:

- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña) obtenidos por dos métodos, frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.4.2 Objetivos específicos:

- Determinar la sensibilidad antibacteriana mediante la prueba de difusión Kirby Bauer de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Determinar la concentración mínima bactericida de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.5 Hipótesis de la investigación:

Debido a que *Clinopodium bolivianum* (muña) posee metabolitos secundarios como los monoterpenos y sesquiterpenos, a los que se les atribuye actividad antibacteriana⁴, es probable que los extractos obtenidos por el método de hidrodestilación e infusión de muña presenten efecto antibacteriano frente a cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

⁴ Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1° Edición. Cuba: Editorial Félix Varela; 2001, p. 227

1.6 Variables e indicadores

Cuadro 1: Operacionalización de la variable

Variable	Dimensiones	Indicador	Sub indicador	Item	Escala	Categoría
Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de muña (<i>Clinopodium bolivianum</i>) obtenida por dos métodos	Extracto por método de Hidrodestilación	Difusión en disco: Kirby Bauer	Medición de halos de inhibición	3	Razón	Cuantitativa continua
		CIM	Turbidimetría		Razón	Cuantitativa continua
		CBM	Presencia/ ausencia de crecimiento bacteriano		Razón	Cuantitativa continua
	Extracto por método de Infusión	Difusión en disco: Kirby Bauer	Medición de halos de inhibición	3	Razón	Cuantitativa continua
		CIM	Turbidimetría		Razón	Cuantitativa continua
		CBM	Presencia/ ausencia de crecimiento bacteriano		Razón	Cuantitativa continua

Fuente: Elaboración propia

1.7 Justificación e importancia de la investigación:

Clinopodium bolivianum (muña) es una planta herbácea aromática de uso tradicional en medicina empírica, se utilizan las hojas frescas, molidas y hervidas, en cataplasma para el tratamiento del reumatismo; en decocción, contra la migraña, mareos, “soroche” (mal de altura o de montaña); las hojas y flores frescas en infusión para dispepsias, cólicos y para lavar heridas infectadas, de forma empírica⁵.

Por otro lado esta planta posee metabolitos como los monoterpenos y sesquiterpenos, a los que se les atribuye actividad antibacteriana. Para la obtención de extractos de plantas

⁵ Hernández E. Loc. cit. p. 108

medicinales existen diversos métodos, los cuales utilizan diferentes disolventes, temperaturas, tiempo de extracción y equipos, dichas condiciones a las que se procesan las plantas, pueden hacer que las propiedades funcionales y la proporción de los compuestos presentes en estos extractos varíen. Uno de los métodos es la extracción por destilación, el más empleado es la destilación por corriente de vapor o hidrodestilación, el cual, consiste en la vaporización (con temperatura controlada) de los componentes volátiles de mezclas líquidas, por inyección directa de una corriente de vapor⁶.

Tenemos también la extracción de sólidos con disolventes, que son los procesos más utilizados, ya que por lo general no se requiere de equipos y consiste en la separación de las proporciones medicinales activas, a partir de los tejidos de las plantas, mediante el uso de disolventes selectivos⁷. La infusión es un método que se encuentra dentro de este tipo de clasificación, es uno de los métodos más utilizados en la medicina empírica por el cual se puede extraer principios activos y sustancias acompañantes o inactivas, importantes⁸. Teniendo presente que este tipo de extracción es utilizada en la actualidad para lavados de heridas infectadas (medicina empírica).

Por lo que se propuso realizar la evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña) obtenida por dos métodos: hidrodestilación e infusión, frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.8 Limitaciones de la investigación:

Una de las limitaciones de la investigación fue la temporada de crecimiento de la planta, la cual está comprendida entre los meses de junio y setiembre

1.9 Tipo y nivel de investigación

1.9.1 Tipo de investigación:

Investigación pre-experimental

1.9.2 Nivel de investigación:

Nivel de investigación laboratorio

⁶ Ferraro E, Martino S, Bandoni L, Nadinic L. Fitocosmética: ingredientes y otros productos naturales. 1° Edición. Argentina: Editorial Eudeba; 2015, p. 26

⁷Ibid., p. 31

⁸ Miranda M, Cuellar A. Op. cit., p. 159

1.10 Método y diseño de la investigación

1.10.1 Método de la investigación:

A. Identificación, recolección y acondicionamiento de *Clinopodium bolivianum* (muña)

Para la identificación taxonómica del material vegetal se llevó una muestra al instituto científico Michael Owen Dillon (IMOD) Herbario Sur Peruano (HSP) del departamento de Arequipa.

La recolección del material vegetal (*Clinopodium bolivianum*) se realizó bajo la técnica de muestreo no probabilístico intencional, prosiguiendo con el lavado, la desinfección para eliminar impurezas y algunos microorganismos, y finalmente realizar la desecación utilizando el método de desecación natural.

Procedimiento

- Una vez identificado el material vegetal por la IMOD, como *Clinopodium bolivianum* (muña), según constancia N° 006- 2016 emitido por el director del IMOD – HSP (anexo N°17). Se procedió a la recolección de la misma planta, en el mes de setiembre 2016 del distrito de Pocsi (3045 m.s.n.m), provincia y departamento de Arequipa, entre las horas de 8:00 am y 10:00 am, teniendo en cuenta, color, tamaño y desechando las que hayan sufrido algún daño producidas por la exposición al sol y/o insectos.
- La cantidad recolectada fue aproximadamente 5 kg. los cuales después de la recolección fueron lavados con agua potable por un tiempo de 2 minutos y la desinfección con hipoclorito de sodio al 1%.
- La desecación se realizó a temperatura ambiente en bandejas con base de papel, en un lugar fresco por un periodo de 5 días bajo sombra.

B. Preparación de los extractos del *Clinopodium bolivianum* (muña)

B1. Obtención del extracto por medio del método de infusión

La extracción por el método de infusión es el procedimiento ideal para obtener extractos de las partes delicadas de las plantas: hojas, flores y tallos tiernos. Con la infusión se extraen una gran cantidad de sustancias activas, con muy poca alteración de su estructura química, y por lo tanto, se conservan al máximo las propiedades. Este proceso se utiliza para materiales vegetales que posee principios solubles en agua⁹.

Manteniendo el agua en contacto con la planta, la cual cede parte de sus principios activos a la misma, cede aquellas sustancias que son solubles en agua. Ocurre un fenómeno de difusión celular. Una vez que la planta ha sido embebida, es decir, impregnada de agua, vuelve a reconstruir el estado que tenía la planta fresca. En la planta seca los protoplasmas celulares están retraídos hacia las paredes celulósicas de rigidez indeformable, con lo cual se llenan de finas películas de aire, el cual es expulsado por el fenómeno de la imbibición y sustituido por agua. La difusión celular y por tanto la extracción de principios activos durará mientras no se alcance un equilibrio osmótico entre protoplasma celular y líquido extractivo, en este caso agua¹⁰.

Procedimiento:

- Pesamos 50 g de material vegetal (muña), que luego fue fraccionado con la finalidad de aumentar el tamaño de contacto con el disolvente para una mejor disolución de los metabolitos, para luego ser colocadas en un recipiente con tapa.
- Por otro lado se hizo hervir 1000 mL de agua purificada.
- Procedimos a embeber el material vegetal que se encontraba en el recipiente con agua hervida (cantidad suficiente para cubrirla) y se dejó en reposo por 15 minutos, manteniendo tapado el recipiente..

⁹ Pamplona J, Salud por las plantas medicinales. 1º Edición. España: Editorial Safeliz S.L.; 2006, p. 36

¹⁰ Miranda M, Cuellar A. Op. cit., p. 160

- Después de transcurrido el tiempo indicado anteriormente, agregar el resto del agua hervida y dejar en reposo 30 minutos más, mantenerlo tapado.
- Terminado el tiempo de reposo, proceder a filtrar el extracto y exprimir el marco para poder obtener mayor filtrado.
- Por último proceder a envasar el extracto obtenido, en un frasco ámbar, previamente rotulado para mantenerlo protegido de la luz¹¹.

B2. Obtención del extracto por medio del método de hidrodestilación

La extracción por el método de hidrodestilación es una técnica que se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga, lo cual permite la separación de componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles. Se suelen hacer destilaciones por arrastre de vapor o hidrodestilación que facilitan la extracción de principios volátiles. Es un método en el que se utiliza una fuente de calor, por lo que sólo es aplicable a principios termoestables¹².

Este método aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite. La extracción se efectúa cuando el vapor por presión entra en contacto con las células de las partes de las plantas y las rompe liberando la esencia y atrapándola en las gotas de agua del vapor que luego se condensa en el destilador¹³.

Procedimiento:

- Se procedió al armado del equipo artesanal, utilizado para la obtención del aceite esencial (anexo N° 11)
- Por otro lado, se pesó 1000 g de la muestra vegetal (muña), y dividir en partes medianas.

¹¹ Ferraro E, Martino S, Bandoni L, Nadinic L. Op.cit., p. 36

¹² Kuklisnki C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2° Edición. España:Editorial Omega; 2006,p. 33

¹³ Olaya M, Méndez J. Guía de plantas y productos medicinales. 1° Edición. Colombia: Editorial CAB; 2005, p.17

- Se llenó de 4000 mL de agua purificada a la olla presión, para luego proceder a introducir la muña troceada en un pequeño contenedor, que evite el contacto con el agua y permita el contacto con el vapor, y proceder al tapado de la olla.
- Posteriormente se procedió a encender la cocina a temperatura baja.
- Durante la primera hora de extracción se vio pequeñas gotas de aceite esencial, las cuales fueron separadas del agua, utilizando la pera de decantación.
- Al término de dos horas, se vio el total de la extracción de aceite esencial.
- Por último se procedió a envasar ambos extractos en frasco ámbar previamente rotulado.

C. Características organolépticas de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña)

El Instituto de Alimentos de EEUU (IFT), define la evaluación sensorial como “la disciplina científica utilizada para evocar, medir analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de algunas sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído”.

Procedimiento:

- Para el color se procedió a colocar una porción de cada extracto en un vaso beaker limpio, y se observó el color a tras luz.
- Luego se tomó una tira de papel filtro, exenta de olor, de aproximadamente 1 cm. de anchura por 10 cm. de longitud y se introdujo un extremo en la muestra. Se procedió a oler, determinándose así el olor característico de cada uno de los extractos.
- Por último se tomó una alícuota de los extractos y a través del sentido del gusto se procedió a probar cada extracto.

D. Análisis fisicoquímico de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña)

D1. Determinación de pH

El pH es la concentración de iones o cationes hidrógeno $[H^+]$ presentes en determinada sustancia. El valor del pH se puede medir experimentalmente de forma precisa mediante un potenciómetro, un instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos (un electrodo de referencia generalmente de plata/cloruro de plata y un electrodo de vidrio que es sensible al ión hidrógeno). Esta diferencia de potencial determina que cuando las dos disoluciones se ponen en contacto se produzca un flujo de hidrogeniones o en otras palabras, una corriente eléctrica.

El pH típicamente va de 0 a 14 en disolución acuosa, siendo ácidas las disoluciones con menores a 7 y alcalinas las que tienen pH mayores a 7. El pH igual a 7 indica la neutralidad de disolución¹⁴.

