

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL
“MUÑA” *Minthostachys mollis* SOBRE EL GÉNERO
Proteus, CAUSANTES DE INFECCIONES DEL
TRACTO URINARIO**

PRESENTADO POR:

Br. CYNTHIA MADELEINE BACA MELO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

EFFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL
“MUÑA” *Minthostachys mollis* SOBRE EL GÉNERO *Proteus*, CAUSANTES DE
INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

PRESENTADO POR:

Br. CYNTHIA MADELEINE BACA MELO

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Fecha de Sustentación: 12 de Julio del 2017

APROBADO POR EL JURADO REVISOR:

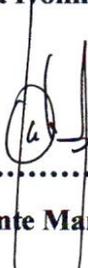
PRESIDENTE

: 
.....
Dr. Buenaventura Optaciano Carpio Vásquez

PRIMER MIEMBRO

: 
.....
Mg. Ciria Iyonne Trigos Rondón

SEGUNDO MIEMBRO

: 
.....
Mg. Dante Mamani Sairitupac

DIRECTOR DE TESIS

:
Dra. Roxana del Carmen Medina Rojas

ÁREA: Microbiología y Laboratorio Clínico
LINEA: Diagnóstico y Epidemiología
TEMA: Bacterias

DEDICATORIA

A Dios

Guía y luz de mi vida, por sus bendiciones y por ser guía en mis decisiones e iluminar mi camino durante mi vida estudiantil

A mis padres

Luis e Idelsa con mucho amor por ser guías en esta vida y por su constante apoyo incondicional, Dios los bendiga siempre.

A mis hermanos

Con mucho cariño a mis hermanos Josué y Luis quienes apoyaron toda iniciativa de estudio, por su comprensión y porque siempre han puesto su confianza en mí.

AGRADECIMIENTO

Mi mayor gratitud es a Dios por haber permitido llegar a este momento, por todos estos años de cuidado, por su abnegado amor.

A la Universidad Nacional del Altiplano, a la facultad de Ciencias Biológicas por recibirme en sus aulas.

Mi especial gratitud a la Dra. Roxana Medina Rojas, Directora de tesis, por el apoyo confianza, paciencia y el impulso que me dio para la culminación de este trabajo.

A todos los docentes de nuestra facultad por su denodado esfuerzo por nosotros y constante apoyo para formar buenos estudiantes y buenos profesionales.

A los miembros del jurado por el apoyo y sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo.

A mis amigos Ivan y Maryela por su amistad sincera y apoyo constante en los momentos de alegría y de tristeza quienes con sus palabras me alentaron a no rendirme.

INDICE

RESUMEN.....	10
I.INTRODUCCIÓN.....	11
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	15
2.1 Antecedentes.....	14
2.2 Marco teórico.....	18
2.2.1 Plantas medicinales.....	18
2.2.2 “Muña” <i>Minthostachys mollis</i>	18
2.2.3 Aceites esenciales.....	23
III. MATERIAL Y MÉTODO.....	38
3.1 Área de estudio.....	38
3.2 Diseño y tipo de estudio.....	38
3.3 Población y muestra.....	38
3.4 Métodos.....	38
3.4.1 Identificación de especies del género <i>Proteus</i> causantes de infecciones del tracto urinario mediante pruebas de confirmación bioquímica.....	38
3.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a dosis de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre especies del género <i>Proteus</i> : <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morgani</i> , causantes de infecciones del tracto urinario a partir del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i>	42
3.5 Técnicas de análisis estadístico.....	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1 Identificación de especies del género <i>Proteus</i> mediante pruebas de confirmación bioquímica.....	51
4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a dosis de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre especies del género <i>Proteus</i> : <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morgani</i> , causantes de infecciones del tracto urinario a partir del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i>	55
4.3 Comparación del efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i> sobre las especies de género <i>Proteus</i> causantes de infecciones del tracto urinario respecto de la Vancomicina.....	62
CONCLUSIONES.....	64
RECOMENDACIONES.....	65



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	66
ANEXOS.....	71

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Identificación de especies del genero <i>Proteus</i> : <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morganii</i> en el medio Triple Sugar Iron (TSI).....	45
Cuadro 2. Identificación de especies del genero <i>Proteus</i> : <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morganii</i> en el medio Lysine Iron Agar (LIA).....	46
Cuadro 3. Identificación de especies del género <i>Proteus</i> : <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morganii</i> en el medio Citrato Simons.....	47
Cuadro 4. Identificación de especies del género <i>Proteus</i> : <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morganii</i> en la prueba de Indol.....	48
Cuadro 5. Obtención del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i>	50
Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i> a 25 %, 50 %, 75 %, 100 % y halos de inhibición sobre <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morganii</i> ,.....	52
Cuadro 7. Prueba Tukey para el efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i> a 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morganii</i>	54
Cuadro 8. Diferencias de porcentajes de acuerdo a la Vancomicina.....	57
Cuadro 9. Comparaciones múltiples para el efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i> a 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morganii</i> respecto de la Vancomicina.....	58
Cuadro 10. Preparación de medio Mac Conkey.....	69
Cuadro 11. Preparación de medio TSI.....	69
Cuadro 12. Preparación de medio Citrato Simmons.....	69
Cuadro 13. Preparación de medio SIM.....	70
Cuadro 14. Preparación de agar Mueller Hinton.....	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Vancomicina.....	36
Figura 2. Extracción etanólica del aceite esencial.....	45
Figura 3. Normalización del inóculo bacteriano. Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	46
Figura 4. Preparación de discos de sensibilidad. Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	47
Figura 5. Difusión en agar. Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	48
Figura 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de “muña” <i>Minthostachys mollis</i> a dosis de 25 %, 50 %, 75 %, 100 % y halos de inhibición sobre <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. morgani</i> . Realizado en la ciudad de Puno (Mayo 2016).....	58
Figura 7. “Muña” <i>Minthostachys mollis</i> . Realizado en la ciudad de Puno (Febrero 2016).....	74
Figura 8. Secado de la muña en ambiente oscuro. Realizado en la ciudad de Puno (Febrero 2016).....	74
Figura 9. Pesado de la muña. Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Marzo 2016).....	74
Figura 10. Macerado de la muña. Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Marzo 2016).....	74
Figura 11. Aceite esencial de muña obtenido de las hojas. Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Marzo 2016).....	74
Figura 12. Aislamiento e identificación de cepas de <i>Proteus vulgaris</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	75
Figura 13. Identificación de <i>Proteus mirabilis</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	75

Figura 14. Identificación de <i>Proteus rettgeri</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	75
Figura 15. Identificación de <i>Proteus morgani</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	75
Figura 16. Antibiograma con discos de sensibilidad conteniendo el aceite de muña. Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	75
Figura 17. Efecto del aceite esencial de muña sobre <i>Proteus vulgaris</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	76
Figura 18. Efecto del aceite esencial de muña sobre <i>Proteus mirabilis</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	76
Figura 19. Efecto del aceite esencial de muña sobre <i>Proteus rettgeri</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	76
Figura 20. Efecto del aceite esencial de muña sobre <i>Proteus morgani</i> . Realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNA-PUNO (Abril 2016).....	76

RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno – Perú, durante los meses de octubre del 2014 a abril del 2016. Los objetivos fueron: Identificar especies del género *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morgani*, mediante pruebas de confirmación bioquímica. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) a partir de la obtención del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* y comparar su efecto inhibitorio con respecto a la Vancomicina. Mediante el proceso de extracción etanólica se logró obtener el aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* con un importante rendimiento que permitió aplicar a diferentes concentraciones sobre especies del género *Proteus* proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional “Honorio Delgado Espinoza” de Arequipa, siendo viabilizadas e identificadas a través de las pruebas de confirmación bioquímica las especies de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri* y *Proteus morgani*. Se aplicó el método de difusión en agar para determinar el efecto inhibitorio realizando las pruebas de sensibilidad a concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % del aceite esencial, utilizando como solvente etanol de 96°. Se usó el paquete estadístico SPSS, el análisis de varianza (ANOVA) y un análisis posterior con pruebas post-hoc (Tukey). Se tuvo como resultado que la concentración mínima inhibitoria para *Proteus vulgaris* es a partir del 50 % (50 mg/ml) con un halo de inhibición de 11.90 mm, mientras que en *Proteus mirabilis* la concentración mínima inhibitoria fue a partir de 75 % (75 mg/ml) con un halo de 7.37 mm, *P. rettgeri* es a partir del 75 % (75 mg/ml) con un halo de 7.00 mm y para *Proteus morgani* también fue a partir del 75 % (75 mg/ml) con un halo de 6.90 mm. Con respecto a las concentraciones y dimensiones de los halos es notoria la diferencia en la sensibilidad obtenida entre *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Proteus morgani*, por ello se considera que estadísticamente es significativa. El aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* a la concentración del 50 % (50 mg/ml) en *P. vulgaris* tuvo un efecto inhibitorio de 59.5 %, para *P. mirabilis*, *P. morgani* y *P. rettgeri* a la concentración de 75 % (75 mg/ml), tuvo un efecto inhibitorio de: 40.9 %, 38.8 % y 38.3 % respectivamente, mientras que el antibiótico control Vancomicina mostró un efecto inhibitorio del 100 %.

Palabras clave: Aceite esencial, Efecto inhibitorio, Infección, *Minthostachys mollis*, *Proteus*, Tracto urinario.

I. INTRODUCCION

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las principales causas de infección bacteriana que afecta a personas de diversas edades a nivel mundial, nacional y regional, siendo especialmente importante en mujeres gestantes. Estas enfermedades de salud pública se reportan a menudo siendo los principales causantes *Escherichia coli* con 90 %, seguido de *Klebsiella* sp. 6 %, *Proteus* sp. 5 %, *Enterobacter* sp. 2 %, *Pseudomona aeruginosa* 2 %; sin embargo en los últimos años se han venido registrando altos índices de resistencia bacteriana por especies del género *Proteus* (Foxman, 2003), lo cual motivó realizar esta investigación mediante la aplicación de la medicina natural combatiendo estas infecciones con la planta medicinal *Minthostachys mollis*.

Se sabe que *Proteus* es un género de bacterias gram negativas, que incluye patógenos causantes de muchas infecciones del tracto urinario, crecen en medios comunes y moderadamente selectivos a temperatura corporal de 37°C formando capas diseminadas por virtud de su gran motilidad (Patton *et al.* 2005). Existen cuatro especies que causan infecciones oportunistas en el hombre: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morgani*. Todas la especies son responsables de infecciones urinarias y más del 10% de complicaciones son a nivel del tracto urinario incluyendo cálculos y lesiones celulares del epitelio renal, enteritis especialmente en niños, abscesos hepáticos, meningitis, otitis media, además de ser un frecuente invasor secundario de quemaduras y heridas, así como infecciones nosocomiales. Todas las especies de *Proteus* son resistentes a diferentes fármacos como la ampicilina, mientras que *P. mirabilis* es sensible a penicilina y a las cefalosporinas, existiendo diferencia en la resistencia entre cada especie. *Proteus* expresa diversos factores de virulencia que le permite la resistencia a fármacos siendo en la mayoría de los casos de origen endógeno (Brock *et al.* 1999).

Por otro lado se conoce que con el transcurrir del tiempo las especies del género *Proteus* han ido desarrollando una resistencia bacteriana progresiva debido a una mala aplicación de los antibióticos comerciales por lo cual se realiza esta investigación basada en el uso de recursos naturales que puedan ser usadas en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y que no presenten un costo elevado, además, teniendo en cuenta que en la sierra del Perú existe gran diversidad de plantas medicinales, siendo uno de los pilares de la medicina natural y que desde épocas ancestrales hasta la actualidad los pobladores andinos han dado solución a los problemas de salud de una forma empírica y de aplicación

natural. El aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*, es un producto volátil de naturaleza compleja, obtenido a partir de “muña” que le confiere un aroma agradable. Los aceites esenciales son productos naturales de gran valor e importancia económica en el mundo, su bioactividad se investiga a partir de los diferentes efectos farmacológicos que producen sus metabolitos, los cuales se obtienen por diferentes procedimientos y técnicas físico químicas a partir de las hojas, flores y tallos. La técnica utilizada en esta investigación para la obtención del aceite fue la extracción etanólica.

La muña es una planta arbustiva leñosa oriunda del Perú, su nombre científico es *Minthostachys mollis*, esta especie cuyo cultivo es muy difundido en las regiones andinas son muy empleadas por las comunidades nativas y campesinas, conocida en Quechua como “muña”, y en Aymara “Coa” y/o “Huaycha”. El aceite esencial de la muña contiene muchas sustancias entre otras como parte del principio activo a las moléculas de Pulegona, Carvacrol, Linalol y Timol. La medicina popular no podía dejar de beneficiarse con tantas virtudes curativas y es que siendo una especie de múltiples aplicaciones y poderosas propiedades bactericidas es que se ha aplicado en esta investigación con importantes resultados que constituyen un aporte a la actividad antimicrobiana de bacterias causantes de infecciones del tracto urinario.

Esta investigación no solo reporta el efecto inhibitorio del aceite de “muña” *Minthostachys mollis* como alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por especies del género *Proteus*, sino también las diferencias de comportamiento de las especies del género *Proteus* frente al aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*. Dentro de este contexto, se utilizó el aceite natural de “muña” *Minthostachys mollis*, como antibiótico natural para determinar el efecto inhibitorio sobre especies del género *Proteus*, ya que estas plantas poseen actividad terapéutica y que han sido utilizadas en forma empírica por los pobladores de nuestra región la cual tiene múltiples usos como condimento, repelente de insectos, para aliviar malestares gastrointestinales, tratamiento de tumores, inflamaciones, asma, halitosis entre otros, hecho que conlleva a corroborar las propiedades y beneficios que poseen científicamente esta planta frente a infecciones bacterianas.

Los resultados obtenidos dan respuesta a la actividad antibacteriana que posee *Minthostachys mollis* cuyo efecto inhibitorio es en forma proporcional, a mayores

concentraciones mayor sensibilidad del género *Proteus* frente a *Minthostachys mollis* lo cual varía según la especie responsable de las ITUs. Este importante aporte contribuye al conocimiento de un tratamiento alternativo ya que permitirá su aplicación sin inducir a afectos colaterales, sin costos significativos para quienes cursan una infección urinaria por las especies de los microorganismos investigados sirviendo también estos datos como base para su utilización en la industria farmacéutica.

De esta manera se valida el efecto antibacteriano de *Minthostachys mollis* y el valor científico de esta investigación.

Por lo considerado se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus* causantes de infecciones del tracto urinario.

Objetivos específicos

1. Identificar especies del género *Proteus*: *P.mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morgani*, causantes de infecciones del tracto urinario mediante pruebas de confirmación bioquímica.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) a dosis de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre especies del género *Proteus*: *P.mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morgani*, causantes de infecciones del tracto urinario a partir del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*.
3. Comparar el efecto inhibitorio que ejerce el aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* sobre las diferentes especies de género *Proteus* causantes de infecciones del tracto urinario respecto de la Vancomicina.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes

Primo *et al.*, (2002), investigaron la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) en *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*, observando buena actividad antibacteriana, mostrando sensibilidad con 5 mg/ml de aceite esencial y con escasa actividad contra *Pseudomona aeruginosa* con 10 mg/ml de aceite esencial. Los aceites esenciales de otras especies como el de la “mandarina” *Citrus reticulata* poseen actividad antibacteriana sobre otras bacterias como: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*, usando el método de difusión en agar y utilizando concentraciones de 1 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % del aceite esencial, se logra determinar la actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* a todas las concentraciones excepto al 1 % y sobre *Proteus mirabilis* al 50 %, demostrando así la efectividad del aceite (Martínez *et al.*, 2003).

