

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

**EFEECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (MUÑA)
EN *Streptococcus mutans***

TESIS

Para optar el Título Profesional de CIRUJANO DENTISTA

AUTOR

Huari Guerrero, Grace Medalith

Lima – Perú

2014

JURADO DE SUSTENTACIÓN

- Presidente: Mg. Blga Hilda Moromi Nakata
- Miembro: CD. Luis Cisneros Zárate
- Miembro Asesor: Blga. Elba Estefanía Martínez Cadillo

Dedicatoria

A Dios por darme salud y así concluir los seis años de estudio de odontología.

A mis padres, en especial a mi madre porque sin su apoyo no hubiese logrado estudiar esta profesión y por brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

A mi familia que se encuentra en el extranjero siempre los tengo presente, gracias por el apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigación Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por financiar la ejecución de este proyecto de investigación.

A mi asesora Blga. Elba Martínez Cadillo, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por su asesoramiento, orientación y colaboración para que se lleve a cabo el presente trabajo de tesis.

Al Dr. Américo Castro Luna, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos, en la elaboración del aceite esencial de muña.

A la Mg. Hilda Moromi Nakata, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su asesoramiento y orientación desinteresada.

Al Mg. Teresa Evaristo, docente del Dpto. de Odontología Biosocial de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su colaboración y su apoyo en la elaboración de la parte metodológica y estadística del presente trabajo.

En especial a mi tía Sonia Huari por su valiosa contribución en la realización del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña).

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su disposición y paciencia durante la ejecución del proyecto.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

I.-INTRODUCCIÓN	1
II.- MARCO TEÓRICO	2
2.1.- ANTECEDENTES	2
2.2.- BASES TEÓRICAS	8
2.2.1.- <i>Streptococcus mutans</i>	8
2.2.2.-PLANTAS MEDICINALES	15
2.2.2.1.- PRINCIPIO ACTIVO DE LAS PLANTAS MEDICINALES	15
2.2.2.2.-DEFINICIÓN	15
2.2.2.3.-COMPOSICIÓN	15
2.2.2.4.-PROPIEDADES FÍSICAS	16
2.2.2.5.-COMPOSICIÓN QUÍMICA	17
2.2.2.6.-LOCALIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS	17
2.2.2.7.-FUNCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LA PLANTA	18
2.2.2.8.-INFLUENCIA DE LOS FACTORES EXTERNOS EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	18
2.2.2.9.-ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES	18
2.2.2.10.-MECANISMO DE ACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL SOBRE LOS MICROORGANISMOS	19
2.2.2.11.-EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	19
2.2.3.- <i>Minthostachys mollis</i> (MUÑA)	21
2.2.3.1.- <i>Minthostachys mollis</i>	21
2.2.3.1.1.- CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA	21
2.2.3.1.2.- CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL GÉNERO EN ESTUDIO	22
2.2.3.1.3.-TIPOS DE <i>Minthostachys</i>	23

2.2.3.1.4.-CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Minthostachys mollis</i> (HBK) GRISEB “MUÑA”	24
2.2.3.1.5.-COMPOSICIÓN QUÍMICA	24
2.2.3.1.6.- MOLÉCULAS PRESENTES EN <i>Minthostachys mollis</i>	25
2.2.3.1.7.-COMPOSICIÓN NUTRITIVA DE <i>Minthostachys mollis</i>	26
2.2.3.1.8.- USOS Y APLICACIONES DE LA ESPECIE <i>Minthostachys mollis</i>	28
2.2.4.- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA	28
2.2.4.1.- MÉTODO DE DILUCIÓN	29
2.2.4.2.- MÉTODO DE DIFUSIÓN	29
2.2.5. AMOXICILINA	32
2.3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
2.4.- JUSTIFICACIÓN	32
2.5.- OBJETIVOS	33
2.6.- HIPÓTESIS	33
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	34
3.1.- TIPO DE ESTUDIO	34
3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	34
3.3.- OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	35
3.4.- MATERIALES	37
3.5.- MÉTODOS	38
3.5.1.- OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Minthostachys mollis</i>	38
3.5.1.1.- RECOLECCIÓN DE <i>Minthostachys mollis</i> (MUÑA)	38
3.5.1.2.-IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	39
3.5.1.3.- OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA	39
3.5.1.4.- DILUCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA	39
3.5.2.- CEPA BACTERIANA	40
3.5.2.1.- REACTIVACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA	40