Procedimiento:

- Se procedió a calibrar del peachímetro de marca thermoelectron corporation (anexo N°06)
- Se tomó una cantidad necesaria de muestra para ser analizado.
- Se procedió a determinar el pH de la muestra haciendo uso del peachímetro calibrado. Por triplicado para validar el método.
- Se enjuagó el bulbo del peachímetro con agua destilada, secar el bulbo con suaves toques haciendo uso del papel tissue y proceder a guardar.

¹⁴ Matines P, Guarzino A. Química orgánica. 1° Edición. Colombia: Editorial Elizcom; 2009, p. 23

D2. Determinación del índice de refracción

El índice de refracción (IR) es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio. El IR, es característico para cada tipo y los valores varían de acuerdo a la longitud de las cadenas de los ácidos grasos, del grado y tipo de instauración, oxidación, tratamiento al calor, temperatura de análisis y el contenido de grasa, permite al igual que otros criterios de pureza, detectar adulteraciones¹⁵.

Procedimiento

- Se ajustó la temperatura de refractómetro de marca Atago, a 25°C ó 40° C y verificar la completa limpieza y sequedad de los prismas.
- Se colocó unas 2 ó 3 gotas de muestra preparada (llevada aproximadamente a 25°C ó 40°C) sobre el prisma inferior. Cerrar los prismas y ajustarlos firmemente mediante el tornillo correspondiente.
- Se dejó el sistema en reposo para que la muestra adquiriera la temperatura del instrumento; ajustar el instrumento y la luz para obtener la lectura más clara posible, y determinar el índice de refracción.

D3. Determinación de densidad

La densidad es una magnitud empleada para expresar la relación entre la masa y volumen de un cuerpo. Para ello se utiliza un instrumento llamado picnómetro. El picnómetro es un pequeño frasco de vidrio de volumen exacto y conocido; algunos llevan un termómetro incorporado, un tubo tampón de vidrio esmerilado que sirve para tapar el picnómetro y evitar que el líquido se derrame¹⁶.

¹⁵ Ibid., p. 25

¹⁶ Ibid., p. 18

Procedimiento

- Se utilizó los picnómetros de marca LBT, limpios, secos y se procedió a llenarlos de los respectivos extractos de muña.
- Luego de haber llenado los picnómetros, se prosiguió con el pesado de los mismos en la balanza analítica.
- Con los datos del picnómetro vacío y del picnómetro lleno de extracto, se procedió a realizar los cálculos respectivos, para la determinación de la densidad.

E. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña) sobre cepas ATCC *Staphylococcus aureus*

E1. Reactivación de cepa liofilizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Cada unidad de cepa liofilizada ATCC contiene un “pellet” (pastilla) liofilizado de una única cepa de microorganismo, un recipiente de fluido hidratante y un escobillón de inoculación (hisopo). Cada aparato está sellado dentro de una bolsa aluminizada que contiene un desecante.

Los preparados de microorganismos deben ser almacenados a una temperatura entre 2°C y 8°C, en el interior de su envase original sellado o en la bolsa que contiene el desecante¹⁷.

Procedimiento

- Romper la bolsa por la muesca y sacar el Kwik-Stik.
- Apretar la parte superior para romper la ampolla que contiene el fluido hidratante.
- Sostener en posición vertical para permitir el paso del fluido a la parte inferior del “pellet”.
- Apretar el “pellet” (pastilla) para permitir la mezcla con el fluido.

¹⁷ Manual de cepas microbiológicas. Colombia [Internet]. Colombia [Consultado el 19 de diciembre del 2016].

- A continuación, saturar el escobillón (hisopo) con la suspensión.
- Primero inocular una placa petri haciendo rodar el escobillón en un área circular de unos 25 mm de diámetro.
- A continuación, y con un asa estéril, sembrar a partir de la zona inoculada extendiendo la siembra para facilitar el aislamiento colonial.
- Incubar la placa de acuerdo al tiempo y microorganismo que se ha sembrado.
- Todo el material utilizado, debe ser sometido a esterilización en autoclave antes de descartarlo¹⁸.

E2. Determinación de la sensibilidad de los extractos del *Clinopodium bolivianum* (muña)

Las pruebas más utilizadas para evaluar la sensibilidad de una bacteria a un agente antibacteriano están basadas en el enfrentamiento in vitro de la bacteria con distintas concentraciones del agente.

El método de difusión en agar “Kirby Bauer”, es una prueba en la que se enfrenta la bacteria inoculada sobre la superficie de un medio de agar a una solución antibiótica absorbida en discos de papel filtro o en pastillas. El medio de cultivo más frecuentemente empleado es el de Müller Hinton, que permite el crecimiento de casi todas las bacterias. El pH del medio debe estar entre 7,2 y 7,4 y el grosor, entre 4 a 6 mm.

El inóculo bacteriano debe tener una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland (anexo N°09) aproximadamente 10^8 UFC/mL¹⁹.

Procedimiento

- Se realizó la preparación del agar Müller Hinton y del caldo peptonado (anexo N°07). Haciendo uso del caldo peptonado se preparó el inóculo bacteriano (anexo N°08) de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en un tubo estéril.

¹⁸ Loc. cit. p. 04

¹⁹ Goñi I, Díaz R, Gamazo C. Manual práctico de microbiología. 2° edición. España: Editorial Masson; 2003, p.136

- Se tomó una alícuota del inóculo bacteriano, con ayuda de un hisopo estéril, eliminando excesos con presiones sobre la pared interna del tubo y por encima del nivel de caldo de cultivo.
- Luego en la superficie de las placas de Müeller Hinton se prosiguió a inocular con el hisopo el inóculo bacteriano, pasándolo uniformemente por toda la superficie de la placa en tres direcciones. Por último pasar el hisopo por el reborde de la placa de agar. Dejar secar 5 minutos.
- Transcurrido el tiempo de secado, se colocó los discos acondicionados (anexo N°10) sobre la superficie del agar utilizando unas pinzas estériles y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar. Los discos no deben estar a menos de 15 mm de los bordes de la placa y lo bastante separados entre ellos para que no se superpongan las zonas de inhibición (aprox. 20 mm). Dejar las placas 15 minutos a temperatura ambiente para que comiencen a difundir los antimicrobianos a evaluar.
- Después de los 15 minutos, proseguir a colocar las placas en la estufa en posición invertida a 37 °C durante 18-24 horas. Por último retirar las placas de la estufa y medir los diámetros de las zonas de inhibición con una regla o un vernier²⁰.

E3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos

Los métodos más utilizados para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) son los métodos de dilución. En la determinación de la CIM mediante el método de dilución en caldo, al ir disminuyendo la concentración de antibiótico se observará que no hay desarrollo de microorganismos por la ausencia de turbidez, hasta llegar a un tubo a partir del cual comienza a haber un aumento de turbidez y, por lo tanto el desarrollo bacteriano²¹.

²⁰ Ibid. p. 137

²¹ Ibid. p. 141

Procedimiento

- Se realizó el preparado del inóculo bacteriano, luego compararlo con la escala 0.5 de McFarland.
- Se realizó una dilución al 1/100 de este inóculo (0.2 mL del inóculo en 19.8 mL de caldo de cultivo). Así obtendremos un inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/mL
- Se preparó 15 tubos con 1 mL y otro con 1.8 mL de caldo de cultivo.
- Se añadió 0.2 mL de la solución del extracto al tubo que contiene 1.8 mL de caldo. A partir de este tubo, se preparó diluciones seriadas tomando 1 mL del primer tubo y transfiriéndolo al segundo.
- Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfirió 1 mL al tercero y así sucesivamente hasta el tubo 14, del cual se toma 1 mL y se descarta.
- Se añadió a cada tubo con extracto, 1 mL del inóculo preparado anteriormente (10^6 UFC/ mL).
- Para comprobar el recuento del inóculo real: añadir 1 mL del inóculo al tubo restante (tubo 15).
- Por último se llevó a incubar todos los tubos a la estufa.
- Después de pasar 24 horas, se realizó la lectura de los resultados y anotar la CIM²².

E4. Determinación de la concentración mínima bactericida de los extractos

Junto a la CIM es necesario evaluar el efecto bactericida de un antibiótico sobre una bacteria, determinando la concentración mínima bactericida (CBM), que se define como la menor concentración de un antibiótico que reduce al 0,1 % o menos el número de bacterias del inóculo original, o sea, una reducción de 1000 veces el inóculo original, o, lo que es lo mismo, reduce el inóculo inicial en 99,9%²³. La CBM se puede calcular partiendo del método de dilución en caldo, y determinando la proporción de bacterias viables de 18 – 24 horas de contacto con el caldo que contiene el antibiótico²³.

²²Ibid. p. 143

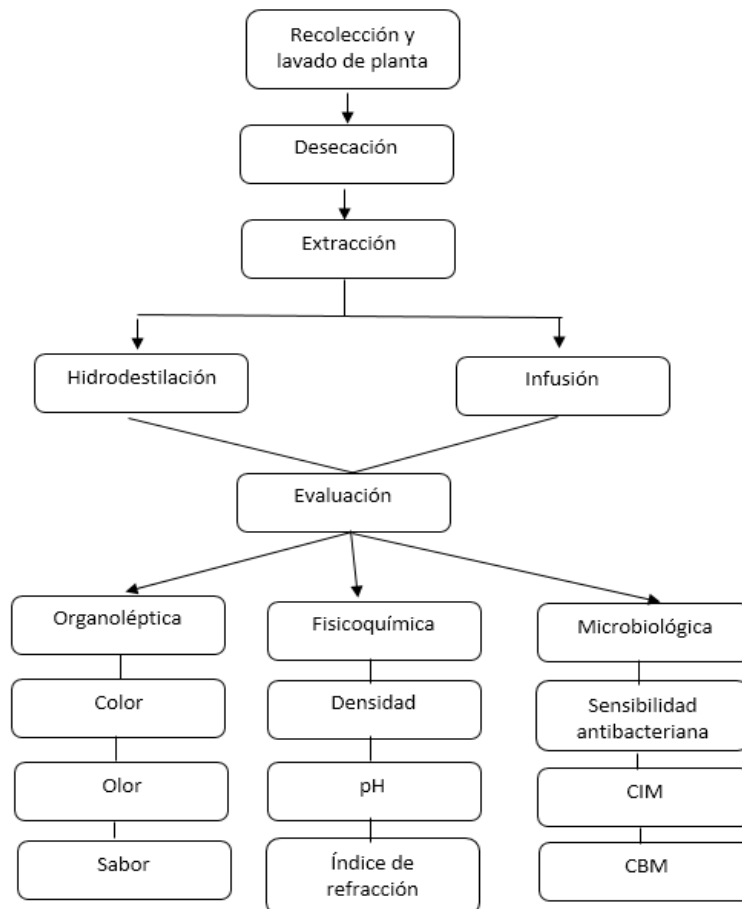
²³Ibid. p. 142

Procedimiento

- A partir del resultado de la concentración mínima inhibitoria (tubos sin desarrollo bacteriano). Se tomó 0,1mL de cada tubo, y extenderlo con una espátula de Drigalski estéril en placas de agar Müeller Hinton.
- Luego de inocular las placas, llevarlos a incubar por 18 horas a 37 °C
- Después de transcurrido el tiempo, se procedió a realizar el conteo del número de colonias contenidas en las placas de Müeller Hinton, determinando así, la concentración mínima bactericida (CBM)²⁴.