Laciar *et al.*, (2009), evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial del ajeno (*Artemisia echegarayi*) extraído de sus partes aéreas, frente a especies bacterianas contaminantes de alimentos, utilizando las técnicas de difusión con discos en agar y micro dilución en placa respectivamente; demostraron que *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* son las bacterias más sensibles, mas no así *Proteus mirabilis*, que no demostró sensibilidad al aceite. El extracto de ajo posee un efecto antimicrobiano en bacterias entéricas como *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.* y *Proteus mirabilis*; indicando que *Shigella sp.* posee alta sensibilidad al ajo, mientras que *Proteus mirabilis* es menos sensible (Matthew *et al.*, 2007).

Cano (2008), reportó la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de “muña” *Minthostachys mollis* en hongos dermatofitos como *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Candida albicans*; obtuvo el aceite por el método de destilación por arrastre de vapor y usó el método de difusión en agar, el aceite esencial de muña inhibió completamente el desarrollo de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*, para *Candida albicans* logró un halo

de inhibición de 30 mm para el aceite al 100 % y 35 mm al 50 %. La actividad antimicótica del aceite de las hojas de muña, fue probablemente por la acción de los monoterpenos encontrados como pulegona, mentona, limoneno y mirceno. Nascimento *et al.* (2000) observaron actividad antibiótica *in vitro* de algunos aceites esenciales obtenidos por extracción etanólica de plantas y fitoquímicos mostrando inhibición en *Cándida albicans* de un 33 %; en otros estudios se evaluó el efecto antimicrobiano de la "muña" sin embargo no se obtuvieron halos de inhibición a ninguna concentración (50 % y 100 %) en ninguna cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, por lo que no se pudo determinar fehacientemente su actividad antimicrobiana (Salmón, 1994).

Gamarra (2011), reportó la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de "muña" *Minthostachys mollis* haciendo comparación con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*; concluyendo que el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* al 100 % tiene mayor efecto contra *Candida albicans* que el fluconazol; además, el efecto antimicótico del fluconazol es mayor que *Minthostachys mollis* al 25 % y el mismo que *Minthostachys mollis* al 50 %.

Díaz (2005), determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de la "muña" *Minthostachys mollis* frente a *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* sp., *Actinomyces* sp., *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, siendo la bacteria más sensible *Fusobacterium nucleatum* y la menos sensible *Actinomyces* sp., con una media de 20,13 mm y 11 mm diámetro en sus halos de inhibición, respectivamente; además, el aceite esencial de muña posee efectividad antibacteriana sobre otras bacterias de importancia estomatológica como *Prevotella melaninogénica* ATCC 25845 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; usando el método de difusión en agar con disco y diluyendo el aceite en alcohol etílico de 70° en las concentraciones de 25 % y 50 %, se logra concluir que al realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro*, el aceite de "muña" *Minthostachys mollis* puro y en sus diluciones presenta alta efectividad antibacteriana frente a las bacterias mencionadas (Azaña, 2010).

Contreras (2008), determinó cualitativamente y cuantitativamente el efecto antimicrobiano del aceite de "muña" *Minthostachys mollis* a concentraciones de 50 %, 75 % y 100 % frente a *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, usando el método de difusión en agar, resultando *Shigella dysenteriae* la más susceptible al aceite esencial de "muña" a la concentración del 75%, *Shigella dysenteriae* posee una

concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de 4 µg/ml, una sensibilidad de 21,41 mm de diámetro y además evidencia la presencia de fenoles, los que validan la actividad antimicrobiana del aceite de *Minthostachys mollis* (Carhuapoma *et al.*, 2009).

Carbajal (2005), estudio el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de la muña (*Satureja boliviana*) y de la pata muña (*Hedeoma mandoniana*) sobre *Escherichia coli* enteropatógena, para así conocer si existe diferencia significativa entre el efecto de ambos aceites. Utilizó la técnica de difusión en agar, notando la susceptibilidad de *Escherichia coli* a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6,5541 mg/ml con el aceite de muña y 8,469 mg/ml con el aceite de pata muña; comprobando así que no hay diferencia significativa entre el efecto antibacteriano entre ambos aceites.

Velásquez (2007), realizó una investigación en la Universidad Mayor de San Andrés titulado “Actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisiodes*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Piper asperifolium* y *Cestrum parqui* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*”- La Paz. Quien usando el método de extracción etanólica obtuvo 5 ml de extracto aceite utilizando 60 g de hojas y flores.

Malpartida (2010), investigó el efecto inhibitor del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* en comparación al paramonoclorofenol Alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, con el fin de comparar las medidas de los halos de inhibición formados al cabo de 24 y 72 horas; se reactivaron las cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), se sembraron en agar Mueller Hinton con pozos de 6 mm de diámetro, se vertieron 20 µl de aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* aproximadamente, paramonoclorofenol alcanforado, gluconato de clorhexidina al 2 % y agua destilada, se realizó la medición de los halos de inhibición con un calibrador vernier a las 24 y 72 horas, concluyendo que el efecto inhibitor del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* es menor que paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2 % en el cultivo bacteriano de *Enterococcus faecalis*.

Luqman *et al.*, (2007), reportan que la inactivación microbiana de los aceites esenciales es causada por daño en pared celular de microorganismos, desordenes en la membrana citoplasmática, agotamiento de las fuerzas motrices de los protones, coagulación de los contenidos celulares o alteración en el flujo de electrones, en el flujo del contenido celular

y en el transporte activo. Al exponer las células a concentraciones letales de agentes antimicrobianos naturales (carvacrol y timol) hay cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados (Burt *et al.*, 2007).

Alaba, (2014) determinó el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de la “muña” *Minthostachys Mollis* frente a cepas de *Enterococcus Faecalis*, usando el método de difusión de discos o Kirby-Bauer. Se utilizaron 7 placas Petri con agar Muller-Hinton donde se sembraron las cepas del *E. faecalis* y se colocaron el aceite esencial de muña al 100% y en dilución etanólica al 50 %, se evaluó las placas midiendo el halo de inhibición de cada disco a las 24, 48 y 72 horas utilizando una regla milimetrada. A las 24 horas todos los discos produjeron un halo de inhibición, donde el mayor registrado fue el del aceite esencial al 100 %, los halos disminuyeron de tamaño en la lectura a las 72 horas. Por lo cual se concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 100 % posee mayor actividad inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento del *Enterococcus Faecalis*.

Cruzado (2012), determinó la concentración mínima inhibitoria de la “muña” *Minthostachys mollis* mediante la técnica de arrastre de vapor frente a *Streptococcus mutans* para buscar alternativas nuevas a la prevención de la caries dental, uso concentraciones del 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, la amoxicilina de 30 μ g fue el control positivo, a la concentración del 50 % presenta efecto inhibitorio y esa va aumentando en relación con el aumento de la concentración del aceite y este es estadísticamente similar al obtenido por la amoxicilina.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Plantas medicinales

El empleo de plantas como tratamiento de diversos males (fitoterapia), se viene usando desde tiempos muy remotos, basándose en conocimientos tradicionales y creencias populares, transmitidos de generación en generación (Caceda, 1999). Las plantas medicinales no han aminorado su importancia a pesar de los avances en la producción de la medicina moderna, por el contrario, el desarrollo de los medicamentos modernos ha sido resultado de las formas cada vez más complejas de aprovechar las plantas medicinales y su producción continua dependiendo del uso de plantas como materia prima en gran parte, por lo tanto hoy en día, muchas propiedades terapéuticas de diversas plantas han sido demostradas científicamente en base a la extracción de sus principios activos con diversas actividades biológicas (Bardales, 1999). El valor de las plantas curativas como recurso medicinal, es por la presencia de una sustancia química (principio activo) que produce un efecto fisiológico. Muchos de los principios activos son complejos, pero se desconoce aún su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. Generalmente pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, taninos, fenoles, alcaloides, glúcidos, saponinas, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas (Thompson, 1981).

2.2.2 “Muña” *Minthostachys mollis*



Taxonomía

Dominio:	Eukarya
Reino :	Vegetal
Sub reino :	Embryophyta
División :	Magnoliophyta
Clase :	Magnoliopsida
Sub clase :	Methachlamydeae
Orden :	Tubiflorae
Familia :	Lamiaceae (Labiatae)
Género :	<i>Minthostachys</i>
Especie :	<i>mollis</i>

Nombre vulgar : “Muña” (Freire, 2004).

Descripción general de la “muña” *Minthostachys mollis*

La muña es una planta oriunda del Perú su nombre científico es *Minthostachys mollis*, su cultivo es bastante difundido en las regiones andinas, principalmente en Apurímac, Ayacucho, Cuzco, Huancavelica y Puno siendo muy empleada en las comunidades nativas y campesinados de Sudamérica, es conocida como orégano en Colombia y peperina en Argentina, además se encuentra en Ecuador, Venezuela, Brasil y Bolivia, habita en los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, se denomina en la lengua Quechua “muña”, y en la Aymara tiene 2 nombres: “Coa” y “Huaycha”. Otros nombres con los que se le conoce son: "Muña negra", "Polco silvestre", "coz", "muña-muña", "arash muña", "kon", "Orcco-muña" (Caceda, 1999).

La muña habita entre los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, existe en gran abundancia, es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3500 msnm, es una planta hemicriptófila que durante la época más fría y seca del invierno desaparecen sus órganos aéreos (Caceda, 1999) y brotan nuevamente con las primeras lluvias de la primavera, alcanza una altura de 1.50 m, desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, crece en lugares cercanos a acequias y manantiales, se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, con buena retención de humedad, tienen un pH entre 5 - 8 y un clima con bastante luminosidad, se multiplica por semilla y por codo (Alonso, 2006).

Características botánicas de la “muña” *Minthostachys mollis*

Es una planta leñosa, arbustiva y frondosa en la parte superior, la hoja es ligeramente aserrada, carece de estípulas, (Rivarola, 2008), el peciolo mide aproximadamente entre 4 y 6 mm de largo, pubescente acanalada en la parte superior y convexo en la parte inferior, es aquí donde se deposita la mayor cantidad de aceite, que al estrujarlos dejan sentir su aroma característico (Alonso, 2006).

Las flores son hermafroditas, de 1.7 a 2.5 cm en su mayor ancho y de 2 a 4 cm de largo; su ápice es agudo de nerviación penninervia con base atenuada de bordes aserrados. El limbo es pubescente tanto en el haz como en el en vez, por lo cual la hoja presenta una coloración verde pálida; sus nervaduras secundarias son muy desarrolladas y ligeramente reticuladas (Sotta, 2000), su cáliz es soldado con 13 venaciones terminado en 5 lóbulos dentados casi iguales entre sí con pelos cerulosos en la base, la corola raramente es de 6 mm, los pelos de las partes de las hojas y tallos, parece que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial, es por esto que al estrujarlos dejen sentir su aroma o el sabor picante que da una impresión de frío que es característico. Las flores están situadas en la parte superior de las ramas con pedúnculos cortos, 2 en cada axila, son pequeñas y están reunidas en verticilos falsos (Caceda, 1999).

Composición química del aceite esencial de la “muña” *Minthostachys mollis*

El aceite esencial de la muña está compuesta principalmente por monoterpenos como: mentona 19,20 %, pulegona 21,61 %, carvacrol 23,26 %, además de limoneno, isomentona 19,46 %, α - pineno, β - pineno, ácido piperínico, mentol y eucaliptol (Gibaja, 1999).

Principales moléculas con acción bactericida presentes en el aceite esencial de la “muña” *Minthostachys mollis*

Pulegona

Uno de los componentes más importantes del aceite esencial de *Minthostachys mollis* y de muchos aceites, usado también en perfumería y saborizantes, en grandes cantidades es altamente tóxico, daña el hígado y puede provocar el aborto. Su toxicidad probablemente explica algunos de los efectos del aceite de *Minthostachys mollis* contra las plagas y parásitos (Badui, 1998).

Linalol

Frecuentemente es uno de los menores componentes del aceite de *Minthostachys mollis*, usado como condimento e insecticida, linalol es más conocido como compuesto del cilantro (*Coriandrum sativum*) (Badui, 1998).

Carvacrol

Se han encontrado para ser componentes dominantes en una menor proporción de los estudios del aceite de *Minthostachys mollis*. se encuentra en varias hierbas como la ajedrea de verano (*Satureja hortensis*), el tomillo (*Thymus serpyllum*) o el orégano (*Origanum vulgare*), es sobre todo un sazoador (Gibaja, 1999).

Timol

A veces se encuentra como un componente menor en el aceite de *Minthostachys mollis*, esta sustancia es bien conocida como aceite de distintas especies de tomillo. Actúa como antiséptico y contra el dolor de garganta y tos (Badui, 1998).

Propiedades y usos de la “muña” *Minthostachys mollis*

La medicina popular no podía dejar de beneficiarse. Se sabe que es una especie de múltiples aplicaciones con tantas virtudes curativas y alimenticias su empleo como infusión o mate (hojas y flores) es imprescindible para aliviar malestares estomacales, afecciones diarreicas, flatulencias, vómitos y afecciones reumáticas, también posee propiedades sedantes y hemostáticas (Caceda, 1999). En casos de soroche ayuda a liberar los bronquios y disipar el mareo, estimula la descongestión de las vías respiratorias, ayuda a combatir jaquecas y es excelente contra la halitosis (Rivarola, 2008).

Tiene propiedades carminativas por lo que es aconsejable contra las flatulencias en personas de todas las edades, ayuda a eliminar los parásitos intestinales. Hieronymus en su obra *Plantae diaphoricae florum argentinæ* (1882) menciona su empleo con efectividad contra el cólera, por parte de los serranos de Córdoba, además en recientes investigaciones efectuadas por laboratorios de Austria y Suiza se ha descubierto que su composición química favorece la curación de innumerable afecciones a los ojos, tales como la catarata, degeneración macular, la miopía, y favorece la agudeza en la visión (Rivarola, 2008).

Los antiguos pobladores del Perú la emplearon como resolutiva de tumores y sus hojas mezcladas con chilca eran recomendadas en fracturas de huesos. Es así como las hojas de muña contribuyen en la curación de fracturas, luxaciones y tumores ocasionados por golpes. (Gibaja, 1999), actualmente también los hueseros logran recuperaciones asombrosas aplicando su aceite esencial en luxaciones y frotaciones antirreumáticas (Rivarola, 2008), También se emplea como saborizante y aromatizante en la elaboración de licores y bebidas amargas (Sotta, 2000).

Quizás uno de sus usos menos conocidos, es la fabricación de la llamada Q'oa Muña conocida como pólvora; elaborada a partir de sus tallos leñosos cargados con su resina. Esta pólvora del ande es utilizada en algunas comunidades de Ayacucho en los fuegos artificiales durante las fiestas patronales (Sotta, 2000).

Sus efectivas propiedades bactericidas (Rojas *et al.*, 2006), han sido útiles, durante miles de años, para conservar la papa contra las plagas en la germinación de sus semillas y también, durante su almacenamiento porque tiene un fuerte efecto repelente sobre los "gusanos de tierra" que devoran los tubérculos, tallos, hojas y es anti moho; de igual manera protege al maíz, col y cebolla (Gibaja, 1999), además en algunos lugares de Colombia la emplean en el campo pecuario para controlar los ectoparásitos y endoparásitos de los animales domésticos y ganado, usado para curar sarna en equinos y camélidos. Es como repelente contra las pulgas y para el control del gorgojo del frijol, también para la fumigación de zancudos y moscas (Fuertes, 2000).