3.5.2.2.- PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD BACTERIANA	40
3.5.2.3.-EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO	41
3.5.3.- RECOLECCIÓN DE DATOS	42
3.5.4.-PROCESAMIENTO DE RESULTADOS	42
3.5.5.- ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
IV.- RESULTADOS	43
V.- DISCUSIÓN	55
VI.- CONCLUSIONES	59
VII.- RECOMENDACIONES	60
RESUMEN	61
ABSTRACT	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	68

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 01: Ensayo de solubilidad del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i>	43
CUADRO 02: Ensayo físico-químico del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i>	43
CUADRO 03: Análisis organoléptico del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i>	44
CUADRO 04: Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> en cepa de <i>Streptococcus mutans</i>	45
CUADRO 05: Halos de inhibición en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> después de aplicar aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> al 100 %	46
CUADRO 06: Halos de inhibición en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> después de aplicar aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> al 50 %	47
CUADRO 07: Halos de inhibición en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> después de aplicar aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> al 25 % y el control negativo (DMSO)	48
CUADRO 08: Halos de inhibición en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> después de aplicar control positivo (AMOXICILINA)	49
CUADRO 09: Efecto antibacteriano del aceite esencial al 100 %, 50 % y 25% de <i>Minthostachys mollis</i>	50
CUADRO 10: Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> 100 %, 50 % y al 25 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> según escala de Duraffourd	53

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1: Halos de inhibición en cepas de *Streptococcus mutans* después de aplicar aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % 46
- FIGURA 2: Halos de inhibición en cepas de *Streptococcus mutans* después de aplicar aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 50 % 47
- FIGURA 3: Halos de inhibición en cepas de *Streptococcus mutans* después de aplicar control positivo (amoxicilina) 49
- FIGURA 4: Efecto antibacteriano del aceite esencial al 100 %,50 % y 25 % de *Minthostachys mollis* 51
- FIGURA 5: Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* 100 %, 50 % y al 25 % en cepas de *Streptococcus mutans* según escala de Duraffourd 54

I.-INTRODUCCIÓN

La caries dental es una de las patologías orales más comunes en nuestra población, según MINSA¹ el 90% de la población padece esta patología. Entre los factores causales de esta enfermedad se encuentran huésped, dieta, el tiempo y los microorganismos. En cuanto al factor microbiológico se encuentran entre las principales: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Actinomyces naeslundii*.

El *Streptococcus mutans* se caracterizan por ser cocos gram positivos, anaerobio facultativo forman parte de la flora residente en la cavidad bucal y vías respiratorias altas; autores tales como Berkowitz, Kohler, col. y Van Houte han sugerido al *Streptococcus mutans* como el principal agente de la formación de caries dental.² Entre los factores de patogenicidad en el *Streptococcus mutans* destaca: poder acidogénico, acidófilo y acidúrico; síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insoluble y solubles, fructanos; síntesis de polisacáridos intracelulares; capacidad adhesiva por la proteínas salivales; producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos.

Ante esta problemática existen numerosos tratamientos para impedir que la caries dental siga dañando estructuras dentarias, que van desde aplicaciones de sustancias tópicas como flúor en forma preventiva, restauraciones, entre otros.

Actualmente se emplean plantas medicinales para combatir ciertas enfermedades, como es el uso de la “muña” *Minthostachys mollis*, planta oriunda de la sierra del Perú, su uso ampliamente difundido en diversas regiones del país, se debe por poseer propiedades curativas, las cuales atribuyen a sus componentes, entre los cuales destaca el aceite esencial, el cual actúa dependiendo del tipo de microorganismo y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos,³ además que interferirían en la fase de metabolismo intermedio de los microorganismos inactivan enzimas de reacción.⁴

En el trabajo realizado se utilizó el aceite esencial de *Minthostachys mollis* en cepas de *Streptococcus mutans* y se evaluó su efecto antibacteriano comparado con el control positivo (amoxicilina).