1.10.2 Diseño de la investigación:

La investigación pertenece a un diseño explicativo



Fuente: Elaboración propia

²⁴ Ibid. p. 145

1.11 Técnicas e instrumentos de recolección de información

a) Técnicas de muestreo:

Se utilizó el muestreo no probabilístico intencional para obtener una muestra de 5 kg.

b) Técnicas para recolectar información

Para la determinación del efecto antibacteriano del *Clinopodium bolivianum* (muña) se tomó en cuenta:

Fuentes primarias:

Para determinar las características botánicas se envió una muestra al Instituto científico Michael Owen Dillon (IMOD) Herbario Sur Peruano (HSP). Además para los análisis fisicoquímicos y de la actividad antibacteriana, se realizaron pruebas en laboratorio de la Universidad Alas Peruanas filial Arequipa, por triplicado dando resultados cualitativos y cuantitativos según las propiedades y métodos citados en el trabajo

Fuentes secundarias:

Para la recolección de datos especialmente para el marco teórico como para las metodologías se toma en cuenta material bibliográfico comprendido por libros, artículos, investigaciones relacionadas, estas dos últimas en un rango no mayor de 5 años de antigüedad

1.12 Cobertura del estudio

1.12.1 Universo:

Hojas y tallo de *Clinopodium bolivianum* (muña)

1.12.2 Muestra:

La muestra está dada por 5 kg de muña que fueron recolectadas en el distrito de Pocsi, a una altitud de 3045 m.s.n.m, provincia y departamento de Arequipa, Perú en el mes de setiembre del 2016.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos:

**Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “urqu muña”
Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú 2007**

Autor: Mario Carhuapoma Yance

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los componentes químicos, la actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*. El aceite esencial reportó un rendimiento (1.80%v/p), rotación óptica (-2 a +4°), densidad (0.9047 g/mL) e índice de refracción (1.475). Mediante CG-SM y CGFID se elucidó 35 compuestos al 97.1%: monoterpenos oxigenados (74.8%), como componentes mayoritarios la pulegona (27.2%), linalol (20.3%), mentona (11.1%), isomentona (8.3%), *cis*-isopulegona (2.7%), *trans*-isopulegona (0.9%), carvacrol (0.6%), timol (0.6%) y terpineol (0.5%); hidrocarburos sesquiterpénicos (16%), destacando biclogermacreno (8.2%), cariofileno (6.5%) y bicicloelemeno (0.5%); hidrocarburos monoterpénicos (4.1%), con el p-cimeno (2.0%), limoneno (0.7%) y terpineno (0.6%); y sesquiterpenos oxigenados (1.5%), con el espatulenol (0.8%). Por el método de difusión de discos, tiene un efecto antibacteriano frente al *H. pylori*, con un halo de inhibición de 33.33 % en

comparación con la amoxicilina a una concentración de 10 g/mL; por el método de difusión en microplacas, la concentración mínima inhibitoria es de 1.00 g/mL, y la concentración mínima bactericida de 2.00 g/mL.

Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb “Ruyaq Muña”

Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú 2011

Autores: Mario Carhuapoma, Sofía López G, Mirtha Roque, BillieVela Patiño, Carlos Bell, Delia Whu.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Ruyaq Muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las hojas de *Minthostachys mollis*, se colectaron en el distrito de Huamanguilla (3000-3200 m.s.n.m.), provincia de Huanta, región Ayacucho. El aceite esencial se obtuvo por destilación con arrastre de vapor de agua.

La actividad antibacteriana se determinó por el método de excavación placa cultivo; resultando en orden de sensibilidad, para *S. dysenteriae* 21,41 mm; *H. pylori* 17,07 mm; *S. typhi* 14,25 mm y *P. aeruginosa* 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. 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 y comparado con cloranfenicol: *P. aeruginosa* de 225,56; *S. dysenteriae* 171,97; *S. typhi* 135,95 y *H. pylori* 92,86. La densidad del aceite esencial es 0,9029 g/mL, índice de refracción 1,56689 y el porcentaje de rendimiento 2,4 v/p. Se detectó presencia de fenoles, los que validan la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*.

Efecto antibacteriano de extractos y aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* (Puna Salvia) y *Minthostachys Andina* (Muña) frente a cepas de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*

Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco Perú 2013

Autor: Magaly Villena Tejada

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo realizar el análisis comparativo del efecto antibacteriano que presentan los aceites esenciales de dos especies alto andinas Puna Salvia y Muña frente a cepas de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*. El método empleado para la determinación del efecto antibacteriano fue el método de Kirby-Bauer. Dando como resultados que los extractos etanólicos de Puna Salvia y Muña presentaron efecto antibacteriano ya que los halos de inhibición fueron mayores a 9 mm mientras que comparativamente con el fármaco patrón furazolidona. La dosis efectiva de los extractos secos etanólicos de Puna salvia y Muña frente a las mismas cepas en estudio son menos efectivas.

Estudio fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña)

Universidad Inca Garcilaso de la Vegas Perú 2014

Autores: Mg. Carlos Cano P., Dr. Pablo Bonilla R., Enrique Neira M.

El presente trabajo tiene por finalidad aclarar la estructura de algunos de los metabolitos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) proveniente del distrito de Huacrapuquio (2700 m.s.n.m), provincia de Tarma.

El aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* obtenido por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, fue sometido a análisis físico químico y determinación de la composición química mediante cromatografía de gases (CG) se encontraron los siguientes monoterpenos: pulegona, limoneno, mentona y también mentol

Actividad antiviral y antiinflamatoria de plantas medicinales: aislamiento de polisacáridos activos

Universidad Complutense de Madrid España 2014

Autor: Estefanía Patricia Hernández Benito

La presente tesis evaluó tres especies vegetales, *Satureja boliviana* (Lamiaceae), *Phoradendron crassifolium* (Loranthaceae), y *Tuberaria lignosa* (Cistaceae). Teniendo en consideración antecedentes de la medicina empírica como en el caso de *Satureja boliviana*, la cual se utiliza para lavar heridas infectadas.

Mediante extracciones químicas secuenciales, a partir del extracto acuoso, se han obtenido los principales polisacáridos. Utilizando diferentes métodos de aislamiento, purificación y elucidación estructural, entre ellos cromatografía de exclusión molecular, capa fina, cromatografía de gases CG-EM, espectroscopia de IR, y resonancia magnética nuclear RMN. Los resultados obtenidos fueron: la identificación de polisacáridos pécticos, la óptima actividad antiviral e inflamatoria de las tres especies estudiadas.

2.2 Marco conceptual:

2.2.1. *Clinopodium bolivianum* “muña”

A. Características taxonómicas de *Clinopodium bolivianum* (muña)

Reino : Plantae
 Clase : Equisetopsida
 Orden : Lamiales
 Familia :Lamiaceae
 Género :Clinopodium
 Especie:*Clinopodium bolivianum*



Figura1: *Clinopodium bolivianum* (muña)

B. Características botánicas de *Clinopodium bolivianum* (muña)

Es un arbusto de 1 metro de alto. Las hojas opuestas, cortamente pecioladas (1-1.5 mm.); láminas abovadas a elípticas, sub-obtusas, bordes enteros o aserrados, 1-2 cm de largo; flores blanquecinas en fascículos axilares; cáliz tubuloso, lóbulos deltoides, corola tubular, bilabiada, internamente pubescente; estambres didínamos, epipétalos; frutos tetraquenios, de 1 – 5 mm de largo con una espícula pubescente en la parte superior²⁵.

C. Distribución de *Clinopodium bolivianum* (muña)

Planta nativa de la zona andina de Sudamérica (Bolivia, Colombia, Ecuador, Venezuela), especialmente es oriunda de la sierra peruana en el departamento de Cuzco se le conoce con los nombres populares de “muña muña” y “cjuñuca”, en el departamento de Puno con el nombre de “muña”. Normalmente crece en zonas de 2,500 a 3,500 m.s.n.m. y en zonas montañosas a las alturas viene de la familia *Minthostachys mollis setosa* (muña), tienen casi los mismos principios activos y características naturales ya que la *Clinopodium bolivianum* es más aromática y sus principios activos están más presentes debido al clima y las zonas montañosas que son más fértil, natural y rica en minerales²⁶.

D. Usos de *Clinopodium bolivianum* (muña)

Esta planta ha sido empleada milenariamente por nuestros antepasados, siendo múltiples los usos que se le atribuye, medicinalmente se utiliza las hojas frescas, molidas y en infusión; en cataplasma para el tratamiento del reumatismo; en decocción, contra la migraña, mareos, “sorojche” (mal de altura o de montaña); las hojas y flores frescas en infusión, tres veces al día como dispepsias, cólicos, carminativo; acompañado con polvo de alumbre en infusión, para lavar heridas infectadas empíricamente. Además de las propiedades curativas se le atribuye propiedades insecticidas, para ello se utilizan las raíces y hojas. En la agricultura los productores de papa aplican la inca muña para matar gusanos²⁷.

²⁵, ²⁶Yapuchura R. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth)). [Tesis]. Lima- Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina Perú; 2010.

²⁷Hernández E, Actividad antiviral y antiinflamatoria de plantas medicinales: aislamiento de polisacáridos activos. [Tesis]. Madrid - España. Universidad Complutense Madrid; 2014.

E. Composición de *Clinopodium bolivianum* (muña)

Pulegona (27.2%), linalol (20.3%), mentona (11.1%), isomentona (8.3%), cis-isopulegona (2.7%), trans-isopulegona (0.9%), carvacrol (0.6%), timol (0.6%) y terpineol (0.5%); hidrocarburos sesquiterpénicos (16%), destacando bicilogermacreno (8.2%), cariofileno (6.5%) y bicicloelemeno (0.5%); hidrocarburos monoterpénicos (4.1%), con el pcimeno (2.0%), limoneno (0.7%) y terpineno (0.6%); y sesquiterpenos oxigenados (1.5%), con el espatulenol (0.8%)²⁸.

2.2.2 Métodos de extracción

A. Extracción mecánica

Consiste en extraer de los tejidos vegetales, los principios activos disueltos en los líquidos que impregnan dichos tejidos. Los principales métodos de extracción mecánica son:

A1. Extracción por incisiones: Es el procedimiento empleado para extraer los zumos de ciertos vegetales; consiste en hacer cortes en la superficie de la parte de la planta de donde se desea extraer el zumo²⁹.

A2. Extracción con calor: El calor que actúa sobre las células animales provoca su ruptura por dilatación del protoplasma, saliendo al exterior su contenido. (De esta forma se obtiene el aceite del hígado de bacalao). No puede emplearse este método en células vegetales, ya que suelen tener una pared celular demasiado gruesa, resistente a la ruptura por dilatación³⁰.