Estudios realizados del aceite de la “muña” *Minthostachys mollis* en otros microorganismos

Por la información de nuestros ancestros sabemos de las bondades que nos ofrece la muña y las aplicaciones que le podemos dar mediante infusiones, extractos entre otros (Azaña, 2010), es por esto que a lo largo del tiempo se ha estudiado científicamente el efecto antibacteriano, antifúngico, etc que puede tener el aceite de muña sobre diferentes microorganismos, es por esto que gracias a nuevas investigaciones actualmente se sabe que el aceite de *Minthostachys mollis* (muña) tiene un efecto antibacteriano en bacterias orales como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* sp., *Actinomyces* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, en bacterias prevalentes en patologías periapicales como *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis*, y en enterobacterias como *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. También

se llegó a determinar que el aceite de *Minthostachys mollis* (muña) además de ser antibacteriano tiene propiedades antimicóticas ya que se probó esto en cepas de *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Candida albicans* (Alzamora *et al.*, 2001).

2.2.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son productos volátiles de una compleja naturaleza, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. Habitualmente, también se denominan esencias, esta denominación es mucho más amplia, ya que engloba aceites esenciales y a otras sustancias obtenidas por métodos extractivos diversos (Gros, 1990).

Los aceites esenciales son líquidos, transparentes, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos). Algunos aceites esenciales son inflamables. Generalmente, son menos densos que el agua (Tadeo, 2004). Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua, son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, eter etílico, etc.). La solubilidad en alcohol es variable y suelen ser solubles en alcoholes de graduación alta. Tienen índices de refracción elevados y presentan actividad óptica (desvían el plano de la luz polarizada, tienen poder rotatorio). Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos (Kuklinski, 2008).

Localización del aceite esencial en las plantas

Se producen y se almacenan en células glandulares, que tapizan el interior de las hojas y tallos, en pelos glandulares de las plantas o en otras células especializadas. También pueden estar ubicados en diferentes partes de la planta; por ejemplo, en las coníferas esta en todo el tejido; en la rosa solo en el pétalo; en el comino en las semillas; en el clavo de olor en el brote o yema; en la lima en los frutos (AAF, 2002).

Obtención de aceites esenciales

Hoy los aceites esenciales sintéticos u obtenidos de fuentes naturales por distintos métodos se purifican normalmente por destilación al vacío.

Uno de los métodos utilizados es el de extracción con solventes.

Extracción con solventes: Uno de los solventes para la extracción es el etanol.

Extractos Etanólicos

Con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (Tadeo, 2004).

Maceración: Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, previamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, de preferencia el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se utiliza un recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se coloca el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días agitando esporádicamente. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (Tadeo, 2004).

Percolación: Conocido también como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos ya que se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo y hacer pasar un disolvente adecuado a través de él. Se requiere agregar solvente constantemente (Tadeo, 2004).

Función de los aceites esenciales en las plantas

Los aceites esenciales pueden desempeñar diferentes papeles en los vegetales, los cuales, aparentemente, están siempre relacionados con sus propiedades volátiles y olorosas. Intervienen en la polinización, desempeñando un efecto de atracción sobre algunos insectos polinizadores, actúan como defensas frente al ataque de insectos y parásitos, adaptación ante cuadros de escasez hídrica formando parte de las sustancias de reserva (AAF, 2002).

Composición química de los aceites esenciales

Terpenoides: Los compuestos terpénicos proceden de la condensación del isopreno (C₅) y pueden tener o no oxígeno. Los que poseen oxígeno son terpenos funcionalizados con función alcohol, fenol, aldehído, cetona, éter, éster o peróxido, y los que carecen de oxígeno son hidrocarburos: monoterpenos (C₁₀) y sesquiterpenos (C₁₅), que pueden ser alifáticos o aromáticos (Look de Ugaz, 1994).

No terpenoides:

Sustancias volátiles alifáticas.

Sustancias volátiles aromáticas.

Sustancias con estructura C6 – C1.

Sustancias con estructura C6 – C3.

Derivados cumarínicos.

Las sustancias C6-C1 y C6-C3 son sustancias volátiles de bajo peso molecular, generalmente oxigenadas con funciones alcohol, fenol, ácido o éter.

Sustancias nitrogenadas: son poco frecuentes. Existen aminas alifáticas volátiles (metilamina, etilamina, etc.) que tienen olor a pescado y derivados del indol que tiene olor fecal (heces).

Sustancias con azufre: son todavía menos frecuentes que las sustancias nitrogenadas. Ciertas especies contienen isotiocianatos ($R-N=C=S$) y otras contienen sulfuros ($R-S-R$) o disulfuros ($R-S-S-R$) (Alzamora *et al.*, 2001).

Propiedades biológicas de los aceites esenciales

Desde la antigüedad, las especies aromáticas y sus aceites esenciales se han empleado en preparaciones culinarias como agentes saborizantes, aromatizantes, y también como conservantes naturales inhibiendo el deterioro oxidativo y los daños causados por bacterias, hongos u otros microorganismos (Gibaja, 1999), es por esto que actualmente las industrias de alimentos y cosméticos han disminuido el uso de conservantes sintéticos, reemplazándolos por sustancias de origen natural, por tal motivo, el conocimiento de las actividades antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas son importantes para la aplicación de los aceites esenciales en las diferentes industrias (Alonso, 2006).

Las acciones farmacológicas son muy variadas tanto en su utilización por vía tópica como por vía interna. Las acciones más frecuentes son:

Antisépticos: Frente a microorganismos gram positivos, gram negativos y frente a ciertas levaduras (*Candida* sp.) y hongos productores de micosis, el poder antiséptico es variable según las características estructurales de los componentes del aceite esencial, en cual puede tener:

Elevado poder antiséptico: aceites que poseen componentes con un grupo fenol.

Poder antiséptico medio: aceites que poseen componentes con función alcohol.

Bajo poder antiséptico: aceites que poseen componentes con función cetona (Figuroa, 2000).

Antiespasmódicos: Disminuyen los espasmos gastrointestinales y aumentan las secreciones gástricas, por esto se usan sobre el aparato digestivo como coleréticos (facilitan la secreción de bilis por parte de las células hepáticas), eupécticos (o carminativos, es decir, facilitan la eliminación de gases), digestivos, estomacales y colagogos (facilitan la salida de bilis de la vesícula biliar al duodeno), aumenta las ganas de comer (aperitivos) porque incrementa las secreciones salivares y gástricas (Gibaja, 1999).

Sedantes: Algunos componentes de los aceites esenciales tienen acciones sedantes en estados de nerviosismo o ansiedad (Alonso, 2006).

Acción irritante: Algunas esencias aplicadas por vía tópica (sobre la piel) aumentan la circulación capilar y epidérmica y producen un enrojecimiento es decir tiene un efecto rubefaciente. Otros aceites son cicatrizantes y vulnerarios (ayudan a sanar heridas y llagas). Al aplicarlos por vía interna actúan sobre el árbol bronquial, fluidificando las secreciones respiratorias (Kakrani, 1990) y facilitando su eliminación, por tanto son expectorantes; también pueden actuar sobre el aparato renal ejerciendo una acción diurética que no suele aprovecharse porque suele producir hematuria (Gibaja, 1999).

Analgésicos: Ciertas esencias aplicadas por vía tópica presentan una acción analgésica frente a dolores musculares, dolores en las articulaciones, etc. También surten un efecto antiinflamatorio (Alonso, 2006).

Mecanismo de acción del aceite esencial sobre los microorganismos

Este mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y aún no ha sido del todo entendido y explicado. El modo de acción también dependerá del tipo de microorganismos y esta principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos. Kuklinski en el 2008 estableció, *in vitro*, la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antimicótica de los aceites esenciales de *Agria odoratissima*. Las investigaciones plantean que los aceites esenciales interferirían la fase del metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción; en cuanto a las saponinas, estas actúan sobre los lípidos de la membrana ocasionando alteraciones y provocando la muerte celular (Kuklinski, 2008).

2.2.4 Infección del Tracto Urinario (ITU)

La infección del tracto urinario (ITU) es considerada generalmente como la existencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas. El origen bacteriano de la ITU es el más frecuente (80 a 90%); en este caso, la definición exacta exige además de la presencia de gérmenes en las vías urinarias, su cuantificación en al menos 10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml de orina. Sin embargo, varios estudios han establecido que un tercio o más de los pacientes, generalmente mujeres sintomáticas, tiene conteos de ufc por debajo de este nivel y presentan ITU. Los hombres tienen probabilidad en menor proporción de contaminación sintomática, se considera como sugerente de infección una cifra de 10^3 ufc/ml. El diagnóstico de bacteriuria significativa en pacientes cateterizados se hace con valores de 10^2 ufc/ml (Warren, 1999).

Las ITU son clasificadas de distintas formas: alta o baja, aguda o crónica, no complicada o complicada, sintomática o asintomática, nueva o recurrente y comunitaria o nosocomial.

Etiología bacteriana de las Infecciones del Tracto Urinario

Las bacterias responsables de infecciones urinarias son:

- a) Bacterias Gram negativas: *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*.
- b) Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Streptococcus* de los grupos B (Dezell *et al.*, 2008).

Bacterias aisladas en orden de frecuencia en Infecciones del Tracto Urinario

En más del 95% de los casos de ITUs son monobacterianas. El germen presente con mayor frecuencia es *Escherichia coli* (85%), seguido por *Klebsiella pneumoniae* (6%), *Proteus mirabilis* (5%) *Streptococcus agalactiae* (1%) (en mujer gestante, anciano y diabético). Con menos frecuencia es causada por otras enterobacterias (Warren, 1999), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp. o gérmenes micóticos como los géneros *Chlamydia* y *Mycoplasma*. Hasta en 15% de personas con síntomas de ITU no se aísla germen en el urocultivo (MINSa, 2011).

Resistencia antimicrobiana

La resistencia es la pérdida de sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que inicialmente era susceptible. Esto involucra a la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo, el cual es transmitido a sus descendientes, por este motivo resultan también insensibles al antimicrobiano en cuestión. Cuando se prueba en un inicio una droga antimicrobiana se le define el espectro de microorganismos sobre el cual es eficaz e ineficaz, este patrón frecuentemente va cambiando a medida que la droga se utiliza clínicamente (Bailey & Scott, 2007).

Es por esto que la resistencia bacteriana a los antibióticos se relaciona con el consumo de estos ya que favorecen la creación, adaptación y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Patton *et al.* 2005). El tratamiento antibiótico de las infecciones producidas por enterobacterias oportunistas esta fluido por la resistencia natural que presentan muchas de ellas a determinados grupos de antimicrobianos y en particular a los antibióticos Beta-lactamicos. Poseen Beta-lactamasas clase A tipo cefuroximasas y algunos presentan de clase C, es decir la mayor parte de las enterobacterias poseen una Beta-lactamasa cromosómica propia de cada especie, por ello se debe informar periódicamente a los médicos los patrones de sensibilidad de las bacterias potencialmente causantes de infección. Son resistentes a penicilinas, pueden presentar resistencia a cefuroxina, ceftriaxona, cefotaxima y son sensibles a ceftazidima, cefoxitina, aztreonam, cefepime y carbapemen (Sánchez *et al.*, 2003).

Epidemiología

Entre las infecciones más importantes del ser humano, la ITU constituye un importante problema de salud el cual afecta a millones de personas cada año. Es la segunda causa de infección más frecuente en los humanos y solo superada por las infecciones del tracto respiratorio (Patton *et al.* 2005), se sabe que más de la mitad de todas las mujeres tiene al menos una ITU durante su vida y más frecuentemente durante el embarazo. La proporción de frecuencia de ITU entre mujeres y hombres jóvenes es de 30:1; sin embargo, conforme el hombre envejece, esta proporción tiende a igualarse. La ITU es la infección bacteriana más común y el origen más frecuente de bacteriemias en el adulto mayor. Se estima que globalmente ocurren al menos 150 millones de casos de ITU por año (Foxman, 2003).

La incidencia estimada de ITU en los hombres de edad joven con respecto a las mujeres del mismo grupo etario es significativamente inferior, en una relación de 5 a 8 infectados por cada 10 000 personas. La prevalencia de ITU o conocida también como bacteriuria asintomática en el anciano es de 10 % a 50 %, y es moderadamente más elevada en las mujeres. La ITU es una de las infecciones bacterianas más frecuentes de la infancia ya que a los 7 años, aproximadamente 8 % de las niñas y 2 % de los varones han tenido al menos un episodio de ITU. El riesgo de que la ITU retorne es de 10 % a 30 %, en los siguientes 6 a 18 meses (Guentzel, 1996).

Según la Oficina de Estadística de DIRESA Puno en el año 2011 las ITUs ocupan el 4to lugar como causa de morbilidad en la población (Diresa, 2011). *Proteus* sp. ocupa el 4to lugar entre los agentes etiológicos causantes de las ITUs hospitalarias en América Latina después de *E. coli*, *Klebsiella* sp. *P. aeruginosa* y el 3er lugar en América del Norte (Foxman, 2003).

Género *Proteus*

Taxonomía

Dominio:	Bacteria
Reino:	Monera
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Proteus</i>
Especies:	<i>mirabilis</i> <i>vulgaris</i> <i>rettgeri</i> <i>morganii</i> (Koneman, 2008).

Generalidades del género *Proteus*

Proteus es un género de bacterias gram negativas responsables de muchas infecciones del tracto urinario. Las especies del género *Proteus* normalmente no fermentan lactosa por razón de no tener una β galactosidasa, aunque algunas se han mostrado capaces de hacerlo en el test TSI (Triple Sugar Iron o "Triple Azúcar de Hierro"). Son oxidasa negativas y ureasa positivas, algunas especies son motiles, tienden a ser organismos pleomórficos, no

esporulados ni capsulados, producen fenilalanina desaminasa excepto *P. mirabilis*, todas las bacterias del género *Proteus* son positivos a la prueba del indol (Guentzel, 1996).

Hábitat del género *Proteus*

El género *Proteus* son bacterias ubicuas, muy difundido en la naturaleza, se le encuentra en materiales de animales en descomposición, en el suelo, agua, aguas servidas, tracto intestinal del hombre, etc. Juega un papel importante en la descomposición de los cadáveres (Guentzel, 1996).

Morfología del género *Proteus*

La estructura antigénica está compuesta por antígeno somático O, superficial K y flagelar H. El antígeno flagelar H coopera a la capacidad invasora de las vías urinarias. La variante X del antígeno somático O está presente en algunas cepas de *P. mirabilis*. Otros grupos antigénicos definidos son el OX19, OX2 y OXK. El grupo OX19 (y a veces el grupo OX2) produce (aglutinación) reacciones cruzadas en pacientes con *Rickettsia prowazekii* y esa es la base de la prueba de Weil Félix (Patton *et al.*, 2005).

Cultivo del género *Proteus*

Crece en medios comunes y moderadamente selectivos a temperatura corporal de 37°C. Crece formando capas diseminadas por su gran motilidad, existen variantes que son inmóviles y forman colonias lisas. Deben refrigerarse (Patton *et al.*, 2005).

Patogenia del género *Proteus*

Hay cuatro especies que causan infecciones oportunistas en el hombre: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morgani*. Causan infecciones urinarias (que son más del 10% de complicaciones del tracto urinario), enteritis (especialmente en niños), meningitis, abscesos hepáticos, otitis media y neumonía, entre otros. Invasor secundario frecuente de quemaduras y heridas e infecciones nosocomiales. Todas las especies del género *Proteus* son resistentes a la ampicilina, *P. mirabilis* es sensible a la penicilina (Brock *et al.*, 1999).