II.- MARCO TEÓRICO

2.1.- ANTECEDENTES

CONTRERAS G. (1983) estudió la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, demostrando cualitativamente su efecto antimicrobiano frente a *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, resultando *Shigella dysenteriae* la más sensible al aceite esencial de Muña.⁵

SALMÓN L. (1994) estudió los aspectos fitoquímicos, toxicológicos, antimicrobianos y bromatológicos de *Minthostachys mollis*. No obtuvo halos de inhibición a ninguna concentración y en ninguna cepa. (*Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) por lo que no pudo determinar fehacientemente su actividad antimicrobiana.⁶

RASHEED A, HAIDER M. (1998) observaron que extractos del té verde inhibían mejor a *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus salivarius* que extractos del té negro comparando estos resultados con amoxicilina, cefradina y eugenol.⁷

INGA A. Y GUERRA B. (2000), demostraron mediante un estudio las propiedades bactericidas/bacteriostáticas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. cereus* MC, *Salmonella typhi*, *S. sonnei* MC, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031, además de la acción fungistático/fungicida para *Fusarium moniliforme* y *Aspergillus niger*.⁸

FUERTES Y MUNGUÍA (2001) realizaron un estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas: Tarma, Huaraz y Huancavelica (utilizaron ensayos físicos, espectro ultravioleta, espectro infrarrojo y composición química), concluyeron que el aceite esencial proveniente de Tarma contenía en su composición 1-Tetradeceno, 2s-Transmentona, pulegona como componentes principales y un porcentaje importante de timol, demostrando

así que el aceite extraído de ese lugar tiene mejores condiciones que el aceite de los otros dos lugares.⁹

PRIMO Y COL (2001) estudiaron a *Minthostachys verticillata* “Peperina”, observaron buena actividad contra *Staphylococcus aureus*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *P. mirabilis* y antiviral contra el virus Herpes Simplex tipo 1 y el virus de la Pseudorrabia, aunque con escasa actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁰

BRAVO Y COL (2004) realizaron una investigación para estudiar la presencia de flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Concluyendo que el *Minthostachys mollis* sí contiene flavonoides y que presenta actividad antibacteriana como consecuencia de la presencia de aquellos.¹¹

PALACIOS Y COL (2004) evaluaron la capacidad bactericida *in vitro* de preparados a base de *Minthostachys mollis* y agua destilada a varias concentraciones (2, 4, 6 y 8 gr), frente a *Streptococcus* orales. Encontraron muy poca efectividad antibacteriana.¹²

DÍAZ K. Y COL. (2005), obtuvo el aceite esencial de muña mediante la técnica arrastre de vapor de agua y fue sometida a cromatografía de gases y se determinó sus principales componentes pulegona y transmenton. Concluyó que el aceite esencial de muña presenta actividad antibacteriana en *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Actinomyces sp.* frente a Amoxicilina como control positivo y agua destilada como control negativo. En las pruebas de susceptibilidad concluyó que la bacteria más sensible al aceite esencial de muña era *Fusobacterium nucleatum* seguido de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.* y *Actinomyces sp.* con una media de halos de inhibición 20.13 mm, 18.42 mm, 16.50 mm, 14.38 mm, 11 mm respectivamente. La propiedad antimicrobiana se debería a las sustancias terpenoides presentes en el aceite esencial del *Minthostachys mollis*.¹³

CANO Y COL (2007) realizaron un estudio para demostrar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, proveniente del distrito de Huacrapuquio, provincia de Tarma. Se observó un alto efecto antimicótico frente a las cepas de *Cándida albicans* a las concentraciones de 50 y 100 % y dermatofitos *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagophys*, *Microporun canis* sensibles en los volúmenes de 5 y 50 mililitros; encontró en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: pulegona, mentona y limoneno.³

GUIZA Y RINCÓN (2007) evaluaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” en combinación con inactivación térmica sobre cepas de *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*. No encontró efecto antibacteriano sobre dichas cepas, atribuyendo esto último a la ausencia de ciertos componentes en la estructura química del aceite.¹⁴