A3. Extracción por expresión: Consiste en presionar fuertemente la droga. Para ello se utiliza exprimidores, prensas automatizadas. Los zumos, aparecen generalmente como líquidos turbios, debido a las impurezas sólidas, por ello siempre es necesario efectuar una clarificación, siendo los métodos más frecuentes empleados para ello la decantación, la filtración y la centrifugación³¹.

²⁸Carhuapoma M. Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña". [Tesis]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007

²⁹Miranda M, Cuellar A., Op. cit., p. 148

³⁰Loc. cit., p. 148

³¹Loc. cit., p.148

B. Extracción por destilación

La destilación es una operación que, mediante el cambio de estado líquido a vapor, permite separar un sólido de un líquido o líquido miscibles entre sí, sobre la base de su diferente volatilidad.

B1. Hidrodestilación: Consiste en la vaporización a menor temperatura de los componentes volátiles de mezclas líquidas, por inyección directa de una corriente de vapor. El vapor incorporado contribuye con su presión parcial a la presión total de los vapores por encima del líquido para, de tal modo que la presión que debe ejercer el líquido para entrar en ebullición es menor, por tanto se reduce su punto de ebullición. Este método es muy empleado para la obtención de aceites esenciales. La diferente volatilidad de los componentes de la droga, permite la separación de componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles. La destilación permite obtener, por ejemplo las esencias de las drogas. Es un método en el que se utiliza una fuente de calor, por lo que sólo es aplicable a principios activos termoestables³².

C. Extracción con disolventes

Consiste en poner en contacto la droga con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben de pasar de la droga al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad de disolvente.

Para seleccionar el disolvente de extracción, deben tenerse en cuenta los siguientes criterios:

- Que proporcione un alto coeficiente de partición, lo cual permite usar menos disolvente.
- Que sea selectivo hacia el soluto.
- Que tenga gran inmiscibilidad con el otro líquido.
- Que tenga alta recuperabilidad.
- Que sea químicamente inerte³³.

³² Ibid. , p. 149

³³ Ibid. , p. 149-150

C1. Infusión: Este proceso se utiliza para materiales vegetales con principios solubles en agua. Son extemporáneas, fácilmente atacables por hongos y bacterias, al igual que la decocción. Se prepara en una proporción de 50 g de material vegetal por litro de agua. Primero se embebe el material vegetal con agua caliente y se lo deja en reposo por 15 minutos, luego se agrega el resto del agua hirviendo y se deja reposar por 30 minutos. Se filtra y se exprime bien el marco. Se hace pasar agua hirviendo por el marco hasta completar los 1.000 ml. Esta preparación al igual que la decocción debe ser refrigerada (en cuyo caso se conserva sólo por unos días), salvo que se congele o se agregue algún conservante³⁴.

C2. Maceración: Es un procedimiento en el que se coloca el material vegetal, desecado o no, en un recipiente adecuado con tapa. Se agrega suficiente cantidad de disolvente o mezcla de disolventes, hasta tapar totalmente el material vegetal. Se deja en reposo a temperatura ambiente o en un sitio tibio (30 a 40 °C) durante el tiempo indicado (3 a 7 días), hasta que el material soluble se disuelva. Se agita con frecuencia durante el tiempo de maceración. Luego se filtra y se estruja el marco para retirar el disolvente³⁵.

C3. Digestión: Consiste en el calentamiento del material vegetal a extraer junto con el disolvente, sin llegar a la temperatura de ebullición del mismo³⁶.

C4. Cocimiento y/o Decocción: Se obtiene por calentamiento a ebullición del material vegetal con el disolvente o con agua, manteniendo dicha ebullición durante 15-30 minutos.³ Generalmente se emplea para materiales vegetales cuyas partes usadas sean duras como cortezas, tallos, raíces, y que contengan principios solubles en el disolvente y que sean termoestables. Se coloca el material vegetal, convenientemente pulverizado, en un recipiente con el disolvente o agua y se lleva a ebullición, se deja hervir por un tiempo determinado, y luego de enfriar se filtra teniendo la precaución de exprimir bien el marco. Si se trata de una decocción, ésta debe ser conservada refrigerada (en cuyo caso se conserva sólo por unos días), salvo que se congele o se agregue algún conservante³⁷.

³⁴ Ferraro E, Martino S, Bandoni L, Nadinic L. Loc. cit., p. 36

³⁵ Loc. cit., p. 36

³⁶ Loc. cit., p. 36

³⁷ Loc. cit., p. 36

C5. Lixiviación o percolación: Se humedece 1 kg del material vegetal con una cantidad adecuada del disolvente prescripto para humectarla y embeberla bien. Se deja en maceración dentro de un recipiente por un tiempo determinado. Luego se empaca un percolador de tamaño adecuado con el material vegetal. Se agrega suficiente disolvente hasta obtener una columna en el percolador. Se tapa el orificio inferior, se cubre el percolador y se lo deja macerar durante 48 horas. Pasado este tiempo se abre la anilla inferior y se comienza a coleccionar el percolado, reservando las primeras fracciones. Se continúa la percolación agregando más cantidad de disolvente hasta el agotamiento del material vegetal. Generalmente se analiza el percolado que va eluyendo, cuando ya no se detectan principios es porque está agotado el material vegetal³⁸.

C6. Soxhlet: Es un sistema de extracción sólido líquido en el que la extracción se realiza en un aparato que consta de un matraz de fondo plano, un cuerpo extractor y un refrigerante. En el cuerpo extractor se coloca el disolvente orgánico y la droga, generalmente envuelta en un material poroso que permita el contacto con el disolvente. En el matraz de fondo plano se coloca el disolvente orgánico, se lleva a ebullición y los vapores del disolvente ascienden por el tubo lateral y llegan al refrigerante donde condensan y caen sobre la droga situada en el cuerpo extractor. Cuando el cuerpo extractor se llena de líquido extractivo, éste se vacía por el sifón lateral interno y desemboca en el matraz inferior. El disolvente orgánico se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior³⁹

2.2.3 Actividad antibacteriana o antimicrobiana

A. Mecanismo de acción de los antibacterianos

Los agentes antibacterianos se clasifican de acuerdo a sus modos específicos de acción contra las células bacterianas. Estos agentes pueden interferir con la síntesis de la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ácido nucleico, o inhibir una ruta metabólica. Los modos de acción de los agentes antimicrobianos contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas son muy similares⁴⁰.

³⁸ Ferraro E, Martino S, Bandoni L, Nadinic L. Loc. cit., p. 36

³⁹ Kuklisnki C. Op. cit., p. 35

⁴⁰ Cavaleri S, Coyle M. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 1º Edición. EEUU: Editorial, 2005, p. 06

A1. Inhibición de la síntesis de la pared celular

Los agentes antibacterianos que interfieren con la síntesis de la pared celular bloquean la síntesis del péptidoglicano y por tanto son activos contra bacterias en crecimiento. Los agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de la pared celular son bactericidas. La actividad de los betalactámicos en bacterias gram-negativas: En las bacterias gram-negativas, los antimicrobianos betalactámicos entran a la célula a través de los canales porínicos de la membrana externa. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las proteínas de unión de penicilina (PBPs) que son enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular. La unión de las moléculas beta-lactámicas a las PBPs, ubicadas en la superficie de la membrana citoplásmica, bloquea su función. Esto produce paredes celulares debilitadas o defectuosas y conduce a lisis celular y muerte.

Por otro lado la actividad de los betalactámicos en bacterias gram-positivas: Puesto que las bacterias gram-positivas no poseen una membrana externa, los antimicrobianos betalactámicos se difunden a través de la pared celular. Los siguientes pasos son similares a aquellos para las bacterias gram-negativas. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las PBPs, lo que resulta en paredes celulares debilitadas y lisis celular⁴¹.

A2. Inhibición de la síntesis proteica

Interferencia con la síntesis de proteínas mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S: Las tetraciclinas (tetraciclina y doxiciclina) se unen a la subunidad 30S del ribosoma y bloquean la adherencia del RNA de transferencia (tRNA). Puesto que no se pueden agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento. Los aminoglucósidos (eje. gentamicina, tobramicina, amikacina, y estreptomycin) también se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes. En primer lugar estos se pueden adherir a la

⁴¹ Cavaleri S, Coyle M. Op. cit., p. 07

subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al RNA mensajero (mRNA). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del mRNA. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros. Estas actividades por lo general ocurren de manera simultánea y el efecto total es bactericida. La inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S: Los macrólidos (eje. eritromicina, azitromicina y claritromicina) y las lincosámidas (eje. clindamicina) se adhieren a la subunidad ribosómica 50S provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos son primordialmente bacteriostáticos. El cloramfenicol también se une a la subunidad 50S del ribosoma e interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína en crecimiento. Los agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas de esta forma son bacteriostáticos⁴².

A3. Inhibición de la síntesis o función de los ácidos nucleicos

Las fluoroquinolonas (eje. ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina y gemifloxacina) interfieren con la síntesis de ADN bloqueando la enzima ADN girasa. La ADN girasa ayuda a enrollar y desenrollar el ADN durante la replicación de ADN. La enzima se adhiere al ADN e introduce rupturas dobles en las cadenas que permiten al ADN desenrollarse. Las fluoroquinolonas se unen al complejo ADN girasa-ADN y permiten a las cadenas de ADN rotas liberarse dentro de la célula lo que conduce a la muerte celular. • La rifampicina se une a la ARN polimerasa ADN dependiente lo que bloquea la síntesis de ARN y resulta en la muerte de la célula⁴³.

2.2.4 Grupos químicos aislados de plantas con acción antimicrobiana

Se han aislado alrededor de 12000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos. La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el

⁴² Cavaleri S, Coyle M. Loc. cit., p. 07

⁴³ Loc. cit., p. 07

momento. Existen distintas teorías: podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin. Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados. Los principales grupos de compuestos generados por plantas se comentan a continuación⁴⁴.

Cuadro 2. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (Tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla)	S. aureus
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	Salmonella
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
Flavonas			
Alcaloides	Coca	<i>Erythoxylum coca</i> (coca)	Cocos grampositivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, Lactobacillus
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

Fuente: Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Sociedad española de quimioterapia. Revista Prous Science.

2.2.5 Compuestos naturales con actividad frente a *Staphylococcus aureus*

Numerosos compuestos naturales han mostrado actividad frente al *S. aureus*, incluso sobre los resistentes a la metilina. El aceite del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) posee alrededor de cien terpenos y alcoholes relacionados, algunos de ellos con propiedades antimicrobianas. El mecanismo de acción de estos compuestos frente a este microorganismo parece deberse a una alteración en la

⁴⁴ Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Sociedad española de quimioterapia. Revista Prous Science. [Online]. 2016 [Consultado 23 de diciembre del 2016]. p. 02

membrana citoplasmática de la bacteria. La actividad de ciertas plantas de la amazonia brasileña frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina⁴⁵.

2.2.4 *Staphylococcus aureus*

A. Taxonomía

Reino : Bacteria
 Clase : Bacilli
 Orden : Bacillales
 Familia :Staphylococcaceae
 Género :Staphylococcus
 Especie: *Staphylococcus aureus*

B. Morfología

El nombre del género *Staphylococcus* procede del griego staphylé, «racimo de uvas». Por tanto, la designación *Staphylococcus* se refiere a que las células de estos cocos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas; sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas⁴⁶.