Factores de virulencia del género *Proteus*

Durante el proceso de entrada al huésped la bacteria toma contacto con los diferentes órganos y tejidos que forman el tracto urinario, a los cuales debe adherirse y colonizar. La adhesión bacteriana a la superficie epitelial es considerada uno de los mecanismos de

patogenicidad mas importantes. Para ello *Proteus* expresa diversos factores de virulencia que le permiten establecer la infección, sus factores de virulencia potenciales son: flagelos, producción de ureasa, hemolisinas, proteasas que clivan inmunoglobulinas (Ig)A e (Ig)G y fimbrias. Estos factores median la adherencia al epitelio, la invasión del tejido y evasión de la respuesta inmune del hospedador (Coker, 2000).

Resistencia a antimicrobianos en especies del género *Proteus*

La mayor parte de la enterobacterias poseen una Beta-lactamasa cromosómica propia de cada especie, *Proteus* resulta resistente a algunos fármacos gracias a la producción de una Beta-lactamasa cromosómica de clase C inducible. *P. vulgaris* contiene una Beta-lactamasa cromosómica de tipo A que le confiere resistencia pero mantiene su sensibilidad a los inhibidores de Beta-lactamasa, intrínsecamente es resistente a las tetraciclinas y a la nitrofurantoina pero suele ser sensible a las aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas, aminoglucosidos y quinolonas, las otras especies comunmente asociadas a patologías humanas como *P.mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morganii* muestran mayor resistencia a los antimicrobianos especialmente a las aminopenicilinas, ureidopenicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, aunque se han descrito brotes de infecciones nosocomiales por *Proteus*, en la mayor parte de los casos las infecciones por este género endógenas, a partir de la colonización intestinal de los propios pacientes (Murray *et al.*, 2002).

Especies

Proteus mirabilis

Proteus vulgaris

Proteus rettgeri

Proteus morganii

Proteus mirabilis

Proteus mirabilis causa el 90 % de todas las infecciones por *Proteus*. es una bacteria gram negativa, facultativamente anaeróbico, con actividad ureasa, muestra aglutinación y motilidad, Indol negativo. Viene de la Tribu *Proteae*. Es motil, posee flagelo peritricoso (Murray, *et al.*, 2002) y es conocido por su habilidad para aglutinarse. Está comúnmente en el tracto intestinal de humanos, no es patógeno en cobayos *Cavia porcellus* o en

gallinas. Se distingue por ser el único organismo patógeno con factor de virulencia nombrado ZapA en honor al músico de rock Frank Zappa. Las colonias de esta bacteria sembrada en un agar para identificación microbiana toman forma de ondas, por esta razón su reconocimiento en los medios de cultivos es muy rápida (Pumarola, 2000).

Proteus vulgaris

Forman parte de la flora normal humana y animal gastrointestinal, se encuentra en suelos, materia fecal y agua sucia. Bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, no tienen esporas y son muy móviles, con flagelos peritricos con forma de bastón, no tienen capsula. Son Indol positivo, fermentan la glucosa, catalasa positiva, son resistentes a AB betalactámicos, invasivos, oxidasa positivos, antígenos K,O,H, posee desamina triptófano, fenilalanina, se encuentra en úlceras, quemaduras infectadas, heridas. Se cultivan en agar chocolate, sangre o EMB, con tiempo de incubación de 5 a 7 días a 37°C, forma colonias transparentes o incoloras. Sus factores de virulencia son flagelos, fimbrias, pilis, hemolisinas, ureasa, citotoxina (Pumarola, 2000).

Proteus rettgeri

Proteus rettgeri es un bacilo gram negativo aeróbico con marcada resistencia contra la mayoría de los antibióticos disponibles actualmente, causa infecciones generalmente confinados al tracto urinario de ciertos tipos de pacientes comprometidos. En ocasiones, se recuperó de los abscesos de tejidos blandos, y rara vez de la sangre y el tracto respiratorio. *Proteus rettgeri* es conocido por causar brotes nosocomiales de infecciones del tracto urinario en las salas de medicina urológica y físicas (Murray *et al.*, 2002).

Proteus morganii

Es oxidasa negativa, pero catalasa y nitrato reductasa positiva, las pruebas específicas incluyen el positivo ureasa (que es la prueba fundamental a distinguir *Proteus* de *Salmonellas*) anaerobios facultativos, es capaz de hidrolizar la urea, tiene una movilidad variable a 36°C y produce ácido y gas a partir de la glucosa, es capaz de reducir los nitratos a nitritos, de fermentar la manosa y es oxidasa negativo como todos los integrantes de la familia Enterobacteriaceae. Las cepas de *Proteus morganii* crecen bien en los medios de aislamiento primarios como el agar sangre y el agar Mac Conkey, no son hemolíticas y usualmente no producen el fenómeno de swarming (Pumarola, 2000).

Pruebas de diferenciación bioquímica para bacterias

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicadas a medios biológicos, los cuales al conocer su reacción nos permite identificar diferentes microorganismos. Su sistema de funcionamiento consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no. Para realizar las pruebas bioquímicas se dispone de múltiples medios diferenciales como:

TSI (Triple Sugar Iron)

Este medio determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico integrado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto a la determinación de posible ácido sulfhídrico, la concentración de lactosa que contiene este medio es de 1% y glucosa 0.1% (Cuervo, 2010), esto permite la observación de la fermentación de uno o de ambos carbohidratos por parte de las bacterias, además de la producción de gas y de ácido sulfhídrico. Las Enterobacterias y los fermentadores de glucosa comienzan metabolizando el azúcar, ya que las enzimas que emplean la glucosa están presentes como constituyentes de las bacterias, y éstas gracias a la utilización del azúcar más simple pueden obtener mayor energía (Bailón *et al.*, 2003).

La utilización de la glucosa se efectúa en forma aerobia sobre la estría, donde el oxígeno presente actúa como aceptor terminal de electrones y en la parte terminal de la columna en condiciones de anaerobiosis. Una vez que una bacteria fermentadora de glucosa ha reducido toda la glucosa disponible a piruvato, comenzará a metabolizar el piruvato a través del ciclo aeróbico de Krebs (sobre la estría), formando productos finales ácidos (Koneman, 2008); después de haber agotado la cantidad limitada de glucosa, una bacteria con capacidad para utilizar la lactosa o sacarosa comenzará a degradarlas. Como el medio contiene 10 veces más lactosa que glucosa, las bacterias encontrarán sustrato suficiente para continuar la formación de productos finales ácidos. Al cabo de 18 – 24 horas de incubación todo el medio TSI permanecerá de color amarillo. Esta reacción se denomina ácido sobre ácido (A/A) y el organismo se identifica como un fermentador de lactosa. La producción de gas provocará la ruptura de la columna de agar o la empujará hacia la parte superior, de modo que un fermentador de lactosa que produce gas dará una reacción A/A más gas (Bailón *et al.*, 2003).

LIA (Lysine Iron Agar)

Mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad. La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo dando así una amina o una diamina y anhídrido carbónico. La descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima común, el fosfato de piridoxal. El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina y CO_2 por acción de la enzima específica lisina – descarboxilasa (Bailón *et al.*, 2003).

Citrato Simons

Este medio contiene citrato como fuente única de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno. No contiene aminoácidos, las bacterias que pueden utilizar el citrato también extraen nitrógeno con la producción de amonio que alcaliniza el medio de cultivo, el azul de bromotimol es el indicador de pH, se siembra solamente en superficie. Esta prueba es positiva cuando se observa un crecimiento con un color azul intenso, y negativa cuando no se observa cambio de color. Si se utiliza carbono a partir de citrato de sodio, también se extrae nitrógeno del fosfato de amonio contenido en el medio, liberándose así amoníaco. En ocasiones se detecta un visible crecimiento a lo largo de la línea de siembra antes de la aparición de color. Este crecimiento indica resultado positivo (Cuervo, 2010).

SIM (Sulfuro, Indol. Movilidad)

Prueba de ácido sulfhídrico: Algunas especies bacterianas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen, produciendo el gas ácido sulfhídrico (H_2S). La cisteína, peptona y tiosulfato son fuentes de azufre, pero las diferentes especies utilizan diferentes compuestos o aminoácidos que contienen azufre para producir SH_2 . La enzima responsable de ésta actividad es la cisteinasa (Bailón *et al.* 2003). La bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio por medio de una reacción de reducción que da un sulfito y un sulfato. Este es un proceso de respiración anaeróbica donde el aceptor de electrones para la oxidación de los sustratos orgánicos es átomo de azufre. El tiosulfato reemplaza al sulfato como aceptor de electrones y es una fuente de azufre para el organismo. El gas incoloro SH_2 reacciona con una sal pesada, citrato férrico

de amonio para producir un precipitado negro insoluble, sulfuro ferroso (Bailón *et al.*, 2003).

Indol: Las bacterias con la enzima triptofanasa, son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con la producción de ácido pirúvico, indol y amonio, lo que implica el sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del indol. El intermediario principal en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico; la degradación del triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoniaco y energía. El ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por medio del ciclo glucolítico o entrar en el ciclo de Krebs liberando CO_2 y H_2O y una gran producción de energía (Cuervo, 2010).

El NH_3 puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos empleando la energía que se encuentra para la reacción anabólica. La prueba de indol se basó en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona el reactivo de Kovacs ya que algunas bacterias utilizan la glucosa, de forma que el valor de pH desciende a menos de 4.4. Sin embargo otras bacterias producen menos ácido, reduciendo en menor cantidad el pH del medio. Esta distinción se hace a través del rojo de metilo, que presenta color amarillo por encima del pH 5.1 y color rojo cuando el pH desciende de 4.4 (Cuervo, 2010).

Movilidad: Determina si un organismo inmóvil o móvil. Las bacterias poseen movilidad por medio de sus flagelos, las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con movilidad producen variantes no móviles que aparentan ser estables y rara vez se revierten en formas móviles (Bailón *et al.*, 2003).

Vancomicina

La vancomicina es un glicopéptido de estructura compleja que se sintetiza de modo natural por *Nocardia orientalis*. Su efecto bactericida se ejerce inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que posee una gran afinidad a los precursores de esta estructura. Su modo de acción se basa en alterar la acción de la transpeptidasa por impedimento estérico.

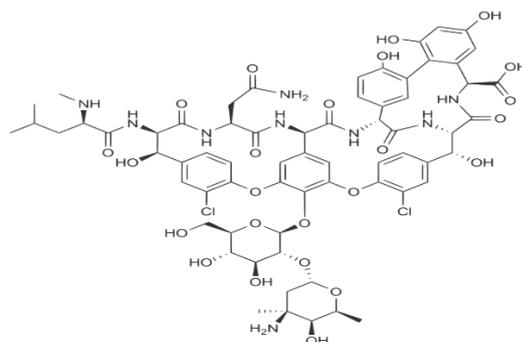


Figura 1. Estructura de la Vancomicina

Fuente: Estudio de sustancias medicamentosas de origen natural. (Kuklinski,2008).

Propiedades: Se absorben mal por el tracto gastrointestinal, excretándose en grandes cantidades por las heces y detectándose solo pequeñas cantidades en suero. Por eso la vía de administración es la parenteral. La vancomicina se difunde bien en los líquidos orgánicos y penetra bien en los tejidos. Solo una pequeña cantidad aparece en la bilis luego de su administración, aunque pueden obtenerse niveles terapéuticos en LCR de pacientes con meninges inflamadas, en pacientes con meninges normales la concentración en LCR es baja. El 55% se une a proteínas plasmáticas y la vida media en pacientes con función renal normal es de 6-8 horas. En casos de anuria la vida media se prolonga a 7,5 días. Después de la administración intravenosa 70 a 90% de la dosis es excretada incambiada por filtración glomerular en un periodo de 24 horas. Debe ajustarse la dosis en presencia de insuficiencia renal. Como el hígado también puede estar implicado en la eliminación de la vancomicina, se aconseja disminuir las dosis en pacientes con insuficiencia hepatocítica severa. La vancomicina no es removida por hemodiálisis ni por diálisis peritoneal, pero métodos de diálisis con altos flujos pueden remover grandes cantidades de la droga. El efecto postantibiótico de la vancomicina es de 1,5 a 3 horas. Su actividad es tiempo-dependiente es decir que se relaciona con el tiempo en que sus concentraciones se mantienen por encima de la CIM para el germen (Kuklinski,2008).

Mecanismo de acción: La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose con alta afinidad a los terminales D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular. Estas unidades están compuestas por ácido N-acetilmurámico, N-acetilglucosamina y un pentapéptido, y forman parte de la estructura del peptidoglucano de la pared celular. La vancomicina inhibe el proceso de la transglicosilación de estos precursores, impidiendo su unión a las capas de

peptidoglucano, afectando la estabilidad de la pared bacteriana al igual que un betalactámico, pero en un sitio de acción distintos a estos. También inhibe la siguiente etapa de formación de la pared celular, la transpeptidación, por un efecto estérico (Kuklinski, 2008)

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Área de estudio

Se realizó la recolección de la muña en el distrito de Ichu, ubicado a 10 km de la ciudad de Puno.

La obtención de cepas del género *Proteus* fueron proporcionadas por el Departamento de Laboratorio y Patología Clínica del Hospital Regional “Honorio Delgado Espinoza” de Arequipa. La obtención del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* y la identificación de especies del género *Proteus* se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

3.2 Diseño y tipo de estudio

Descriptivo: Ya que nos permitió describir e identificar las diferentes especies del género *Proteus* a través de la diferenciación bioquímica así como describir el efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* en cada una de las especies en estudio.
Analítico: Porque se centrará en una relación causa y efecto.

3.3 Población y muestra

Población: Especies del género *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* causantes de infecciones del tracto urinario.

Muestra: Cepas del género *Proteus*, con una reproducibilidad de 40 repeticiones por especie haciendo un total de 160 muestreos.

3.4 Métodos

3.4.1 Identificación de especies del género *Proteus* causantes de infecciones del tracto urinario mediante pruebas de confirmación bioquímica.

La identificación de especies del género *Proteus* causantes de infecciones del tracto urinario se llevó a cabo en 3 etapas, primero se obtuvieron las cepas del género *Proteus*, seguidamente se viabilizaron las cepas con una duración de 3 días y finalmente se realizó la diferenciación mediante pruebas de confirmación bioquímica llevándose a cabo en 2 días.

a) Obtención de las cepas del género *Proteus*.

Se utilizaron cepas de especies del género *Proteus*; que fueron proporcionadas por el Departamento de Laboratorio y Patología Clínica del Hospital Regional “Honorio Delgado Espinoza” de Arequipa.

b) Viabilización de las cepas.

Se colocó con un punzón de Kolle una ufc en caldo nutritivo incubándose por 24 horas, a partir del aislamiento de una cepa del género *Proteus* del tracto urinario, se sembró por el método de agotamiento en una placa Petri con agar Mac Conkey, se codificó la placa con un plumón indeleble, luego se colocó la placa con la muestra en una incubadora a una temperatura de 37° C incubando por 12 a 18 horas y finalmente se retiró la placa de la incubadora y procedió a la diferenciación bioquímica.

c) Diferenciación bioquímica.

Se evaluó las características compatibles con el género para la confirmación de especies del género *Proteus*, con un punzón de Kolle se inoculó en medios diferenciales (Figura 13, 14, 15, 16):

Triple Sugar Iron Agar (TSI):**Fundamento:**

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables.

El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe_3+ , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro de color negro.

El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido.

El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro (Bermúdez, 2000).

Procedimiento:

Se retuvo una ufc del agar Mac Conkey, luego se sembró por puntura en el tubo que contiene el medio TSI, finalmente se estrió en la superficie, incubando a 37°C.

Interpretación:

Color original sin sembrar: Rojo (naranja)

Gas de glucosa positivo = Formación de burbuja pequeña o botado del medio.