CARHUAPOMA Y COL (2009) determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite esencial se obtuvo por destilación con arrastre de vapor de agua. La actividad antibacteriana se determinó por el método de excavación placa cultivo; resultando en orden de sensibilidad, *Shigella dysenteriae* es la que presenta más sensibilidad al aceite esencial con un promedio de 21,41 mm, seguido de *Helicobacter pylori* con 17,07 mm, *Salmonella typhi* con 14,25 mm y la que menos sensibilidad presentó fue *Pseudomonas aeruginosa* con 11,45 mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para *H. pylori* se determinó por el método de dilución en microplacas, resultando 2 µg/mL. Para las demás bacterias se determinó por el método de dilución, siendo para *S. dysenteriae* 4 µg/mL, *S. typhi* 4 µg/mL, y *P. aeruginosa* 9 µg/mL de CMI y 10 µg/mL de CMB. Observándose que a mayor concentración es mayor el efecto inhibitorio; es así que la concentración 450 µg/mL produjo en promedio 22,48 mm de halo de inhibición, mientras que para una concentración de 4,5 µg/mL fue de 11,99 mm en la prueba de Duncan. Los

porcentajes de inhibición comparados con ciprofloxacino, fueron: *H. pylori* 177,27; *S. dysenteriae* 126,11; *S. typhi* 63,44 y *P. aeruginosa* 42,29 lo que estaría demostrando que el aceite tiene mayor actividad que el ciprofloxacino; esto posiblemente se deba a que los constituyentes del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, como el timol, acetato de timol, metileugenol, pulegona, mentona, limoneno, linalol, entre otros, actúan en sinergismo; y comparado con cloranfenicol: *P. aeruginosa* de 225,56; *S. dysenteriae* 171,97; *S. typhi* 135,95 y *H. pylori* 92,86 a una concentración de 450 µg/mL del aceite esencial.¹⁵

MORA Y COL (2009) examinaron y analizaron los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb var Vaughth. Recogidos en enero del 2008 en la localidad de Tuñame, estado de Trujillo, Venezuela, fueron separados e identificados por el análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas. El aceite esencial se obtiene por hidrodestilación y trece componentes (98.5 % de la muestra) fueron identificados por comparación. Los dos componentes principales son pulegona (55.2 %) y trans-mentona (31.5 %). El aceite esencial mostró efecto inhibitorio significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella tify* (4 ug/ml).¹⁶

PAREDES N. Y Col (2009), determinó la efectividad antibacteriana salival mixta de las infusiones a base de té verde, y té verde y muña, no encontró efectividad en la infusión a base de muña, y que existían diferencias significativas entre las medias de las muestras. Así mismo, la infusión a base de té verde resultó ser similar en cuanto a su efectividad antibacteriana con respecto a la Clorhexidina. De los resultados obtenidos se concluye que se ha evidenciado la efectividad antibacteriana de una infusión a base de té verde y muña sobre la flora salival mixta, sin embargo, se observó una efectividad antibacteriana menor con respecto a la infusión a base de té verde y la Clorhexidina. Debido a los resultados del presente estudio que demuestran la efectividad del té verde similar a la Clorhexidina.¹⁷

AZAÑA I. Y COL (2010) El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” 100 % presentó una efectividad antibacteriana, tanto cuantitativamente como cualitativamente mayor, en comparación a las diluciones del 50 % y 25 % frente a las cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular.¹⁸

CASTILLO D. Y COL (2010) Demostró la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “muña” al 50 % y al 100 % comparado con Clorhexidina al 0.2 % frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 255586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. La muestra estuvo conformada por 18 placas petri para la cepa de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 255586 y 19 placas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, las cepas se cultivaron en agar Columbia que contenía 5 % de sangre de carnero desfibrinada, con hemina (0.5 %) y vitamina K (0.1 %) y fueron incubados por 48 horas a 37 °C. Las pruebas antibacterianas se realizaron utilizando disco de difusión embebidos del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “Muña” al 50 y 100 % y Clorhexidina al 0.2 %. Se encontró la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “Muña” al 50 y 100 % en ambos patógenos siendo estadísticamente significativo en la concentración 100 % en comparación del aceite al 100 % con el aceite al 50 % (p menor que 0.001), al comparar el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “Muña” al 100 % con la Clorhexidina 0.2 % no se encontró diferencia significativa (p mayor que 0.001) en ambas cepas bacterianas, por lo que la planta en estudio presenta actividad antibacteriana comparable al grupo control, concluyó que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “Muña” al 50 y 100 % presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 255586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.¹⁹