La mayor parte de los estafilococos tiene un diámetro de entre 0,5 y 1 mm y son anaerobios facultativos (es decir, crecen aerobia y anaerobiamente) inmóviles capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal (p. ej., cloruro sódico al 10%) y a temperaturas desde 18 hasta 40 °C. Estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano. En la actualidad, el género comprende 35 especies y 17 subespecies. Algunas especies se desarrollan en nichos muy específicos en los que se encuentran habitualmente. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* coloniza las narinas anteriores, *Staphylococcus capitis* crece en regiones con glándulas sebáceas (como la frente) y *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus homínis* se hallan en zonas dotadas de glándulas apocrinas (como la axila). Las bacterias del género *Staphylococcus* conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y

⁴⁵ Pahissa A. Op. cit., p. 18

⁴⁶ Pahissa A. Op. cit., p. 18

origina un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida, infecciones de la piel, las partes blandas, los huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas. Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*⁴⁷.

Las colonias de *Staphylococcus aureus* son doradas debido a los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Igualmente, representa la única especie colonizadora del ser humano que produce la enzima coagulasa. Cuando se suspende una colonia de *S. aureus* en un tubo con plasma, la coagulasa se une a un factor sérico y el complejo convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que da lugar a un coágulo. Dado que las restantes especies estafilocócicas carecen de la capacidad de producir coagulasa, son conocidas colectivamente como estafilococos coagulasa-negativos⁴⁸.

C. Patología

Las bacterias tienden a infectar la piel, a menudo causando abscesos. Sin embargo, las bacterias pueden viajar por el torrente sanguíneo (lo que se denomina bacteriemia) e infectar prácticamente cualquier parte del organismo, especialmente válvulas cardíacas (endocarditis) y los huesos (osteomielitis). Las bacterias también tienden a acumularse en el material sanitario implantado en el organismo, como válvulas cardíacas artificiales o prótesis articulares, marcapasos y catéteres insertados en los vasos sanguíneos a través de la piel⁴⁹.

Endocarditis: cuando las personas se inyectan drogas, se les ha infectado un catéter en los vasos sanguíneos o se les ha instalado una válvula cardíaca artificial
 Osteomielitis: Si *Staphylococcus aureus* se propaga al hueso desde una infección del torrente sanguíneo o desde una infección de tejidos blandos adyacentes, como puede ocurrir en las personas que sufren úlceras por presión profunda o úlceras en los pies debidas a la diabetes⁵⁰.

⁴⁷ Pahissa A. Op. cit., p. 18

⁴⁸ Ibid., p. 18

⁴⁹ Ibid., p. 23

⁵⁰ Ibid., p. 23

Infección pulmonar (neumonía): Cuando se ha sufrido una gripe (especialmente) o una septicemia, cuando se toman corticoesteroides u otros fármacos inhibidores del sistema inmunitario (inmunosupresores), o cuando los afectados han sido hospitalizados al necesitar intubación traqueal y ventilación mecánica. Existen muchas cepas de *Staphylococcus aureus*. Algunas cepas producen toxinas que pueden causar síntomas de intoxicación alimentaria por estafilococo, síndrome de choque tóxico y síndrome de piel escaldada⁵¹.

D. Síntomas de las infecciones por estafilococos

La foliculitis es la menos grave. La raíz del pelo (folículo) está infectada, causando un grano pequeño y poco doloroso en la base del pelo.

El impétigo consiste en ampollas poco profundas y llenas de líquido que se rompen, dejando costras de color miel. El impétigo puede picar o doler. Los abscesos (forúnculos) son acúmulos de pus caliente y doloroso justo por debajo de la piel.

La celulitis es una infección de la piel y del tejido que se encuentra justo debajo de ella. La celulitis se extiende y causa dolor y enrojecimiento.

La necrólisis epidérmica tóxica y, en el recién nacido, el síndrome de piel escaldada, son infecciones graves. Ambas provocan el desprendimiento de grandes cantidades de piel.

Las infecciones mamarias (mastitis), que pueden incluir celulitis y abscesos, suelen aparecer entre 1 y 4 semanas después del parto. La zona alrededor del pezón está enrojecida y dolorida. Los abscesos suelen liberar una gran cantidad de bacterias en la leche de la madre, que pueden infectar al bebé lactante.

La neumonía estafilocócica suele provocar fiebre muy alta, dificultad respiratoria y tos con producción de esputos que pueden estar teñidos de sangre. Causa abscesos pulmonares, que se extienden y afectan las membranas que envuelven los pulmones (provocando pleuritis) o, a veces, provocando acumulaciones de pus (empiema). Estos problemas dificultan aún más la respiración.

La infección del flujo sanguíneo es causa frecuente de muerte en personas con quemaduras graves. Por lo general, se produce fiebre alta y persistente y, en ciertos casos, choque (shock).

⁵¹ Pahissa A. Op. cit., p. 23

La endocarditis daña con rapidez las válvulas del corazón, hasta el punto de causar una insuficiencia cardíaca (con dificultades respiratorias) y posiblemente la muerte.

La osteomielitis estafilocócica provoca escalofríos, fiebre y dolor óseo. Aparece tumefacción y enrojecimiento en la piel y en los tejidos blandos situados por encima del hueso infectado y se acumula líquido en las articulaciones cercanas a esta zona⁵².

E. Tratamiento de las infecciones por estafilococos

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* se tratan con antibióticos. El médico trata de determinar si las bacterias son resistentes a los antibióticos y si es así, a qué antibióticos. La infección que se adquiere en un hospital se trata con antibióticos que son eficaces contra SARM: vancomicina, linezolid, tedizolida, quinupristina más dalfopristina, ceftarolina, telavancina o daptomicina. Si los resultados de las pruebas posteriores indican que la cepa es sensible a la meticilina y la persona no es alérgica a la penicilina, se utiliza un medicamento relacionado con la meticilina, como nafcilina. Dependiendo de la gravedad de la infección, los antibióticos pueden administrarse durante semanas⁵³.

La infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) puede adquirirse fuera de un centro sanitario. Las cepas de SARM adquiridas en la comunidad suelen ser sensibles a otros antibióticos, como trimetoprima-sulfametoxazol, clindamicina, minociclina o doxiciclina, así como a antibióticos utilizados para tratar las infecciones por SARM adquiridas en el hospital.

Las infecciones leves de la piel debidas a SARM, como foliculitis, suelen tratarse con una pomada a base de bacitracina, neomicina y polimixina B (disponible sin receta) o mupirocina (disponible solo con prescripción médica). Si se necesita algo más que una pomada, se administran antibióticos efectivos contra el SARM por vía oral o intravenosa. El antibiótico utilizado depende de la gravedad de la infección y de los resultados de las pruebas de sensibilidad. Si una infección afecta el hueso o materiales implantados en el organismo (como marcapasos, válvulas cardíacas artificiales, prótesis articulares e injertos de vasos sanguíneos), en ocasiones se

⁵² Pahissa A. Op. cit., p. 23

⁵³ Ibid, p. 34

añade rifampicina a la pauta antibiótica. Por lo general, los huesos infectados y el material implantado deben ser eliminados quirúrgicamente para curar la infección. En caso de que haya abscesos, suele ser conveniente drenarlos.⁵⁴

⁵⁴ Pahissa A. Op. cit., p. 34

CAPÍTULO III

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Población y muestra:

La población para el siguiente trabajo es el tallo y hojas de *Clinopodium bolivianum* (muña) La muestra fue recolectada entre 8:00 am a 10:00 am en el mes de setiembre 2016 en el distrito de Pocsi ubicada a 3045 m.s.n.m. del departamento de Arequipa.

3.2 Nivel de confianza y grado de significancia:

En el presente trabajo de investigación se utilizó un análisis estadístico descriptivo con la finalidad de validar la hipótesis con un $p < 0.05$ como significativo y usando 95% de confianza, para ello se evalúa los resultados obtenidos en el paquete estadístico SPSS.

3.3 Tamaño de la muestra representativa:

La toma de muestra fue aproximadamente 5 kg de planta, recolectada en el mes de setiembre del 2016.

3.4 Análisis e interpretación de resultados:

Se realizó el análisis del extracto obtenido por hidrodestilación, el cual tendría metabolitos volátiles como monoterpenos y sesquiterpenos. También se evaluó el extracto obtenido por infusión al 50%, cantidad basada en el uso empírico, para el tratamiento de heridas.

Inicialmente a estos dos extractos se evaluaron las características organolépticas y fisicoquímicas, como se puede observar en la dos primeras tablas y en las tres tablas consiguientes se muestran los resultados del análisis microbiológico.

En la tabla N° 01 se presentan los resultados obtenidos del análisis organoléptico donde hay una diferencia notoria en el color, esto puede ser un indicativo de los diferentes metabolitos que contienen, en cuanto al sabor y olor se percibió diferencia en las intensidades sin embargo, por ser un análisis cualitativo bajo la percepción del investigador en la tabla no es notoria la diferencia.

Tabla N° 01: Características organolépticas de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña)

Métodos de extracción	Color	Sabor	Olor
Hidrodestilación	Amarillo	Picante	Característico
Infusión	Café	Picante	Característico

Fuente: Elaboración propia. *Prueba por triplicado (n=3)

Los resultados del análisis fisicoquímico se observan en la tabla N° 02, donde figuran el análisis de densidad, pH e índice de refracción, observando que si existe diferencia en estas dos muestras, lo cual nos permite plantear que los metabolitos secundarios obtenidos por estos dos métodos son diferentes ya que las técnicas utilizadas aplican diferentes temperaturas y equipos.

En la densidad observamos que el extracto por hidrodestilación es menor a la densidad del agua por tanto esto puede influenciar en el método por difusión en disco ya que el medio de Müller Hinton es de base acuosa, sin embargo, el extracto por infusión no se percibe este problema; en cuanto a los pH obtenidos observamos que el extracto por hidrodestilación muestra un pH ácido y el de infusión es cercano al neutro; finalmente el

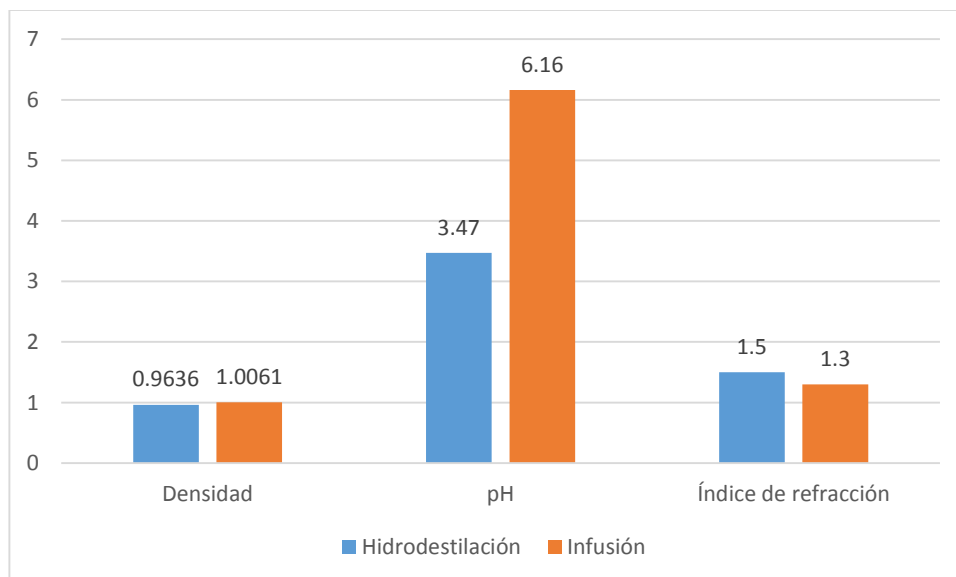
índice refracción del extracto de hidrodestilación es de 1.5 y del extracto obtenido por infusión es de 1.3. Estas características podrían influenciar el crecimiento bacteriano de las *Staphylococcus aureus*.