H₂S positivo = Precipitado negro.

Fermentación de carbohidratos:

Fondo amarillo = Glucosa positivo

Bisel Rojo = Lactosa negativo, Sacarosa negativo

Bisel amarillo y fondo amarillo = Glucosa positivo, Lactosa positivo y Sacarosa positivo

Lysine Iron Agar (LIA):**Fundamento:**

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano.

La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas de carboxilasa y de aminosasa.

El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico.

El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8.

Por descarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta.

La descarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesario que la glucosa sea previamente fermentada (Bermúdez, 2000).

Procedimiento:

Se realizó dos punturas en el medio LIA y se estrió.

Interpretación:

Positivo = Color morado (alcalino).

Negativo = Color amarillo (ácido).

Cuando hay mucho ácido el bisel también es amarillo, *Proteus* no descarboxila, solo desamina y se forma:

Un ácido débil que reacciona con la sal de hierro y forma un complejo naranja y un amonio que alcaliniza el medio y da un color morado; en conjunto se forma un color púrpura o rojo en el bisel.

Citrato Simons:**Fundamento:**

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano.

Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático.

El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino.

El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad (Bermúdez, 2000).

Procedimiento:

En este medio solo se realizó las estrías en superficie.

Interpretación:

Positivo = Color azul.

Negativo = Color verde (original).

También puede cambiar de color y utiliza la sal de amonio (NH_4), porque se alcaliniza el medio:

Color azul = Citrato positivo (pH alcalino).

Color verde = Citrato negativo (neutro).

Color amarillo = Citrato negativo (ácido).

Puede no cambiar de color, pero si hay crecimiento es positivo, ver otras pruebas.

SIM (Sulfuro, Indol. Movilidad):**Fundamento:**

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol.

En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa.

El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovacs o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo.

Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2 (Bermúdez, 2000).

Procedimiento:

Por último se introdujo por punción en el medio SIM y retiró el punzón de Kolle.

Interpretación:**Indol:**

Color rojo = Positivo.

Color amarillo = Negativo (no se liberó indol porque la bacteria no tiene triptofanasa)

Ácido sulfhídrico H₂S :

Precipitado negro = Positivo.

Sin precipitado negro = Negativo.

Movilidad:

Movilidad Negativa: Si la cepa crece solo en la picadura es inmóvil.

Movilidad Positiva: Si crece en todo el medio, es móvil.

3.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a dosis de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre especies del género *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morgani*, causantes de infecciones del tracto urinario a partir del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*.

La obtención del aceite esencial se realizó en dos etapas, siendo la primera etapa la recolección del material vegetal y la segunda etapa fue la extracción etanòlica del aceite llevándose a cabo en un lapso de 30 días. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó en 4 etapas; normalización del inóculo bacteriano, preparación de los discos de sensibilidad y la prueba de susceptibilidad microbiana.

a) Obtención del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* mediante extracción etanòlica.**Primera etapa:****Recolección del material vegetal****Fundamento:**

Una incorrecta recolección aumenta la cantidad de productos de degradación de la planta recolectada, perdiendo la planta parte de su calidad (Jove, 1994).

Se debe tener en cuenta que dependiendo de la planta que se interesa recolectar, debemos distinguir donde se encuentran los principios activos más intensos y en qué momento, etapa de crecimiento de la planta, parte de la planta y momento de recolección en el día. La hora indicada para la recolección de las especies vegetales es por la mañana. También es muy importante procurar no eliminar ninguna mata para la conservación de la especie (Sisa, 2004).

Procedimiento:

Se procedió a la recolección de la muña en horas de la mañana en el distrito de Ichu, ubicado a 10 Km de la ciudad de Puno, se cortó los tallos con tijeras de podar, colocándolas en bolsas de papel Kraft y se trasladó la planta para su posterior secado (Figura 8).

Secado**Fundamento:**

Eliminación del agua de los tejidos y células de la planta, para evitar la alteración de los componentes de la planta por la humedad persistente. Las hojas se secan con el tallo sin desprenderlas (Sisa, 2004).

Procedimiento:

Se extendieron los tallos sin superponerlos para su desecación óptima por el lapso de 10 días, todo esto se realizó en un ambiente protegido de la luz solar y ventilado (Figura 9).

Segunda etapa:**Extracción etanólica del aceite esencial.****Fundamento:**

Los aceites esenciales extraídos por este método son obtenidos a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico (Tadeo, 2004).

Procedimiento:

Se trituró finamente 250 g de hojas de muña, se enfrió 1 l de etanol al 96 % en el refrigerador por 1 hora, se lavó 1 frasco de 500 ml y dejó secar, se colocó 250 g de hojas de muña en el frasco, se vertió 400 ml de etanol aproximadamente, lo suficiente como para cubrir las hojas en el frasco y tapanlo, luego se agitó el frasco varias veces y colocó en un lugar fresco y seco (Figura 10, 11)

Se dejó que la mezcla de extracción repose por dos días, agregando etanol según sea necesario para cubrir las hojas que absorbieron el etanol durante los primeros días de la extracción, se mantuvo la mezcla de extracción en un lugar fresco y seco por 30 días, se agitó el frasco cada 24 horas para ayudar a mantener el aceite activo y facilitar su extracción, se tamizó el macerado al cabo de 30 días con dos capas de tela de gasa para extraer el aceite residual y se colocó sobre un envase hondo.

Seguidamente se colocó el envase en el congelador a -4°C , se enfrió la mezcla de extracción durante 2 horas hasta que el aceite se separó del alcohol, luego se retiró el aceite que flotaba por encima del alcohol, colocándose en un envase de vidrio ámbar con tapa esterilizado previamente.

Finalmente se llevó el frasco a refrigeración para su conservación a -4°C (Figura 12).

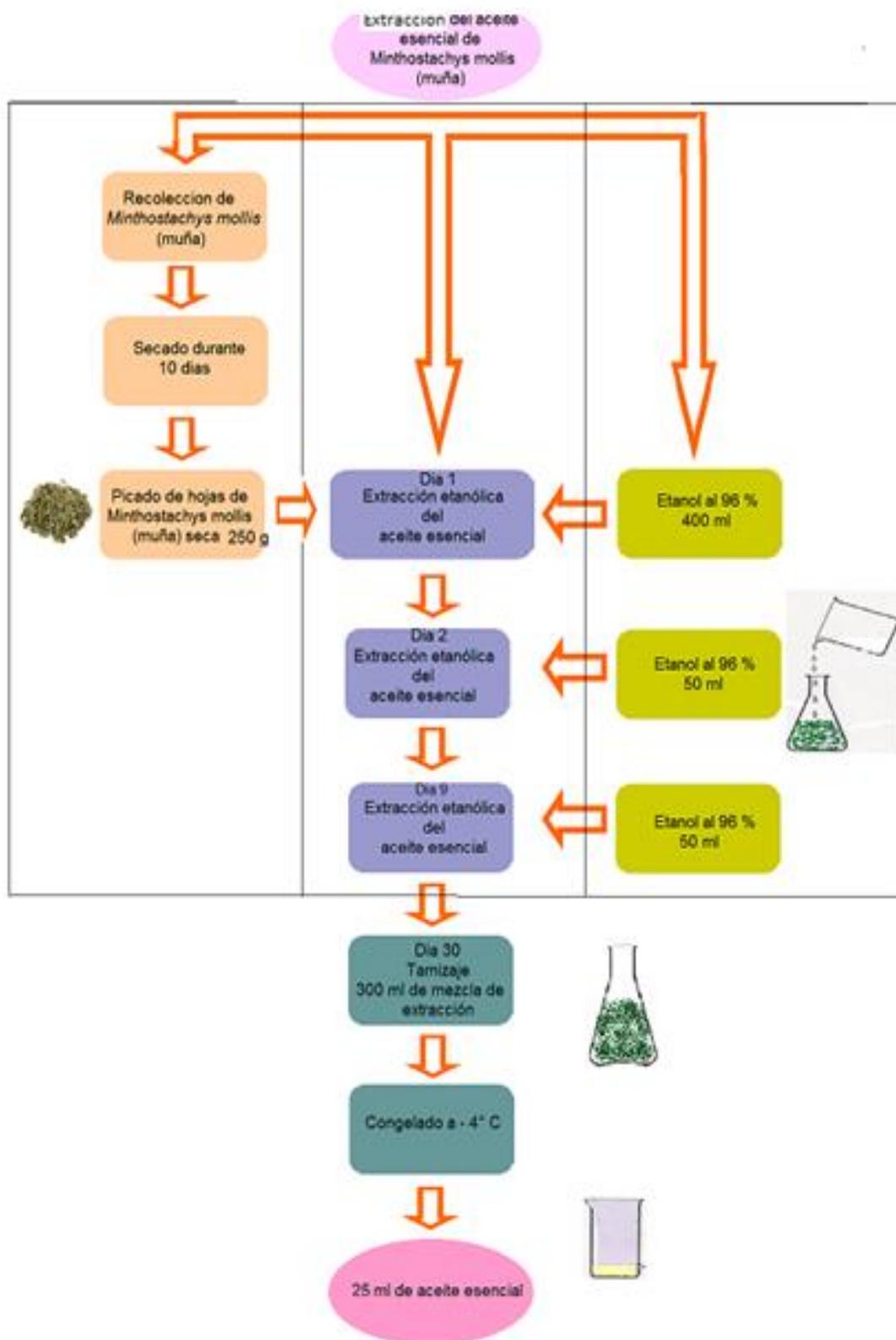


Figura 2. Extracción etanólica del aceite esencial.

FUENTE: Extracción del aceite esencial de "muña" *Minthostachys mollis*. (Tadeo - 2004)

b) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

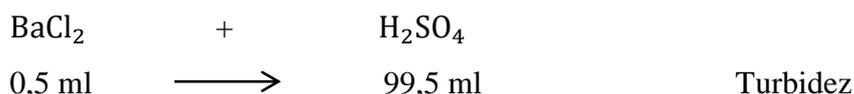
a) Normalización del inóculo bacteriano.

Fundamento.- El inóculo bacteriano debe contener una cantidad normatizada de unidades formadoras de colonia (ufc), para minimizar la variación de la población bacteriana, esta cantidad es de 1×10^8 ufc/ml la que se determina mediante el estándar de Mc Farland (Moromi, 2002).

Procedimiento:

Preparación del estándar de Mc. Farland.

Composición:



Preparación:

Preparación del estándar de turbidez (0,5 Mac. Farland) para el inóculo (Figura 1).

Se agregó 0,5 ml de BaCl₂ en 99,5 ml de una solución de H₂SO₄, se verificó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro a una absorbancia de 625 nm. Distribuyendo finalmente 6 ml en tubos con tapa rosca y se conservaron a temperatura ambiente.

Preparación del inóculo bacteriano

Una vez preparada el estándar de turbidez (escala Mc. Farland), se estandarizaron las muestras.

En un tubo de ensayo estéril con tapa se colocaron 4 ml de solución salina estéril (Figura 1).

Se recogió 3 a 5 colonias con el asa de Kolle y colocó en el respectivo tubo de ensayo. Luego se homogenizó la suspensión inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de Mc. Farland, correspondiente a una suspensión aproximada de 1×10^8 ufc/ml.

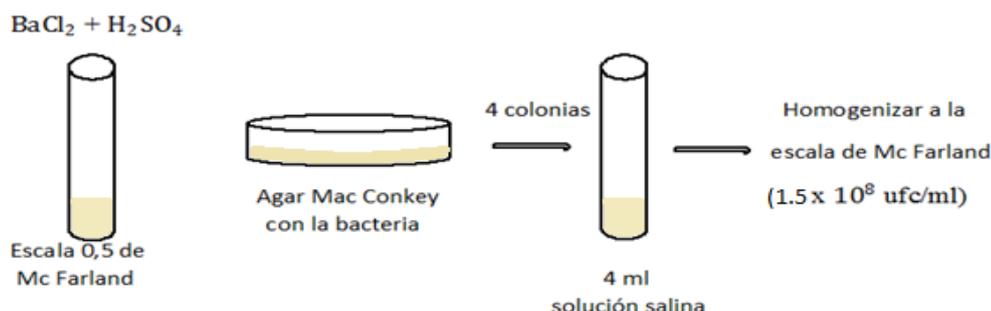


Figura 3. Normalización del inóculo bacteriano.

b) Preparación de los discos de sensibilidad

Se obtuvieron discos a partir de papel filtro Watman N° 4 de 6 mm de diámetro con un perforador y se colocaron en frascos estériles, las concentraciones del aceite de muña se diluyeron en etanol de 96°, los discos se empaparon con 20 μ l del aceite de muña preparados a diferentes concentraciones (100 %, 75 %, 50 %, 25 %), luego se dejaron secar. Posteriormente se colocaron en frascos estériles y diferenciaron las concentraciones de los discos de sensibilidad para evitar confusiones, se colocaron a temperatura ambiente y en un lugar seco hasta su uso (Figura 2).

Se usó como control discos del antibiótico Vancomicina de 30 μ g con el estándar de medidas de halos de inhibición (mm): Resistente \leq 14, Intermedio 15 – 16, Sensible \geq 17 (NCCLS, 2000)

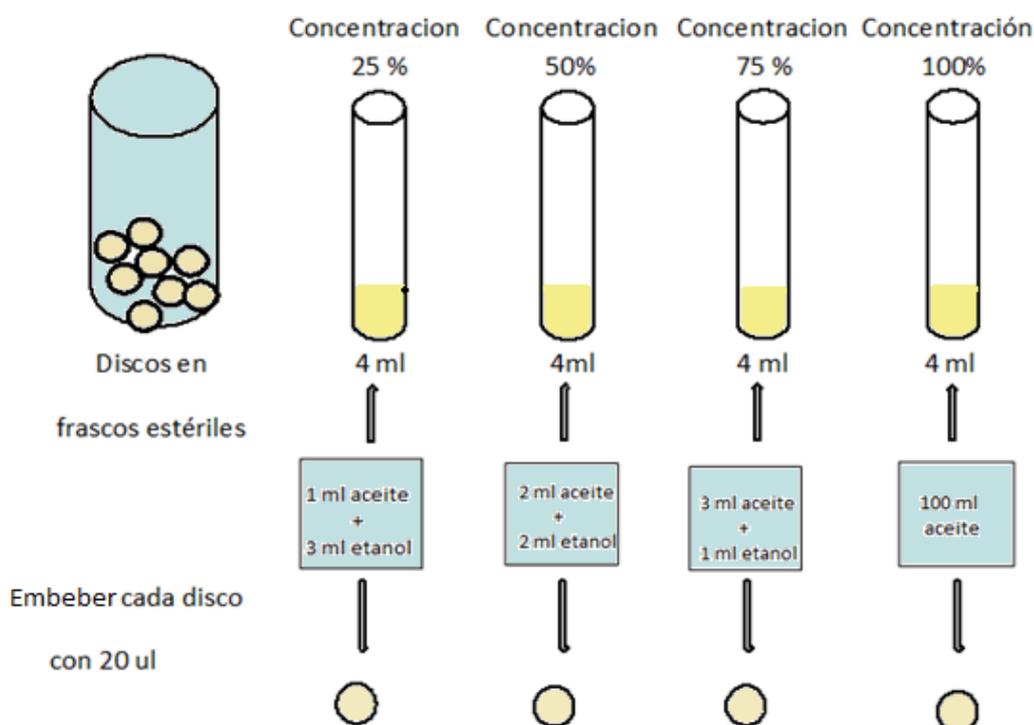


Figura 4. Preparación de discos de sensibilidad.

c) Prueba de susceptibilidad microbiana

Método de difusión en agar según Kirby Bauer

Fundamento:

Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco. Un disco que tiene una cantidad específica de antimicrobiano, es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano se difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de

antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano, la zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente con la CMI (Moromi, 2002).