ALCALÁ Y COL (2011) demostró el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación con el Fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. El efecto antimicótico se estudió midiendo 80 halos de inhibición distribuidos en 5 grupos mediante el método Kirby-Bauer. Se utilizó una cepa clínica de *Candida albicans*. Los grupos de estudio fueron grupo muña 25 % (GM25 %), grupo muña 50 % (GM50 %), grupo muña 100 % (GM100 %), un grupo control positivo (Fluconazol), y un grupo control negativo (aceite mineral). El análisis estadístico se realizó mediante la Prueba de Kruskal-Wallis y el Test de Dunn usando el paquete SPSS v.17.0. Se consideró un nivel de significancia $< 0,05$. Se obtuvo La mediana de los halos de inhibición del GM25 % fue de 32,00 mm (31,00 a 33,75); del GM50 %: 40,00 mm (39,25 a 41,00); del GM100 %: 46,80 mm (46,00 a 48,00), y del grupo Fluconazol: 39,00 mm (38,00 a 40,75). No se obtuvo halos de inhibición en el grupo control negativo. Se encontró diferencia significativa entre GM25 %, GM100 % y el grupo Fluconazol ($p < 0,001$), más no entre este último y GM50 % ($p > 0,05$). Se concluyó que el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (al 100 %) tuvo mayor efecto contra la *Candida albicans* que el Fluconazol; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25 %, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50 %.²⁰

GONZÁLEZ Y COL (2013) demostró la actividad antibacteriana de *Minthostachys mollis* frente a bacterias enteropatógenas; sin embargo, frente a microorganismos de interés estomatológico, son muy escasos. Por esto, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), y la concentración mínima bactericida (CMB), para establecer el efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*. El análisis estadístico usado fue la prueba ANOVA y la de KRUSKALL-WALLIS. Concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, siendo la CMI de 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la CMB, de 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a 0.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$.²¹

2.2.- BASES TEÓRICAS

2.2.1.- *Streptococcus mutans*

Son cocos Gram positivos, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos, los cuales miden de 0.5 a 0.8 μm de diámetro, anaerobios facultativos, forman parte de la flora microbiana residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas, son patógenos oportunistas en enfermedades humanas como la caries dental y la endocarditis infecciosa, entre otras.

Entre los factores de patogenicidad presentes en *Streptococcus mutans* destacan:

- a) Poder acidogénico, acidófilo y acidúrico
- b) Síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles, fructanos.
- c) Síntesis de polisacáridos intracelulares.
- d) Capacidad adhesiva por las proteínas salivales, que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, capacidad agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos.
- e) Producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos. La habilidad del *Streptococcus mutans* de sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa de la dieta a través de la glucosiltransferasa, facilita la formación de la biopelícula dental.

Se ha demostrado que el *Streptococcus mutans* está implicado en el inicio de la lesión de caries, en los últimos años se han realizado una serie de estudios, entre los que se destaca el estudio de Fitzgerald y Keyes en 1960, quienes demostraron el papel de *Streptococcus mutans* como agente microbiano cariogénico en caries experimental en humanos, en las muestras de placa dental in situ sobre lesiones de caries iniciales de mancha blanca. Además, Van Houte en 1994, señaló que *Streptococcus mutans* constituye una alta proporción de la flora cultivable antes y durante el inicio de la lesión de caries.