Tabla N° 02: Análisis físico químico de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña)

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	Densidad* (mg/mL)	pH*	Índice de refracción*
Hidrodestilación	0.9636 ± 0.00006	3.47± 0.27622	1.5± 0.05774
Infusión	1.0061 ± 0.00003	6.16 ±0.03605	1.3± 0.05774

Fuente: Elaboración propia. *Prueba por triplicado (n=3)

Gráfica N°1 Análisis fisicoquímicos de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña)



Fuente: Elaboración propia

En cuanto a los resultados estadísticos obtenidos mediante la prueba Anova, de los valores de densidad, pH e índice de refracción, muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión. (anexo N°12,13,14,15)

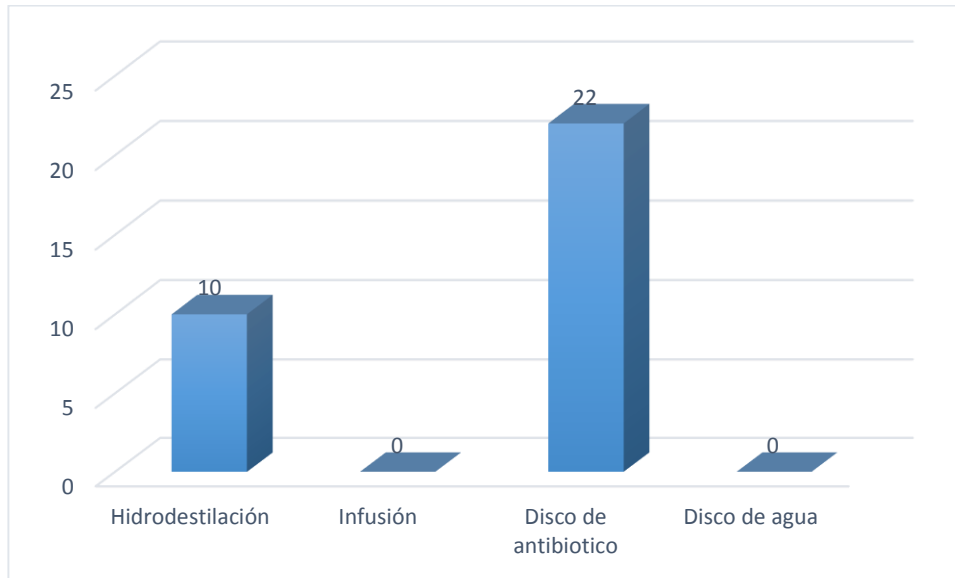
En la tabla N° 03 se presenta el resultado de la evaluación del efecto antibacteriano, la primera prueba utilizada fue de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en disco, los resultados muestran que si presentó efecto con el aceite esencial observando un halo de 10mm;mas no con el extracto de infusión, sin embargo, si comparamos la dimensión creada por el aceite esencial y el antibiótico, existe gran diferencia; esto podría deberse a las características de difusión del aceite esencial en medio de cultivo(base acuoso)por ello, para determinar el CIM y CBM se utilizó el tween 80 en la preparación de los medio de cultivo.

Tabla N° 03: Análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos de muña frente la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	Diámetros de halos de inhibición de los extractos de muña*
Hidrodestilación	10 mm \pm 0.1
Infusión	0 mm
Disco de antibiótico	22 mm \pm 0.1
Disco de agua	0 mm

Fuente: Elaboración propia. *Prueba por triplicado (n=3)

Gráfica N°2 Análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos de muña frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Fuente: Elaboración propia

Mediante la evaluación de los datos por la prueba estadística de Anova se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto a la evaluación de la actividad de los extractos, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se utilizó como control positivo, discos de clindamicina que es un antibiótico utilizado en infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, a pesar de ser un antibiótico puro se puede realizar una evaluación comparando la susceptibilidad antibacteriana de este antibiótico, como un 100% de efectividad frente al efecto de los extractos estudiados; donde solo el extracto por el método de hidrodestilación presenta menos del 50% de efectividad comparada con la clindamicina, mientras que el extracto obtenido por infusión no presenta efecto, como se puede observar en la tabla N°04 .

Tabla N° 04: Porcentaje del análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos de muña frente la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	Diámetros de halos de inhibición de los extractos de muña *	%
Hidrodestilación	10 mm ± 0.1	45 %
Infusión	0 mm	0
Disco de antibiótico	22 mm± 0.1	100 %
Disco de agua	0 mm	0

Fuente: Elaboración propia*Prueba por triplicado (n=3)

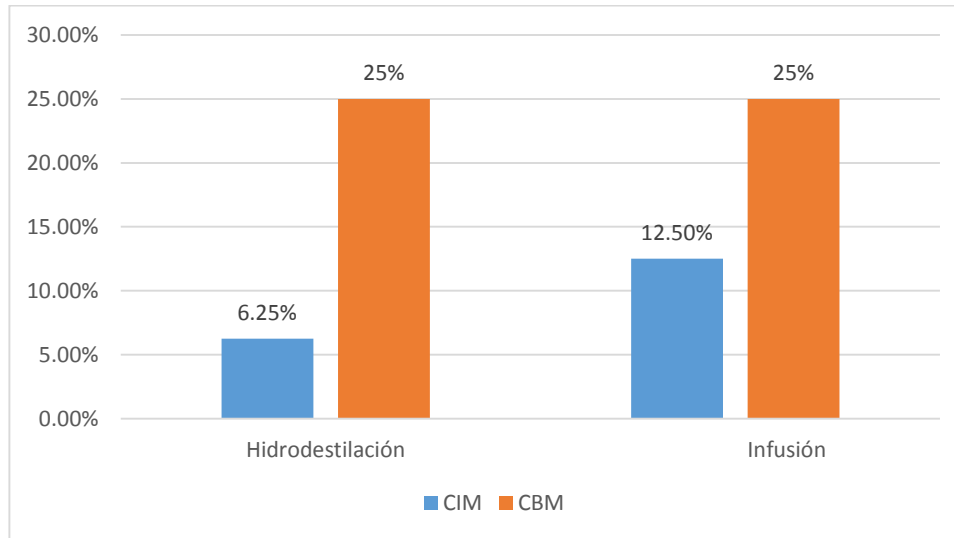
Finalmente en la tabla N°5 tenemos los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; los resultados obtenidos nos indican que existe una diferencia entre los extractos, siendo el extracto del método de hidrodestilación el que presenta el efecto antibacteriano a una menor concentración, ya que actúa a una concentración de 6,25%, sin embargo, en cuanto a la concentración bactericida mínima el extracto por el método de hidrodestilación y el extracto por infusión, presentan efecto a la misma concentración de 25%.

Tabla N° 05: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) de los extractos de muña (*Clinopodium bolivianum*)

Métodos de extracción	Concentración del extracto de muña (<i>Clinopodium bolivianum</i>)	
	CIM*	CBM*
Hidrodestilación	6,25 %	25 %
Infusión	12.5 %	25 %

Fuente: Elaboración propia*Prueba por triplicado (n=3)

Gráfico N° 3: Determinación de concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) de los extractos de muña



Fuente: Elaboración propia

Los resultados mostrados anteriormente nos indicarían que el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* puede generar un efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* coincidiendo con algunas investigaciones como la de Carhuapoma Mario, tesis que tuvo como objetivo la evaluación del efecto antibacteriano frente al *Helicobacter pylori* y el efecto antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, mostrando así, el efecto antibacteriano diverso que puede poseer la misma especie y también muestra resultados similares en los datos de los análisis fisicoquímicos como densidad e índice de refracción.

Por otro lado es importante destacar los resultados obtenidos mediante la técnica de infusión que presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, lo cual respaldaría el uso empírico, mencionada en la investigación de Hernández Estefanía, donde se menciona que la *Clinopodium bolivianum* es utilizada para lavar heridas infectadas.

De esa manera podríamos comprobar la hipótesis planteada, aceptando que los extractos obtenidos por el método de hidrodestilación e infusión de *Clinopodium bolivianum* presenta efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

Primera:

Se realizó la evaluación de los extractos de *Clinopodium bolivianum* (muña) obtenida por los métodos de hidrodestilación e infusión, los cuales presentan un efecto antibacteriano frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Segunda:

Según la prueba de difusión en disco Kirby Bauer, el extracto obtenido por el método de hidrodestilación (aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*) presenta un halo de inhibición de 10 mm de diámetro, lo que indica una sensibilidad antibacteriana resistente frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y el extracto obtenido por el método de infusión no presento un halo de inhibición frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tercera:

La concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto de *Clinopodium bolivianum* (muña) frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtenida por hidrodestilación fue

de 6.25% y la CIM del extracto de infusión fue de 12.5% mostrándonos de esta manera que posee un efecto bacteriostático a las mencionadas concentraciones.

Cuarta:

La concentración mínima bactericida (CBM) del extracto de *Clinopodium bolivianum* (muña) frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtenida por hidrodestilación y del extracto de infusión fue de 25% mostrándonos de esta manera que ambos poseen un efecto bactericida.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Determinar el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* de extractos obtenidos por diferentes métodos y solventes.
2. Evaluar el efecto de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión frente a otras cepas bacterianas.
3. Realizar la identificación de metabolitos secundarios a nivel de cromatografía (HPLC).
4. Determinar el efecto de toxicidad de los extractos obtenidos por hidrodestilación e infusión.

BIBLIOGRAFÍA

1. BRUNETON J. Farmacognosia: Fitoquímica plantas medicinales. 2da Ed. España: Acribia; 2001.
2. CAVALERI S, COYLE M. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Washington; 2005.
3. FERRARO E, MARTINO S, BANDONI L, NADINIC L. Fitocosmética: Ingredientes y otros productos naturales. Argentina: Eudeba; 2015.
4. GOÑI I, DÍAZ R, GAMAZO C. Manual práctico de microbiología. 2da Ed. Barcelona: Masson; 2003.
5. KUKLISNKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2da Ed. España: Omega; 2000.
6. MIRANDA M, CUELLAR A. Farmacognosia y productos naturales. Cuba: Félix varela; 2001.
7. MATINES P, GUARZINO A. Química orgánica. Colombia: Elizcom; 2009.
8. NEGRONI M. Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. 2da Ed. España: Médica panamericana; 2009.
9. RIVASPLATA J, MUÑOZ S. Metodología de la investigación científica. Perú: Talleres gráficos.
10. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. España: ICG Marge; 2009.
11. PAMPLONA J. Salud por las plantas medicinales. España: Safeliz; 2006.