Procedimiento:

Se preparó medio agar Mueller Hinton, se vertió el medio en placas Petri estériles aproximadamente 25 ml por placa, dejando solidificar y colocándolas en la incubadora por 24 horas, luego dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, siempre dentro del radio de 10 cm de esterilidad del mechero de alcohol se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces y presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo, se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad, luego se colocó los discos de sensibilidad impregnados en aceite de muña en sus diferentes concentraciones (Figura 3).

Se colocaron las 40 placas petri por especie a 37°C en la incubadora por 12 horas.

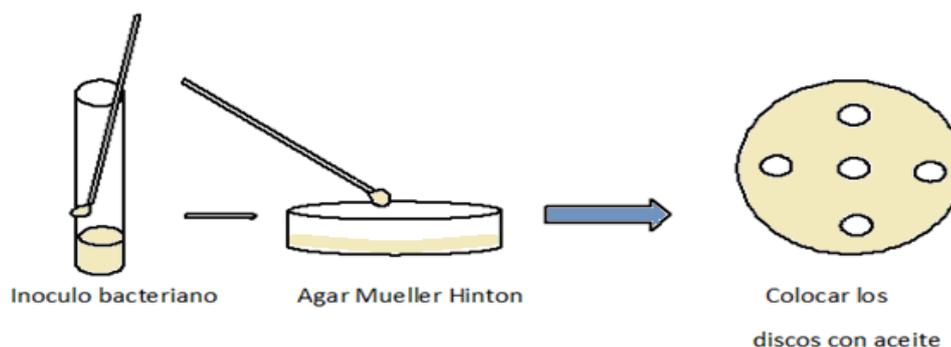


Figura 5. Difusión en agar

d) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Fundamento:

Se basa en la sensibilidad del microorganismo frente a la menor concentración de antibacteriano que a simple vista la inhibe (Rodríguez, 2002).

Procedimiento:

Se procedió a la medición de los halos inhibitorios del aceite de muña en sus diferentes concentraciones, se registraron los datos en la ficha matriz de recolección (Figura 17, 18, 19, 20, 21).

3.5 Técnicas de análisis estadístico

ANOVA Simple

Para determinar si existe o no diferencia significativa entre el uso de las diferentes dosis aplicadas se usó el procedimiento de ANOVA de 1 factor que está diseñado para construir un modelo estadístico que describa el impacto de un solo factor categórico X sobre una variable dependiente Y. Se realizan pruebas para determinar si hay o no diferencias significativas entre las medias, varianzas y/o medianas de Y en los diferentes niveles de X.

En ambos casos para determinar si las medias de que grupos difieren o no significativamente unas de otras, los resultados se presentan en la Tabla de ANOVA: La tabla divide la variabilidad que existe en las n mediciones entre dos componentes: Un componente “intra grupos”, Un componente “entre grupos”.

En el cuadro se presenta la suma de cuadrados calculada según la varianza de los totales:

$$\sigma_t^2 = \frac{\sum n(M^2 + \sigma^2)}{\sum n} - M_t^2$$

Esta Varianza de los totales multiplicada por el número de los sujetos nos da la suma de cuadrados, con cuyo valor se calcula la F directamente con la siguiente formula:

$$F = \frac{\frac{\text{suma de cuadrados entre}}{\text{grados de libertad entre}}}{\frac{\text{suma de cuadrados dentro}}{\text{grados de libertad dentro}}} = \frac{\frac{N\sigma_M^2}{k-1}}{\frac{n\sum\sigma^2}{N-k}}$$

El siguiente paso es calcular la suma de cuadrados total, nos va a hacer falta de nuevo la varianza de los totales, que multiplicada por N nos va a dar la suma de cuadrados total, la fórmula queda simplificada así:

$$\sigma_t^2 = \frac{\sum M^2 + \sum \sigma^2}{k} - M_t^2 \quad [33]$$

De particular importancia es la razón de F, que prueba la hipótesis de que la respuesta media para todos los niveles de X es la misma. Formalmente, prueba la hipótesis nula versus la hipótesis alterna.

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_q$

H_A : no todas las iguales

Como resultado final si la F es lo suficientemente grande, se rechaza la hipótesis nula. La significancia estadística de la razón de F es mucho más fácil de juzgar por su valor de P . Si el valor de P es menor que 0.05, la hipótesis nula de medias iguales se rechaza al nivel de significancia del 5%.

Pruebas de Rangos Múltiples

Para validar los resultados de las pruebas anteriores es necesario determinar qué medias son significativamente diferentes. Para factores que muestran P -Valores significativos en la tabla ANOVA y que no interactúan con otros factores, se realizará un análisis posterior llamado Pruebas de Rangos Múltiples en este caso se usó el método de Tukey HSD. Que ensancha los intervalos para permitir comparaciones múltiples entre todos los pares de medias usando la t de Tukey. Tukey llamó a su procedimiento el de Diferencia Honestamente Significativa ya que controla la tasa de error experimental a α . Se eligió el procedimiento de Tukey porque es más conservador que el procedimiento LSD de Fisher, pues hace más difícil declarar cualquier par particular de medias como significativamente diferentes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de especies del género *Proteus* mediante pruebas de confirmación bioquímica.

Cuadro 1. Identificación de especies del genero *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* en el medio TSI (Triple Sugar Iron).

	Triple Sugar Iron Agar (TSI)							
	<i>P. vulgaris</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>P. rettgeri</i>		<i>P. morganii</i>	
Glucosa	+	K/A	+	K/A	+	K/A	+	K/A
Lactosa	-		-		-			
Sacarosa	-		+		+			
H ₂ S	+		+		-			
Gas	+		+		-			

En el cuadro 1, reporta que en las cuatro especies del género *Proteus* se observan una reacción propia de las enterobacterias al fermentar la glucosa a partir de las 18 horas de incubación, no se observa diferencia en el comportamiento de las cuatro especies al no degradar la lactosa; sin embargo si se aprecia diferencias en la degradación de sacarosa pues las especies de *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *P. morganii* fueron positivas a este carbohidrato con excepción de *P. vulgaris* que resulto negativa. De igual forma, se observó también una marcada diferencia en la metabolización de tiosulfato de sodio con la producción de sulfuro de hidrógeno en las especies de *P. vulgaris* y *P. mirabilis*, y reacción negativa en la especie de *P. rettgeri* y *P. morganii*. Así mismo se revela diferencia en la producción de gas resultando *P. vulgaris* y *P. mirabilis* positivas a este y negativas a *P. rettgeri* y *P. morganii* debiéndose recurrir a las pruebas complementarias de Citrato e indol para la identificación y diferenciación correcta entre especies

Los resultados obtenidos reportan que todas las especies del género *Proteus* fermentan la glucosa a partir de las 18 horas de incubación, sin embargo se observó una marcada diferencia en el comportamiento de las cuatro especies frente a la lactosa y sacarosa donde las especies de *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morganii* muestran comportamientos similares al utilizar la sacarosa, mientras que no lo hace *P. mirabilis*. Mas por el contrario se observa homogeneidad con respecto a la utilización de la lactosa donde *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morganii* no son capaces de degradar este carbohidrato. Con respecto a la producción de sulfuro de hidrogeno se evidencia

diferencia ya que solo *P. vulgaris* y *P. mirabilis* mostraron producción de este compuesto porque poseen cisteinaza, siendo la enzima responsable de esta actividad, mas no fue así en *P. rettgeri* y *P. morganii*. Referente a la producción de gas las cuatro especies resultan positivas esto debido a la fermentación de la glucosa tal y como lo confirma Bailón *et al.*, (2003) quien corrobora los resultados expuestos en esta investigación.

A diferencia de otras investigaciones como la realizada por Matthew *et al.*, (2007); esta investigación demuestra el comportamiento bioquímico diferencial que identifica a cuatro especies del género *Proteus* relevante para instaurar un tratamiento específico, ya que tal y como lo refiere Hernández *et al.*, (2006), la resistencia a los fármacos antimicrobianos es diferente según se trate de *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morganii* quienes poseen Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) que los hace cada vez más resistentes por la propagación de plásmidos o vectores y transposones, a diferencia también de *P. vulgaris* cuya resistencia es atribuida a sus componentes de estructura como lipoproteínas, polisacáridos, y lipopolisacáridos así como lo afirma Koneman (2008).

Cuadro 2. Identificación de especies del genero *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* en el medio LIA (Lysine Iron Agar).

	Lysine Iron Agar (LIA)							
	<i>P. vulgaris</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>P. rettgeri</i>		<i>P. morganii</i>	
Descarboxilación	-	R/A	-	R/A	-	R/A	-	R/A
Desaminación	+		+		+		+	
Reacción negativa	-		-		-		-	

En el cuadro 2, se reporta la reacción de desaminación del aminoácido de la lisina, las cuatro especies presentan una reacción desaminativa de la lisina, dicha reacción le otorga soporte a las especies de este género siendo las únicas de la familia enterobacteriaceae que observaron dicho comportamiento. Así mismo las cuatro especies resultan negativas a la descarboxilación de la lisina.

Los resultados obtenidos demuestran que todas las especies del género *Proteus* desaminan la lisina también conocida como desaminación oxidativa, siendo esta una reacción química que se caracteriza por la ruptura de un grupo amino, esta reacción

es muy importante a nivel biológico en la degradación de los aminoácidos. Estos resultados son corroborados por Bailón *et al.*, (2003) quien refiere que al desaminarse la lisina se produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio. Así mismo se evidencia que ninguna especie del género *Proteus* descarboxila la lisina pero si fermentan la glucosa, es por esto que producen un viraje al amarillo en todo el medio así como lo menciona Terragno (2007), dando sustento a esta investigación.

Cuadro 3. Identificación de especies del género *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* en el medio Citrato Simmons.

	Citrato Simmons			
	<i>P.vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. morganii</i>
Fuente de carbono	+	+	+	-

El cuadro 3, reporta que en el medio Citrato Simmons se observa de manera clara la positividad en la mayoría de especies *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *P. rettgeri* mas no fue así en *P. morganii* ya que esta especie no fue capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono para el metabolismo.

Los resultados obtenidos reportan que *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *P. rettgeri* fueron capaces de utilizar como única fuente de carbono al citrato para su crecimiento y metabolismo, provocando de esta manera alcalinidad, esta reacción se debe además a que el metabolismo se realiza mediante el ciclo de Krebs y requiere el desdoblamiento del citrato por la enzima citritasa la cual actúa sobre el citrato produciendo ácido oxalacético y acetato, convertidos enzimáticamente a piruvato y dióxido de carbono, el medio comienza a alcalinizarse por el CO₂ que se genera, el cual se combina con el agua y el sodio para formar Carbonato, un producto alcalino, este carbonato da la alcalinidad que produce el cambio de color del indicador de pH del medio de verde a azul Prusia oscuro (indicador: azul de bromotimol, amarillo a pH < 6.0 y azul a pH > 7.6) tal como lo refiere Bailón *et al.*, (2003).

Sin embargo *P. morganii* resulto negativo ya que no fue capaz de utilizar al citrato como fuente de carbono para su metabolismo, esto es corroborado por Cuervo (2010) afirmando que, efectivamente *P. morganii* es la única especie del género *Proteus* que no

será capaz de aprovechar el citrato, por otro lado también menciona que el medio incluye citrato de sodio, un anión como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

Cuadro 4. Identificación de especies del género *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* en la prueba de Indol.

	Indol			
	<i>P.vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. morganii</i>
Triptofanasa	+	-	+	+

En el cuadro 4, se observa la reacción positiva de indol en *P. vulgaris*, *P. rettgeri* y *P. morganii*, demostrando que estas especies poseen la enzima triptofanasa, sin embargo la reacción es negativa en *P. mirabilis* ya que no posee esta enzima y no producirá indol.

Estos resultados obtenidos reportan que *P. vulgaris*, *P. rettgeri* y *P. morganii* muestran comportamientos homogéneos resultando estos positivos a la prueba de Indol, esta reacción se debe a que poseen la enzima triptofanasa, además que también son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amonio así como lo afirma Moromi (2002).

La prueba del indol se basa en la formación de un complejo rojo cuando el Indol reacciona con el grupo aldehído p-dimetilaminobenzaldehido, este es el principio activo del reactivo de Kovacs, es por esto que resultan positivos a la prueba de Indol, sin embargo existe diferencia marcada en la reacción de *P. mirabilis* ya que esta bacteria es la única del género *Proteus* que no posee la enzima triptofanasa, no logrando la formación del complejo rojo con el reactivo de Kovacs. Estos resultados lo confirman Moromi (2002), corroborando así los resultados de la investigación.

Finalmente los resultados obtenidos aceptan la hipótesis planteada al identificar las cuatro especies del género *Proteus*; *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii* según las pruebas bioquímicas aplicadas.

4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a dosis de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre especies del género *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morgani*, causantes de infecciones del tracto urinario a partir del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*.

a. Obtención del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* mediante el método de extracción etanólica.

Cuadro 5. Obtención del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*.

	Peso materia seca (g)	Cantidad etanol de 96 ° (ml)	Aceite esencial (ml)
Día 1	250	400	-
Día 2	250	50	-
Día 9	250	50	-
Día 30	250	-	25
TOTAL	250	500	25

En el cuadro 1, se observa que para la extracción del aceite esencial a partir de 250 g de las hojas de “muña” *Minthostachys mollis*, el primer, segundo, y noveno día se agregaron 400, 50 y 50 ml de etanol de 96° respectivamente con la finalidad que este permanezca al nivel de las hojas de “muña” *Minthostachys mollis* y macerar y deshidratar la planta en los que no se obtuvo el aceite esencial tal y como lo refiere Tadeo (2004), posteriormente el día 30 se obtuvo 25 ml del aceite esencial.

Los resultados muestran similitud con los obtenidos por Velásquez (2007), en la Universidad Mayor de San Andrés en La Paz Bolivia, investigó la actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisiodes*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifolium* en donde a partir de 60 g de hojas y flores de cada una de las especies investigadas, obtuvo un promedio final de 5 ml del aceite esencial, la similitud con los resultados obtenidos puede basarse en el hecho de que en ambas investigaciones se usó el método de extracción etanólica, donde la planta debidamente fragmentada se masera en etanol hasta que éste penetre en la primera

estructura celular ablandando y disolviendo las porciones solubles al como lo indica Agapito (2003), a su vez la deshidratación induce que la planta expulse el aceite que contiene dentro de su pared celular mezclándose con el etanol y que luego durante el proceso de enfriamiento a bajas temperaturas el aceite tienda a elevarse a la superficie por diferencia de densidades.

Los resultados obtenidos no muestran homogeneidad con los reportados por Cano (2008) en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Lima – Perú quien a partir de 10 k de hojas de “muña” *Minthostachys mollis* obtuvo 21 ml del aceite esencial, la diferencia de los resultados pueden deberse al método de extracción arrastre de vapor de agua al cual recurrió y que por condensación separa el agua del aceite debido a que al destruirse la pared celular de las hojas por acción del calor pierde su permeabilidad dando así una menor cantidad del producto, mientras que para esta investigación se aplicó el método de extracción etanólica donde el rendimiento fue mayor puesto que se usó una menor cantidad de materia prima con obtención de una similar cantidad de aceite esencial, además de la diferencia de la zona donde se recolectó la planta, la época del año, ya que como lo refiere Alonso (2006), la concentración de los componentes con actividad biológica, varía según la etapa de crecimiento y desarrollo de la planta.

b. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* a 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre *P.mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii*.

Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* a 25 %, 50 %, 75 %, 100 % y halos de inhibición sobre *P.mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii*,

Especie		Concentraciones del aceite esencial (20 ul/disco)			
		25 mg/ml	50 mg/ml	75 mg/ml	100 mg/ml
	Nro de observaciones	40	40	40	40
<i>P. vulgaris</i>	Halos de inhibición (Mínimo efecto mm)	6 mm	10 mm	10 mm	14 mm
	Halos de inhibición (Máximo efecto mm)	6 mm	14 mm	16 mm	18 mm
	Media	6,000	11,90	13,30	16,10
	Desviación estándar	0,000	1,277	1,244	1,105
<i>P. mirabilis</i>	Halos de inhibición (Mínimo efecto mm)	6 mm	6 mm	6 mm	8 mm
	Halos de inhibición (Máximo efecto mm)	6 mm	6 mm	8 mm	10 mm
	Media	6,000	6,000	7,375	9,425
	Desviación estándar	0,000	0,000	0,867	0,812
<i>P. rettgeri</i>	Halos de inhibición (Mínimo efecto mm)	6 mm	6 mm	6 mm	8 mm
	Halos de inhibición (Máximo efecto mm)	6 mm	6 mm	8 mm	10 mm
	Media	6,000	6,000	7,000	8,850
	Desviación estándar	0,000	0,000	0,960	0,948
<i>P. morganii</i>	Halos de inhibición (Mínimo efecto mm)	6 mm	6 mm	6 mm	8 mm
	Halos de inhibición (Máximo efecto mm)	6 mm	6 mm	8 mm	10 mm
	Media	6,000	6,000	6,900	8,950
	Desviación estándar	0,000	0,000	0,955	0,932

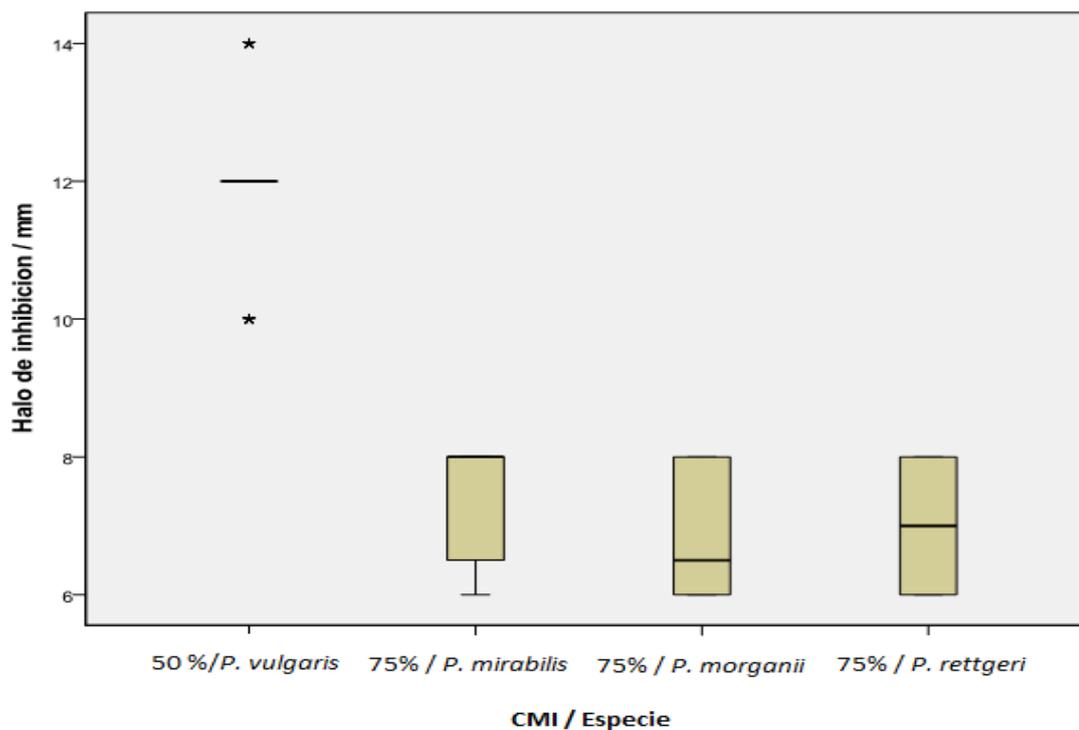


Figura 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* y halos de inhibición sobre *P.mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii*.

El cuadro 6 y figura 4 reporta que a la concentración de 25 mg/ml del aceite esencial de *Minthostachys mollis* no muestra ningún efecto inhibitorio sobre las 4 especies ya que no se observa halo de inhibición alguno; a la concentración del 50 mg/ml ya se muestra un halo de inhibición con un promedio de 11.90 mm en *P. vulgaris*, mientras que en las demás especies aun no muestra reacción alguna, a la concentración de 75 mg/ml se observa un halo de inhibición de 7.37 mm en *P. mirabilis*, 7,00 mm en *P. rettgeri* y 6.90 mm en *P. morganii*.

De los resultados observados se evidencia que la respuesta es distinta frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de muña, lo que indica que a mayor concentración de aceite mayor será el efecto inhibitorio, esto se expresa en el aumento proporcional del diámetro de halo de inhibición. A la concentración del 25 mg/ml *P. vulgaris* mostro resistencia ya que no hubo formación de halo inhibitorio, sin embargo a la concentración de 50 mg/ml es donde se inicia la inhibición de la bacteria, siendo esta la Concentración mínima inhibitoria con un promedio de halo de inhibición de 11.90 mm, lo cual nos permite usarlo como un importante medicamento natural frente a los antibióticos que son utilizados por parte de la medicina tradicional.

De los resultados obtenidos se observa que al incrementar la concentración del aceite esencial de *Minthostachys mollis* el efecto inhibitorio también aumenta proporcionalmente, esto se expresa en el tamaño de halo de inhibición, por lo tanto *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morgani* a la concentración de 25 mg/ml y 50 mg/ml denota resistencia a la actividad de *Minthostachys mollis*; sin embargo a las concentraciones de 75 mg/ml y 100 mg/ml se evidencia la inhibición de esta especie bacteriana que denota ser menos sensible que *P. vulgaris*, ya que al 75% se empieza a inhibir la bacteria formándose el halo promedio de 7.37 mm, 7.00 mm y 6.90 mm respectivamente. Cuando se observa el efecto en la concentración de 100 mg/ml el halo de inhibición aumenta con un promedio de 9.42 mm, 8.85 mm y 8.95 mm. Con ello podemos señalar que *Minthostachys mollis* posee un efecto inhibitoria a partir de la concentración del 75 mg/ml, esto nos permite tenerlo como alternativa de tratamiento como medicina natural.

Cuadro 7. Prueba Tukey para el efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* a 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morgani*.

HSD de Tukey^a

Especie/concentración aceite esencial mg/ml	N°	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
<i>P. vulgaris</i> 25	40	6,00					
<i>P. mirabilis</i> 25	40	6,00					
<i>P. mirabilis</i> 50	40	6,00					
<i>P. morgani</i> 25	40	6,00					
<i>P. morgani</i> 50	40	6,00					
<i>P. rettgeri</i> 25	40	6,00					
<i>P. rettgeri</i> 50	40	6,00					
<i>P. morgani</i> 75	40		6,90				
<i>P. rettgeri</i> 75	40		7,00				
<i>P. mirabilis</i> 75	40		7,38				
<i>P. rettgeri</i> 100	40			8,85			
<i>P. morgani</i> 100	40			8,95			
<i>P. mirabilis</i> 100	40			9,43			
<i>P. vulgaris</i> 50	40				11,90		
<i>P. vulgaris</i> 75	40					13,30	
<i>P. vulgaris</i> 100	40						16,10
Sig.		1,000	,290	,066	1,000	1,000	1,000

En el cuadro 7, según la prueba de Tukey, la mayor concentración que fue de 100 mg/ml ejerció mayor efecto con un halo de inhibición promedio de 16.10 mm para *P. vulgaris*, luego se muestra un segundo grupo que a una concentración de 75 mg/ml tiene un halo de inhibición promedio de 13,30 mm, el tercer grupo a una concentración de 50 mg/ml con un halo de inhibición promedio de 11,90 mm para *P. vulgaris*, en un cuarto grupo las especies *P. rettgeri*, *P. morgani* y *P. mirabilis* con 100 mg/ml tienen halos de: 8.85 mm, 9.95 mm y 9.43 mm respectivamente. En un quinto grupo de 75 mg/ml *P. morgani*,

P. rettgeri y *P. mirabilis* tienen halos de 6.90 mm, 7.00 mm y 7.38 mm respectivamente. Y finalmente un último grupo de 25 mg/ml y 50 mg/ml en las cuatro especies desarrollaron un halo de 6.00 mm.

El efecto inhibitorio del aceite esencial de muña se le atribuye a componentes químicos presentes en la muña como el carvacrol (derivado fenólico), que por los estudios realizados por Menéndez y Pavón (1999), indican que otras plantas medicinales pertenecientes a la familia Lamiaceae al igual que *Minthostachys mollis* poseen entre sus componentes más importantes al carvacrol al que por muchos estudios se le atribuye acción antibacteriana; de la misma forma la revista de la Asociación Argentina de Fitomedicina (2002), refiere que esta molécula se adhiere a los grupos amino de la membrana celular provocando el posterior colapso de la célula bacteriana por falta de permeabilidad, así mismo Primo *et al.*, (2002) afirmaron que la pulegona, cetona terpénica no saturada, es letal para las bacterias, pero se desconoce aún su sitio blanco sobre ellas.

Además, Luqman *et al.*, (2007), reportan que la inactivación microbiana de los aceites esenciales es causada por daño en pared celular de microorganismos, desordenes en la membrana citoplasmática, agotamiento de las fuerzas motrices de los protones, coagulación de los contenidos celulares o alteración en el flujo de electrones, en el flujo del contenido celular y en el transporte activo.

Contrariamente estos resultados no muestran homogeneidad con los reportados por Salmón (1994), quien contribuyó al estudio de la especie vegetal *Minthostachys mollis* "muña" en aspectos fitoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico, no obteniendo halos de inhibición a ninguna concentración (50 % y 100 %) en ninguna cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 ni *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, no logrando determinar fehacientemente su actividad antimicrobiana. La diferencia radica fundamentalmente en las especies de bacterias utilizadas en las que podrían haberse presentado mutaciones o adquisición de factores de virulencia por recombinación genética, mientras que ellos utilizaron a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que también son causa de infecciones urinarias, esta planta según la investigación realizada a las mismas concentraciones si mostró un efecto inhibitorio frente a *Proteus vulgaris*, lo

cual contribuye a la aplicación de una terapia natural en la infecciones del tracto urinario causadas por esta especie bacteriana.

Los resultados obtenidos para *P. mirabilis* son diferentes a los reportados por Primo *et al.*, (2002) quienes investigaron la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* en esta misma especie bacteriana *P. mirabilis*, demostrando una Concentración mínima inhibitoria del 5 % del aceite esencial; en contraste con esta investigación la CMI se evidencio a partir de 75 %. Tal diferencia podría explicarse en el hecho que esta especie bacteriana haya adquirido a través del tiempo nuevas características genéticas que se traducirán en la necesidad de mayor concentración del aceite esencial de *Minthostachys mollis*.

Martínez *et al.*, (2003), usaron el aceite esencial de la mandarina (*Citrus reticulata*) para determinar la actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a *Proteus mirabilis*, usó el método de difusión en agar utilizando concentraciones de 1 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana contra *Proteus mirabilis* al 50 %. En comparación al estudio realizado la diferencia radica en la planta utilizada para la extracción del aceite esencial el cual es proveniente de la mandarina (*Citrus reticulata*) y el aceite utilizado en el estudio es a partir de la “muña” *Minthostachys mollis*.

Se han realizado diversos estudios sobre el efecto inhibitorio de aceites esenciales de distintas especies sobre *P. vulgaris* y *P. mirabilis* mas por el contrario no así para *P. rettgeri* y *P. morgani* no se han reportado estudios específicamente sobre estas especies bacterianas, debido a que no son muy recurrentes. Sin embargo la respuesta frente al aceite esencial de la “muña” *Minthostachys mollis* es similar a la de *P. mirabilis*.

4.3 Comparación del efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* sobre las especies de género *Proteus* causantes de infecciones del tracto urinario respecto de la Vancomicina.

Cuadro 8. Diferencias del efecto inhibitorio entre el aceite de “muña” *Minthostachys mollis* con respecto a la Vancomicina sobre las especies del género *Proteus*

CMI del aceite esencial de “muña” (mg/ml)	Especie	Mm	Control (30 µg)	mm	Efecto inhibitorio (%)
50	<i>P. vulgaris</i>	11,90	Vancomicina	20,00	59.5
75	<i>P. mirabilis</i>	7,37	Vancomicina	18,00	40.9
75	<i>P. morgani</i>	7,00	Vancomicina	18,00	38.8
75	<i>P. rettgeri</i>	6,90	Vancomicina	18,00	38.3

En el cuadro 8 se observa que el aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* a la concentración de 50 mg/ml sobre *P. vulgaris* tuvo una inhibición del 59.5 % frente a la Vancomicina; sin embargo *P. mirabilis*, *P. morgani* y *P. rettgeri* a la concentración de 75 mg/ml del aceite esencial tuvieron una inhibición del 40.9 %, 38.8 % y 38.3 % respectivamente; mientras que la Vancomicina presentó una inhibición del 100 % con 30 µg, con esto se demuestra que la Vancomicina es un antibiótico al cual la “muña” *Minthostachys mollis* muestra alta sensibilidad.

Cuadro 9. Comparaciones para el efecto inhibitorio del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* sobre *P.mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morgani* respecto de la Vancomicina.

Especie/Control	Concentración del aceite esencial de “muña” (mg/ml)	Diferencia de medias	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
				Límite inferior	Límite superior
<i>P. vulgaris</i> /Vancomicina	50	8,100*	,000	7,55	8,65
<i>P. mirabilis</i> /Vancomicina	75	10,625*	,000	10,08	11,17
<i>P. morgani</i> /Vancomicina	75	11,128*	,000	10,58	11,68
<i>P. rettgeri</i> /Vancomicina	75	11,000*	,000	10,45	11,55

Los resultados obtenidos muestran similitud con los reportados por Guevara (2014), quien en su investigación determinó que la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Grindelia boliviana* Rusby sobre *Staphylococcus aureus* alcanzó el 41.03 % de inhibición con 75 ul/l la cual fue la mayor concentración utilizada frente a la Vancomicina, esto coincide con esta investigación en el caso de *P. mirabilis* ya que en esta especie el aceite esencial de “muña” a la concentración del 75 % obtuvo una inhibición de 40.9 %, sin embargo en *P. vulgaris*, *P. rettgeri* y *P. morganii* no muestra homogeneidad pues las concentraciones del aceite esencial y los porcentajes de inhibición difieren de los obtenidos por el autor mencionado.

Contrariamente estos resultados no muestran homogeneidad con los reportados por Gamarra en el 2011 quien reportó la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de “muña” *Minthostachys mollis* haciendo comparación con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*; concluyó que el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* al 100 % tiene mayor efecto contra *Candida albicans* que el fluconazol; además, el efecto antimicótico del fluconazol es mayor que *Minthostachys mollis* al 25 % y el mismo que *Minthostachys mollis* al 50 %, el alto efecto que posee el aceite esencial de “muña” en comparación con el fluconazol podría deberse al método de extracción del aceite siendo el de arrastre a vapor.