Por otra parte, Becker y col en 2002, a través de técnicas moleculares de identificación bacteriana, señalaron la presencia de *Streptococcus mutans* en todas las lesiones de caries profundas examinadas, indicando una fuerte asociación de esta especie con lesiones avanzadas de caries. Este hallazgo contrasta con estudios anteriores donde se emplearon medios de cultivo, como los realizados por Loeschies y col en 1973, por Hoshino y col en 1984, quienes reportaron que el *Streptococcus mutans* solo constituye una pequeña parte de la flora cultivable en áreas profundas de dentina cariada. También, se reportaron la presencia en lesiones de caries profunda pero en menos cantidades de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis* y *Streptococcus constellatus*, las cuales se encuentran asociadas con lesiones de placa profunda.

Autores como, Berkowitz, Kohler, col y Van Houte han sugerido al *Streptococcus mutans* como el principal agente causante de la formación de caries dental.²

La patogenicidad del *Streptococcus mutans* está asociada a varios factores como:

1. Acidogenicidad
2. Aciduridad
3. Acidofilicidad
4. Síntesis de glucanos y fructanos
5. Síntesis de polisacáridos intracelulares
6. Producción de dextranasa y fructanasa
7. Presencia de glucosiltransferasas
8. Proteínas de fijación celular
9. Proteínas fijadoras de glucano.

1.-Liberación de ácido o acidogenicidad

La alta afinidad de *Streptococcus mutans* por la sacarosa y su alta capacidad para transportarla hacen que este microorganismo sea el que probablemente contribuya más a la acidogénesis y subsecuente formación de caries, cuando la sacarosa es un componente significativo en la dieta de la persona. El *Streptococcus mutans* puede fermentar tales azúcares y producir ácido láctico en mayor proporción, ácido acético, fórmico y etanol. Esto hace que el pH baje y se desmineralice el esmalte dental.

2.-Aciduricidad

El pH es un factor de estrés para las bacterias por lo cual desarrolla varios mecanismos ácidotolerantes. La aciduridad hace referencia a la capacidad que posee el microorganismo de producir ácido en un medio con pH ácido. *Streptococcus mutans* es más acidúrico que los demás tipos de *Streptococcus*.

3.-Resistencia al medio ácido o acidofilicidad

El *Streptococcus mutans* tiene la habilidad de responder rápida y eficientemente a grandes cambios en su medio ambiente, razón por la cual puede resistir la acidez del medio bombeando los protones fuera de la célula. Éste es un elemento fundamental de dominancia de los *Streptococcus mutans* en la placa dental cariogénica.

4.-Síntesis de glucanos y fructanos

Por medio de enzimas como glucosiltransferasa y fructosiltransferasa (GTF y FTF), se producen a partir de carbohidratos de la dieta como la glucosa y la sacarosa, polisacáridos extracelulares de glucano y fructano. Éstos pueden ser solubles e insolubles en agua. Los glucanos de tipo insoluble pueden ayudar a la célula adherirse al diente iniciando fisura e indentaciones. De no ser por mecanismos de acción como éste, las bacterias serían barridas y sus productos como el ácido láctico serían diluidos y neutralizados por la saliva.

Estos polímeros también pueden ser usados como reserva de nutrientes. El *Streptococcus mutans* usa la sacarosa para sintetizar glucanos unidos por enlaces (insoluble, base de la placa bacteriana) y (solubles, base de azúcar libre para el mantenimiento de los microorganismos que están en la película), a través de la acción de tres glucosiltransferasas secretadas que son codificadas por tres genes. Se cree que el principal papel de estos glucanos es facilitar la acumulación de estos microorganismos y establecer una matriz extracelular de polisacáridos, la cual le da a los microorganismos resistencia contra las fuerzas mecánicas normales de limpieza. La glucosiltransferasa no solo cataliza la síntesis sino tiene la capacidad de unir estos polisacáridos. El *Streptococcus mutans* también sintetiza una fructosiltransferasa, producto del gen *fff*, la cual cataliza el clivaje (ruptura) de la sacarosa e incorporación de la fructuosa dentro del polímero fructano, compuesto principalmente por unidades de fructuosa unidas por enlaces beta-2. Los fructanos no facilitan la adhesión, ni agregación del *Streptococcus mutans*, los cuales tienen una vida relativamente corta dentro de la placa dental, debido a la gran hidrólisis enzimática por las enzimas fructano hidrolasas de las bacterias orales.