Artículos de investigación

12. CANO PC, BONILLLA RP, NEIRA ME. Estudio fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis. Universidad Inca Garcilaso de la Vega Perú 2014.
13. CARHUAPOMA M, LOPEZ S, ROQUE M, VELAPATIÑO B, BELL C, WHU D. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb “Ruyaq muña”. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú. 2011.
14. CARHUAPOMA M. Composición química, actividad anti- *Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx Epling* “urqu muña”. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú 2007.
15. HERNÁNDEZ E, Actividad antiviral y antiinflamatoria de plantas medicinales: aislamiento de polisacáridos activos. Tesis doctoral. Universidad Complutense Madrid. 2014.
16. TOMAS G, HUAMAN J, AGUIRRE R, BARRERA M. Extracción y clasificación de las saponinas del *Sapindus saponaria* L., “Boliche”. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú. 2011.
17. STASHENKO E, MARTÍNES J, JHONCON J, ARIAS A. Estudio de los componentes del aceite esencial y extracto de *Clinopodium bolivianum* (inca muña) obtenidos por hidrodestilación y extracción con dióxido de carbono supercrítico. Tesis. Universidad industrial de Santander Colombia. 2014.
18. URRUNAGA R, URRUNAGA E, ACURIO L. Investigación de la Satureja boliviana planta medicinal andina. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú. 1995.
19. YAPUCHURA R. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (kunth) griseb.) e inca muña (*Clinopodium*

bolivianum (benth.) kuntze). Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina Perú. 2010.

20. HEREDIA M, MONTENEGRO H. Evaluación de la capacidad bioconservante in vitro e in vivo de los aceites esenciales de *Satureja boliviana* (muña) y *Oryganum x majoricum* (orégano), sobre *Prunus pérsica* (durazno) entero y *Carica papaya* (papaya) tipo cuarta gamma. Tesis. Universidad Católica de Santa María Perú 2015.

WEBGRAFÍA

21. Manual de cepas microbiologics. Colombia [Internet]. Colombia [Consultado el 19 de diciembre del 2016]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/321648982/MicrobiologicsRetail40thEdition-pdf>
22. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Sociedad española de quimioterapia. Revista Prous Science. [Online]. 2016 [Consultado 23 de diciembre del 2016]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/28066457_Plantas_con_accion_antimicrobiana

ANEXOS

ANEXO N° 01: IDENTIFICACIÓN Y RECOLECCIÓN DE LA MUÑA

Figura 1: *Clinopodium bolivianum* (muña)Figura 2: Recolección de *Clinopodium bolivianum* (muña)

ANEXO N° 02: DETERMINACIÓN FISIQUÍMICA DEL EXTRACTO DE *Clinopodium bolivianum* (muña)

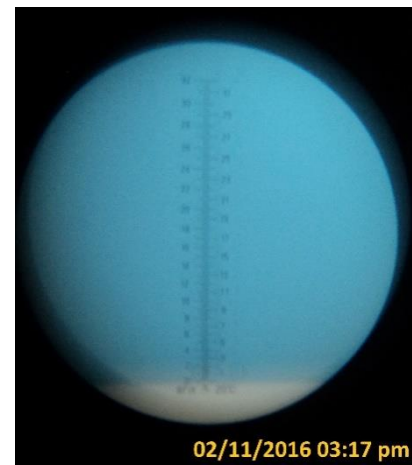
Figura 3: Determinación de densidad
(Balanza analítica)



Figura 4: Determinación de pH
(Peachímetro)



Figura 5: Determinación de Índice de refracción
(Refractómetro)



**ANEXO N° 03: DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS EXTRACTOS DE
Clinopodium bolivianum (muña)**

Figura 6: Estandarización de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con la Escala 0.5 de Mc Farland

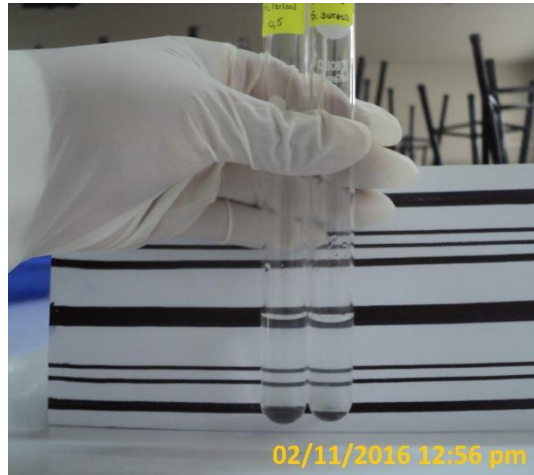
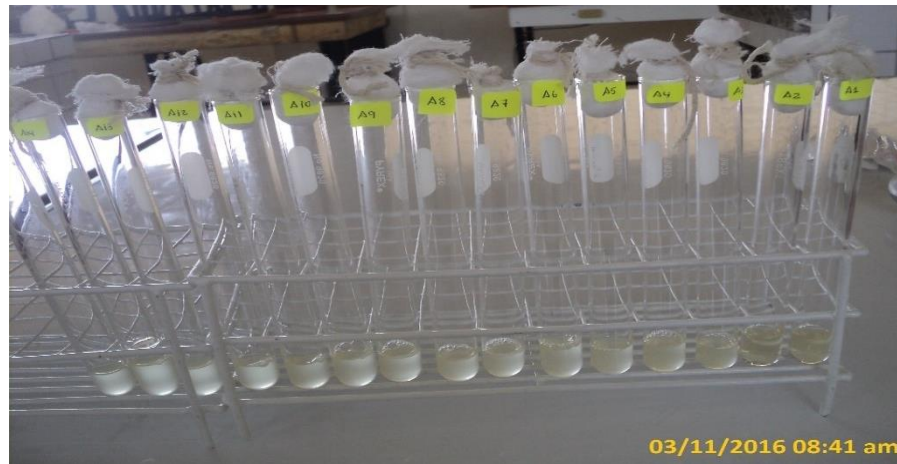


Figura 7: Halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



ANEXO N° 04: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA**Figura 8:** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM)

Determinación de la CIM - Hidrodestilación

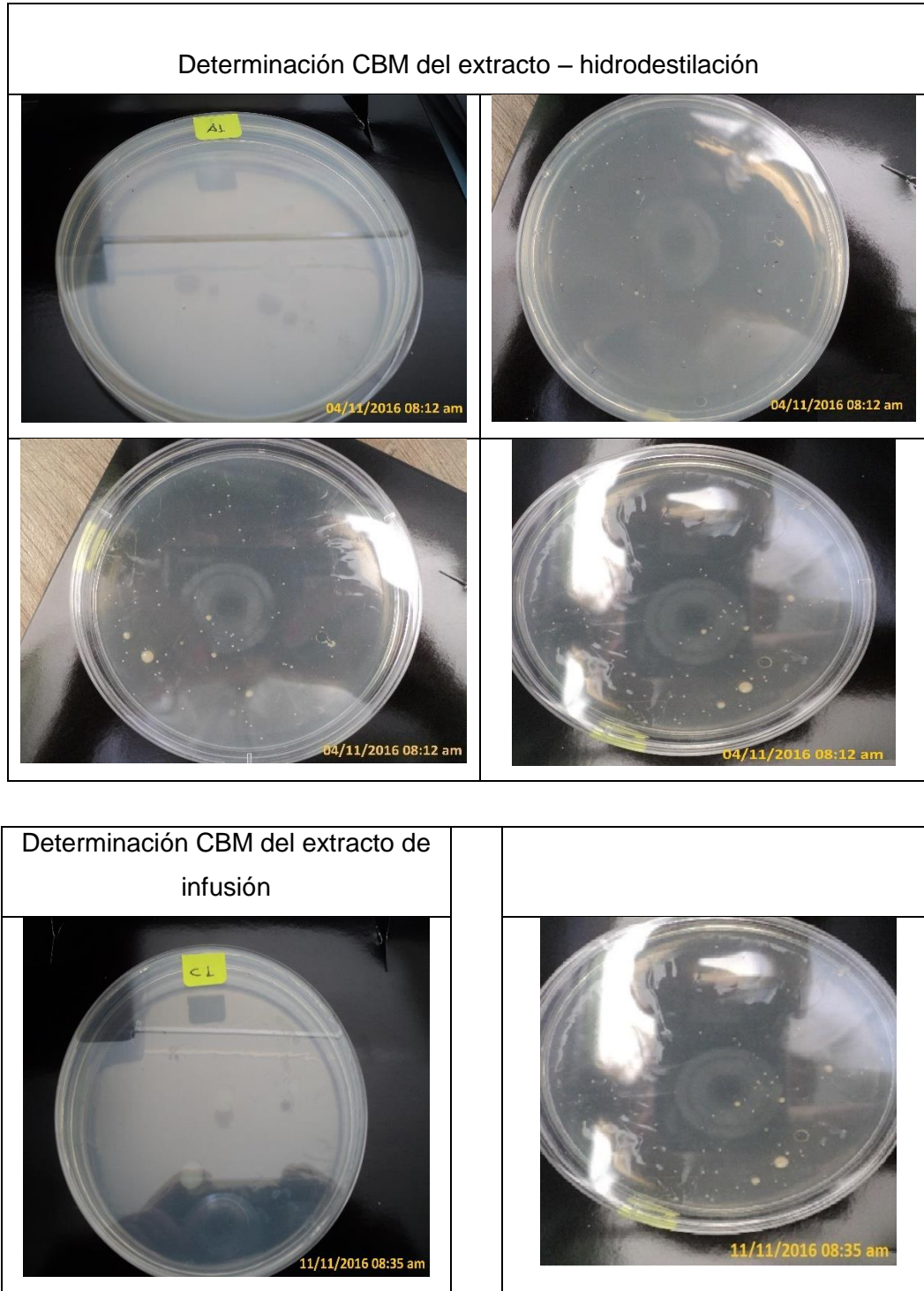


Determinación de la CIM de Extracto de Infusión



ANEXO N° 05: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Figura 9: Determinación de la concentración mínima bactericida (CBM)



ANEXO N° 06: CALIBRACIÓN DE PEACHÍMETRO

1. Encender el peachímetro (botón on)
2. Sacar el electrodo de la solución de almacenamiento.
3. Aclarar el electrodo con agua destilada. Luego secar suavemente con papel tisue.
4. Sumergir el electrodo en el depósito de la solución tampón (buffer) pH 7. Teniendo en cuenta que los depósitos y las muestras tienen que estar a temperatura ambiente.
5. Presionar el botón de calibrar.
6. Esperar hasta que el icono de pH pare de parpadear y presionar el botón de calibración nuevamente.
7. Aclarar el electrodo con agua destilada y sécar con papel tisue.
8. Sumergir el electrodo en el contenedor de la solución tampón (buffer) pH 4.
9. Esperar hasta que el icono de pH pare de parpadear y presiona el botón medir.
10. Para finalizar aclarar el electrodo con agua destilada y secarlo con papel tisue e introducir el electrodo a la solución de almacenamiento.