El efecto bactericida de la Vancomicina se ejerce inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, tal como lo indica Kuklinski (2008) quien refiere que posee una gran afinidad a los precursores de esta estructura y su modo de acción se basa en alterar la acción de la transpeptidasa por impedimento estérico, sin embargo la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se le atribuye a que al exponer las células a concentraciones letales de agentes antimicrobianos naturales (carvacrol y timol) hay cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados tal como lo refiere Burt *et al.*, (2007).

CONCLUSIONES

Se identificó por pruebas de confirmación bioquímica las cuatro especies del género *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. morganii*.

Existe diferencia estadísticamente significativa al comparar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* sobre *P. vulgaris* frente a las tres especies de *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morganii* cuya significancia es inferior a 0,05. Mientras que entre las especies de *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. morganii* la diferencia no es estadísticamente significativa pues es superior a 0,05.

El aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* a la concentración del 50 % (50 mg/ml) con respecto a la Vancomicina sobre *P. vulgaris* tuvo un efecto inhibitorio de 59.5 %; sobre *P. mirabilis*, *P. morganii* y *P. rettgeri* a la concentración de 75 % (75 mg/ml), tuvo un efecto inhibitorio de: 40.9 %, 38.8 % y 38.3 % respectivamente.

RECOMENDACIONES

Realizar más estudios en las otras especies del género *Proteus*; *P. rettgeri* y *P. morganii* en vista que la información sobre estas bacterias es escasa e insuficiente.

Aplicar el aceite en especímenes de experimentación para confirmar las respuestas de su efectividad a las concentraciones encontradas.

Realizar comparaciones con otro tipo de aceites esenciales que puedan producir los efectos inhibitorios en bacterias del género *Proteus* utilizando la Vancomicina como antibiótico de control.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agapito, T. Fito Medicina 1100 Plantas Medicinales. Lima: Editorial Isabel IRL; 2003.
- Alaba W. Efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) sobre colonias de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Rev. SIMIYKITA. Vol. 1. N°1. 2014.
- Alonso, J. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Buenos Aires: Fitociencia; 2006.
- Alzamora, L.; Morales, L.; Armas, L.; Fernandez, G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina UNMSM. 2001.
- ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOMEDICINA (AAF). Farmacognosia. Aceites esenciales. 2002.
- Azaña, I. Efectividad Antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Odontología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
- Badui, S. Diccionario de tecnología de los alimentos. México D. F.: Editorial Addison; 1998.
- Bailón, L.; Gonzales, R.; Cervantes, A. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. México. 2003.
- Bailey & Scott. Diagnostico microbiológico. 12th Edición. España. Editorial Médica Panamericana: 2007.
- Bardales, A. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de “muña” *Minthostachys mollis* . En: I Congreso Internacional de Biología-XIII Congreso Nacional de Biología-VII Simposio de Educación en Ciencias Biológicas. Lima: Resúmenes de Trabajos de Investigación del I Congreso Internacional de Biología-XIII Congreso Nacional de Biología-VII Simposio de Educación en Ciencias Biológicas; 1999.
- Bermúdez, E. Pruebas bioquímicas para enterobacterias. Argentina: Editorial Acribia; 2000.
- Brock, G.; Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. Biología de los microorganismos. Décima Edición. México D. F.: Editorial Manual Moderno; 1999.
- Burt, S; Vander, R; Koets, A. Carvacrol induces heat shock proteins 60 and inhibits synthesis of flagelium in *Escherichia coli*. 2007.

- Caceda, F. Flora Medicinal Nativa y Cosmovisión Campesina en Comunidades de Puno. Editorial Universitaria. Puno. 1999.
- Cano, D. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de “muña” *Minthostachys mollis*. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Química farmacéutica]. Junín: Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales; 2008.
- Carhuapoma, G.; López, S.; Roque, M.; Velapatiño, B.; Bell, C.; Whu, D. Actividad antibacteriana del aceite esencial de “ruyaq muña” *Minthostachys mollis*. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Odontología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
- Carbajal, O. Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de la muña (*Satureja boliviana*) y de la pata muña (*Hedeoma mandoniana*) sobre *Escherichia coli* enteropatógena. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Biología]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2005.
- Contreras, G. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* frente a bacterias enteropatógenas. [Tesis para optar el grado de Ingeniero Agrícola]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2008.
- Coker, C. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect.* 2000.
- Cruzado, J, Concentración inhibitoria mínima *in vitro* del *Minthostachys mollis* frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis para optar el grado de Bachiller en Estomatología]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2012.
- Cuervo, R. Manual de protocolos de microbiología general. Cali: Editorial Buenavetulina; 2010.
- Dezell, JE. & Lefevre, ML. Urinary tract infections during pregnancy. *Am Fam Physician.* 2008.
- Díaz, K. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de “muña” *Minthostachys mollis* frente a bacterias orales de importancia estomatológica. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Odontología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005.
- DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD PUNO (DIRESA). Plan Regional Concertado de Salud. 2011.
- Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity end economic costs *Dis mon.* 2003.
- Freire, A. Botánica sistemática Ecuatoriana. Ecuador. Editorial Missouri Garden; 2004.

- Fuertes, C. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb "Muña" de 3 regiones peruanas por GC-MS. Ciencia e Investigación. 2000.
- Gamarra, A. Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de "muña" *Minthostachys mollis* con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Química farmacéutica]. Lima: Universidad Nacional Federico Villareal; 2011.
- Gibaja, S. Investigaciones químicas de la "muña" *Minthostachys mollis*. [Tesis de bachiller para el título de Químico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1999.
- Gros E. Introducción al estudio de los productos naturales, Washington D .C: Editora Eva V. Chesneau; 1990.
- Guentzel, M. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* and *Proteus*. In: Barron's Medical Microbiology (Barron S et al, eds.). 4th edition. Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf). 1996.
- Guevara, J. Actividad antibacteriana "in vitro" del aceite del "chiri chiri" *Grindelia boliviana* Rusby frente a *Staphylococcus aureus* ATCC. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Biología]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2014.
- Hernandez, W. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (blee). Revista cubana de medicina intensiva. 2006; vol 5.
- Jove, I. Actividad inhibitoria in vitro del extracto del Pseudotallo de *Musa paradisiaca* L. (plátano) sobre *Micobacterium tuberculosis*. Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. 1994.
- Kakrani, K. Antibacterial and antifungal activity of volatile oil from the seeds of *Aglaia odoratissima*. Fitoterapia. 1990.
- Koneman, E. Diagnóstico Microbiológico. 6ta Edición. Buenos Aires Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- Kuklinski, C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Ediciones Omega S.A.; 2008.
- Laciar, A.; Vaca, M.; Carrizo, R.; Saad, J. Actividad antibacteriana y antioxidante del aceite esencial extraído del "ajenjo" *Artemisia echegarayi*. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Biología]. Argentina: Universidad Nacional de San Luis Chacabuco y Pedernera; 2009.

- Look de Ugaz, O. Investigación Fotoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2da Edición. Lima Perú: Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
- Luqman, S; Dewivedi, G; Darokar, M; Kaira, A. Potential of rosemary oil to be used in drug resistant infections. *Alternative therapies*. 2007.
- Malpartida, F. Efecto inhibitor del aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis* en comparación al paramonoclorofenol Alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2 % frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio *in vitro*. [Tesis para optar el grado de Licenciado en Odontología]. Lima: Universidad Alas Peruanas; 2010.
- Martinez, J.; Sulbarán, B.; Ojeda, G.; Ferrer, A. Actividad antibacteriana del aceite esencial de “mandarina” *Citrus reticulata* - Venezuela. 2003.
- Matthew, E.; Bassey, E.; Clement, A.; Giddings, A.; Edet, A.; Kingsley E. A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organisms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007; Vol 38.
- Menéndez, R.; Pavon, V. *Plecthranthus amboinicus*. *Revista cubana de plantas medicinales*. 1999; vol. 4.
- MINISTERIO DE SALUD (MINSA). Gentamicina en el tratamiento de Infección Urinaria en Gestantes. Informe de la Dirección Regional de Medicamentos, Insumos y Drogas. Lima.. Informe técnico N° 04. 2011.
- Moromi, H. Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. Lima: Editorial Acribia; 2002.
- Murray, P. y Rosenthal, K. Microbiología Médica. 7ma Edición. Barcelona España: Editorial Edide; 2002.
- Nascimento, GGF.; Locatelli, J.; Freitas, P.; Silva, G. Actividad antimicrobiana *in vitro* de algunos aceites esenciales obtenidos por extracción etanólica de plantas y fitoquímicos contra microorganismos antibióticos susceptibles y antibióticos resistentes. *Revista de microbiología* 2000; Vol 2. p. 247-256.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. 2000. Wayne, Pa.
- Patton, J.; Nash, D.; Clement D. Urinary tract infection: economic considerations. *Med Clin NAm*. 2005.

- Primo, V.; Rovera, M.; Zanón, S.; Oliva, M.; Demo.; M; Daghero. J. Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. Universidad Nacional de Rio Cuarto, Córdoba - Argentina. 2002.
- Pumarola, A. Microbiología y Parasitología Médica. 2a Ed. Barcelona: Salvat; 2000.
- Rivarola, M. La muña: menta de los Andes. Editorial Generación; 2008.
- Rodríguez, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de enterobacterias. Revista de salud pública de México. 2002; vol. 44.
- Rojas, R.; Bustamante, B.; Bauer, J.; Fernández, L.; Albán, J.; Lock, O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2006.
- Salmón, L. Contribución al estudio de la especie vegetal *Minthostachys mollis* "muña" en los aspectos fitoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico. Lima; Editorial Aguilar; 1994.
- Sánchez, J.; Guillan, C.; Miler, H. Sensibilidad microbiana de *E. coli* en infecciones urinarias extrahospitalarias. Actas Urológicas Españolas v.27 n.10. 2003.
- Sánchez, F. II Segundo Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Extracción de aceites esenciales. 2008.
- Sisa, J. Recolección de plantas medicinales silvestres y de cultivo. Medicina natural al alcance de todos. Editorial Ecoaldea; 2004.
- Sotta, N. Plantas aromáticas y medicinales de la región Arequipa. Arequipa: Editorial Akuarella; 2000.
- Tadeo, J. Métodos de separación por destilación. Bogotá Colombia. 2004.
- Terragno, R. Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Shigella* sp. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Colombia.2007.
- Thompson, W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Barcelona: Editorial Blume; 1981.
- Velásquez L. 2007. Actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisiodes*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifolium* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. [Tesis para optar el título de Licenciatura en Bioquímica. Carrera de Bioquímica. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas]. Universidad Mayor San Andrés. La Paz – Bolivia.

ANEXOS

Cuadro 10. Preparación de medio Mac Conkey

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	17.0	Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
Pluripeptona	3.0	
Lactosa	10.0	
Mezcla de sales biliares	1.5	
Cloruro de sodio	5.0	
Agar	13.5	
Rojo neutro	0.03	
Cristal violeta	0.001	
pH final: 7.1 0.2		

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo (Bailón *et al.*, 2003).

Cuadro 11. Preparación de medio TSI

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de carne	3.0	Suspender 62,5 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.
Pluripeptona	20.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Lactosa	10.0	
Sacarosa	10.0	
Glucosa	1.0	
Sulfato de hierro y amonio	0.2	
Tiosulfato de sodio	0.2	
Rojo de fenol	0.025	
Agar	13.0	
pH final: 7.3 0.2		

Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico (Bailón *et al.*, 2003).

Cuadro 12. Preparación de medio Citrato Simmons

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Citrato de sodio	2.0	Suspender 24,2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.
Cloruro de sodio	5.0	
Fosfato dipotásico	1.0	
Fosfato monoamónico	1.0	
Sulfato de magnesio	0.2	
Azul de bromotimol	0.08	
Agar	15.0	
pH final: 6.9 0.2		

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía (Bailón *et al.*, 2003).

Cuadro 13. Preparación de medio SIM

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Tripteína	20.0	Suspender 30 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver, calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir unos 4 ml en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121 C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical.
Peptona	6.1	
Sulfato de hierro y amonio	0.2	
Tiosulfato de sodio	0.2	
Agar	3.5	
pH final: 7.3 0.2		

Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.

(Bailón *et al.*, 2003).

Cuadro 14. Preparación de agar Mueller Hinton

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Infusión de carne	300.0	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 (o agregar los suplementos que se desee) hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).
Peptona ácida de caseína	17.5	
Almidón	1.5	
Agar	15.0	
pH final: 7.3 0.1		

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 (Bailón *et al.*, 2003).



Figura 7. *Minthostachys mollis* (Muña). Puno (Febrero 2016)



Figura 8. Secado de la muña en ambiente oscuro. Puno (Febrero 2016)



Figura 9. Pesado de la muña. Laboratorio Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Marzo 2016)



Figura 10. Macerado de la muña. Laboratorio Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Marzo 2016)



Figura 11. Aceite esencial de muña obtenido de las hojas. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Marzo 2016)



Figura 12. Aislamiento e identificación de cepas de *Proteus vulgaris*. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)



Figura 13. Identificación de cepas *Proteus mirabilis*. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)



Figura 14. Identificación de *Proteus rettgeri*. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)



Figura 15. Identificación de *Proteus morganii*. Laboratorio de Microbiología UNA-PUNO (Abril 2016)

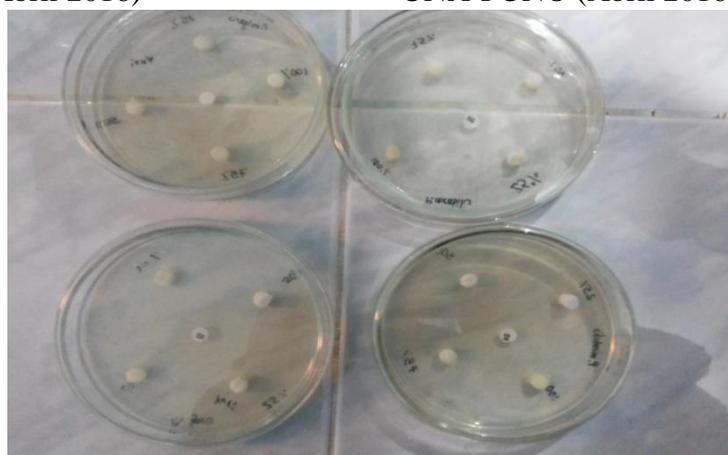


Figura 16. Antibiograma con discos de sensibilidad conteniendo el aceite de muña. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)

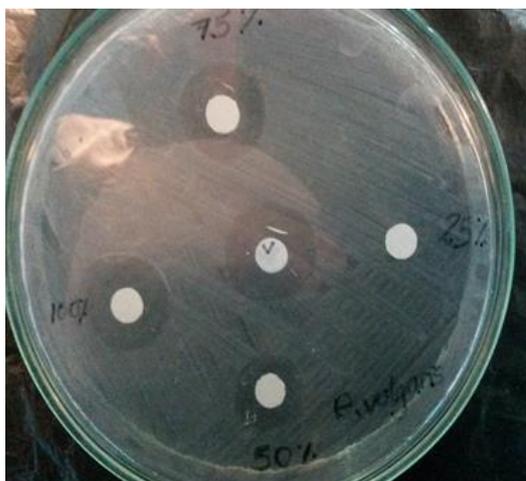


Figura 17. Efecto del aceite esencial de muña sobre *Proteus vulgaris*. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)



Figura 18. Efecto del aceite esencial de muña sobre *Proteus mirabilis*. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)



Figura 19. Efecto del aceite esencial de muña sobre *Proteus rettgeri*. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)



Figura 20. Efecto del aceite esencial de muña sobre *Proteus morganii*. Laboratorio de Microbiología FCCBB UNA-PUNO (Abril 2016)