ANEXO N° 07: MEDIOS DE CULTIVO

1. Agar Müeller Hinton

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Fundamento

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ex National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomendó su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que se detallan a continuación: presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, es útil para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos.

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de carne	300.0
Peptona ácida de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	15.0

Preparación

Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas de petri hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

pH final 7.3 +/- 0.1

2. Caldo peptona

Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Fundamento

Medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento. Si es utilizado como medio base para la fermentación de hidratos de carbono, se debe adicionar el indicador de Andrade y el hidrato de carbono en cuestión.

Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0

Preparación

Suspender 15 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7.2 ± 0.2

3. Agar Tripteína Soya Agar

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

Fundamento

La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Fórmula (en gramos por litro)	
Tripteína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

Preparación

Disolver 40 g de polvo deshidratado por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 118-121°C.

pH final: 7.3 ± 0.2

ANEXO N° 08: PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Inocular 3 o 4 colonias de las bacterias en 5 mL de caldo de tripticasa soja (TSB) e incubar a 37°C hasta que la turbidez sea visible (2-5 horas). Ajustar la turbidez con solución salina o caldo de cultivo estéril hasta una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland.

PREPARACIÓN

- Inocular 3 o 4 colonias aisladas en un tubo con tapa estéril, que contenga 5 mL de caldo de tripticasa soja o solución salina e incubar en una estufa a 37 °C hasta que la turbidez sea visible (2-5 horas).
- Después del tiempo transcurrido en la estufa, retirarlo, mezclar bien y realizar la comparación frente al estándar 0.5 de la escala de McFarland, aproximadamente 10^8 UFC/mL
- Si es necesario ajustar la turbidez con solución salina o caldo de cultivo estéril hasta una turbidez equivalente al estándar antes mencionado.

ANEXO N°09: ESCALA DE MCFARLAND

La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico, teniendo como finalidad, establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana, los cuales son utilizados para estandarizar el número bacterias aproximado en una suspensión, comparando la turbidez de la misma con la turbidez del estándar. Los estándares de McFarland se preparan agregando cloruro de bario (1.175% p/v) a una solución de ácido sulfúrico (1% v/v) para obtener un precipitado de sulfato de bario. El estándar usado comúnmente es 0.5, el cual representa $1,5 \times 10^8$ bacterias por mililitro.

PREPARACIÓN

Estándar N°	BaCl ₂ 1.175% (p/v)	H ₂ SO ₄ 1% (v/v)	UFC/MI
1	1.0 mL	99.0 mL	3.0×10^8
2	2.0 mL	98.0 mL	6.0×10^8
3	3.0 mL	97.0 mL	9.0×10^8
4	4.0 mL	96.0 mL	12.0×10^8
5	5.0 mL	95.0 mL	15.0×10^8
6	6.0 mL	94.0 mL	18.0×10^8
7	7.0 mL	93.0 mL	21.0×10^8
8	8.0 mL	92.0 mL	24.0×10^8
9	9.0 mL	91.0 mL	27.0×10^8
10	10.0 mL	90.0 mL	30.0×10^8

Fuente: López Goñi Ignacio, Díaz Ramón, Gamazo Carlos. Manual práctico de microbiología.

ANEXO N° 10: DISCOS SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA

Los discos utilizados para la evaluación de sensibilidad antibacteriana deben de mantener ciertas características para su utilización. La FDA recomienda las siguientes características para el papel filtro.

Tipo de papel : Papel filtro whatman N° 5

Color de papel : Blanco

Diámetro aproximado : ¼ de pulgada (6.5 ± 0.5 mm)

Espesor : 0.02 mm

Capacidad de absorción de agua destilada: 2.5 a 3.0 veces su peso

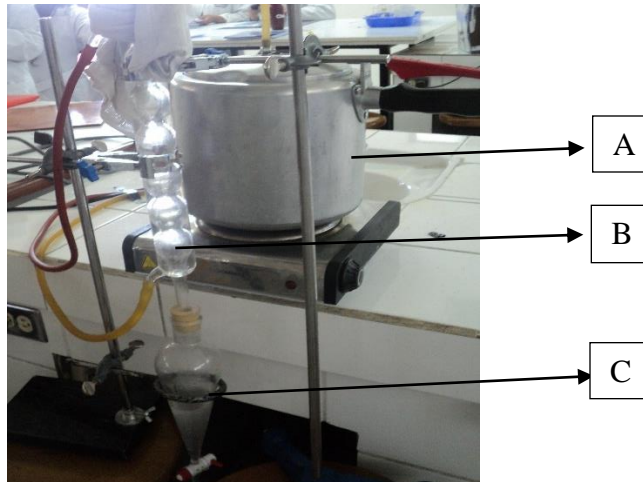
PREPARACIÓN

Realizar perforaciones en el papel filtro, con la utilización de un perforador, de 6 mm de diámetro y luego proceder a la esterilización de los discos en una autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

Utilizando una micropipeta embeber a cada disco con 10µl del antimicrobiano a evaluar, luego repetir el procedimiento hasta llegar a los 20 µl de antimicrobiano.

Colocar los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

ANEXO N° 11: EQUIPO DE DESTILACIÓN ARTESANAL



Fuente: Elaboración propia

- A. La olla presión** se carga de agua y a continuación, se introduce el material vegetal a destilar, quedando separado por una rejilla situada cerca del fondo que evita el contacto directo del material vegetal con el agua.

- B. El tubo refrigerante** está conformado por dos tubos cilíndricos concéntricos. Por el conducto interior del tubo circulará el gas que se desea condensar y por el conducto más externo circulará el líquido refrigerante. Es un aparato de vidrio que permite transformar los gases que se desprenden en el proceso de destilación, a fase líquida.

- C. El embudo de decantación** es un recipiente de vidrio, se usa principalmente para separar líquidos inmiscibles que se separan, por diferencia de densidades.

**ANEXO N° 12: DATOS ESTADÍSTICOS DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA
FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Prueba de Kirby Bauer - Disco difusión	
Hidrodestilación	Infusión
10.0	0.1
10.1	0.1
10.0	0.1

Análisis de varianza de un factor ($\alpha=0.05$)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	30.1	10.033	0.003
Columna 3	3	0.3	0.1	2.89E-34

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variación	S. de cuadrados	G.L.	P. de los cuadrados	F	Probabilidad	V. crít. F
Entre grupos	197.342	2	98.671	88804	3.855E-14	5.143
Dentro de los grupos	0.007	6	0.001			
Total	197.349	8				

**ANEXO N° 13: DATOS ESTADÍSTICOS DE DENSIDADES DE LOS EXTRACTOS DE
Clinopodium bolivianum (muña)**

Densidad	
Hidrodestilación	Infusión
0.9636	1.0061
0.9635	1.0061
0.9636	1.0061

Análisis de varianza de un factor ($\alpha=0.05$)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	2.89	0.964	3.333E-09
Columna 3	3	3.02	1.006	6.653E-10

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variación	S. de cuadrados	G.L.	P. de los cuadrado	F	Probabilidad	P. Crit.F
Entre grupos	0.004	2	0.002	966138.35	2.99E-17	5.143
Dentro de los grupos	1.1272E-08	6	1.87867E-09			
Total	0.004	8				

ANEXO N° 14: DATOS ESTADÍSTICOS DE pH DE LOS EXTRACTOS DE *Clinopodium bolivianum* (muña)

pH	
Hidrodestilación	Infusión
3.18	6.2
3.5	6.15
3.73	6.13

Análisis de varianza de un factor ($\alpha=0.05$)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	10.41	3.47	0.076
Columna 3	3	18.48	6.16	0.001

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variación</i>	<i>S. de cuadrados</i>	<i>G.L.</i>	<i>P. de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crít. F</i>
Entre grupos	11.145	2	5.573	213.697	2.65E-06	5.143
Dentro de los grupos	0.157	6	0.026			
Total	11.302	8				

**ANEXO N° 15: DATOS ESTADÍSTICOS DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE LOS
EXTRACTOS DE *Clinopodium bolivianum***

Índice de refracción	
Hidrodestilación	Infusión
1.5	1.0
1.4	1.0
1.5	0.9

Análisis de varianza de un factor ($\alpha=0.05$)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	4.4	1.467	0.003
Columna 3	3	2.9	0.967	0.003

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variación	S. de cuadrados	G.L.	P. de los cuadrados	F	Probabilidad	V. crít. F
Entre grupos	0.38	2	0.19	57	0.000125	5.143
Dentro de los grupos	0.02	6	0.003			
Total	0.4	8				

ANEXO N° 16: CERTIFICADO DE CEPA ATCC

ANEXO N° 17: CERTIFICADO BOTANICO

GLOSARIO DE TÉRMINOS:

Antibacteriano: Sustancias cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta.

Agar: Polisacárido complejo extraído de ciertas algas marinas, el cual no es digerido por la mayor parte de las bacterias. Está constituido por un 70% de agarosa y 30% de agarpectina. Se funde a temperaturas mayores a 100 °C y se gelifica a 40-50°C. Entre sus aplicaciones se encuentran la preparación de medios de cultivo sólidos, emulsiones y como medio de soporte para técnicas de inmunodifusión y electroforesis.

ATCC: American Type Culture Collection. Colección de cepas bacterianas

Antibióticos: Compuestos que inhiben o destruyen de manera selectiva a microorganismos, generalmente a concentraciones bajas. Los antibióticos se utilizan en medicina de manera generalizada para el control de bacterias patógenas, pero éstas por mutación pueden adquirir con rapidez resistencia a ciertos antibióticos.

Bacterias: Organismos unicelulares procarióticos sin núcleo diferenciado, aunque presentan un nucleoide, una estructura que contiene una molécula circular de ADN; sin organelos con membrana; presentan varias formas y se pueden encontrar prácticamente en cualquier ambiente (suelos, aguas, aire, y como simbiosis o patógenos del humano, otros animales y plantas).

Bactericida: Propiedad por la cual un biocida (agente físico o químico) puede matar bacterias, con o sin lisis de éstas.

Bacteriostático: Propiedad por la cual un biocida puede inhibir la multiplicación bacteriana, que se reanuda una vez se remueve el agente.

Cepa: Organismo que presenta un fenotipo característico reproducible de una generación a la otra.

Colonia: Grupo de organismos unicelulares que viven en asociación, a menudo derivado de una sola célula.

Extracción: Operación de separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtiene por lo menos dos componentes:

Halos de inhibición: Es la zona alrededor de un disco de antibióticos en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano

Infección oportunista: Infección producida por organismos generalmente no patógenos en inmunocompetentes, o que causan enfermedad leve y/o autolimitada, curable con los tratamientos de elección; en sujetos inmunocomprometidos puede dar lugar a enfermedad grave o mortal.

Inóculo: El término también se usa para referirse a los organismos simbióticos o patógenos transferidos por cultivo.

Medios de cultivo: Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

Metabolito secundario: Son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo.

UFC: Unidad formadora de colonia, célula bacteriana viva y aislada que en las condiciones adecuadas da lugar a la producción de una colonia de bacterias.