5.- Síntesis de polisacáridos intracelulares

Entre éstos se encuentra el glucógeno, que sirve como reserva alimenticia y para mantener la producción de ácido durante largos períodos, aún en ausencia de consumo de azúcar. Igualmente, evita la acción tóxica del “azúcar asesino” cuando hay un aporte exógeno excesivo de sacarosa.

6.-Producción de dextranasa y fructanasa

Además de movilizar reservas de energía, estas enzimas pueden regular la actividad de la glucosiltransferasa removiendo productos finales de glucano. Igualmente, permiten a los microorganismos mantener la producción de ácidos cuando no hay aporte exógeno de carbohidratos.

7.-Proteína de adhesión celular (PAC)

Son unas proteínas antigénicas que se encuentran en la cápsula o pared del *Streptococcus mutans* e inician la adhesión a la superficie dental, lo cual es inusual, debido a que éstas se encuentran presentes en otros microorganismos en apéndices como en las fimbrias.

Han recibido diversos nombres como Antígeno I/II, proteína B10, Spa 11, P1 1, R 13 ML-1 y PAC. Pueden tener varias funciones según la región de la proteína; agregación, región amino terminal hidrofóbica de la hélice a la de la molécula. Adherencia en el carbono terminal de la región amino terminal rica en alanina. Por otro lado, pueden unirse también al colágeno en los túbulos dentinales, situación importante en el desarrollo de caries radicular. Se ha sugerido que esta molécula posee varios receptores, lo cual implica múltiples dominios de unión, además de que interactúa con el componente secretorio, la albúmina, aglutinina salivares y glicoproteínas.

El gen está constituido por 4695 pares de bases y codifica para una proteína de 1561 residuos de aminoácidos. Incluye una secuencia líder que va a los residuos 1 al 38. Los residuos 1528 a 1533 están involucrados en la modificación postranscripcional que envuelve el rompimiento de los residuos del carbono terminal y la unión a la pared celular por medio probablemente de enlaces covalentes. La región carboxilo terminal está compuesta por un dominio hidrofílico rico en residuos de glicina y prolina que atraviesa la pared, un motivo

consenso LPNTGV, un dominio hidrofóbico que atraviesa la membrana con residuos de lisina.

La parte menos conservada está alineada entre los residuos 500 y 900. En contraste, la región N terminal está particularmente bien conservada y corresponde a los residuos 121 a 477. Este segmento de alanina se le conoce como región A por ser rica en alanina. En ella se hallan las regiones de mayor interés que son las comprendidas entre los residuos 301 a 319, 361 a 377, siendo los segmentos más importantes porque poseen los epítopes (fragmento de la proteína que reconocen los blancos sobre los que ésta actúa) para linfocitos B y T. La estructura secundaria sugiere a la región A en el terminal amino de la molécula presenta 7 residuos periódicos y esto es lo que forma la hélice enrollada en espiral. Los residuos de alanina están agrupados formando una región hidrofóbica que gira dos veces alrededor de la hélice. La porción central incluye una serie de repeticiones de una secuencia de 39 residuos ricos en prolina (residuos 816 a 1213). A ésta se le conoce como región P, la cual se cree que es la región más relacionada con la unión entre la superficie de la proteína y los componentes salivales.

En varios estudios efectuados en la década de los ochenta se sugirió que por homología de las secuencias (segmentos de cadenas de aminoácidos iguales entre dos proteínas diferentes), se podría presentar reactividad cruzada entre PAC y las proteínas del músculo cardíaco, lo cual podría llevar a enfermedades autoinmunes. Se concluyó que la capacidad del *Streptococcus mutans* para inducir anticuerpos de reactividad cruzada no es causada por la proteína PAC, sino por otros antígenos de la pared celular de esa bacteria.

Como muestran diversos estudios realizados hasta el momento, varias secuencias de la proteína PAC han sido determinadas como inmunonógenas y se ha propuesto sus usos como antígenos vacunales, a pesar de haberse comprobado su capacidad inmunogénica en animales, no se ha comenzado la experimentación con esa proteína en humanos.

8.-Glucosiltransferasas

Como ya se mencionó antes, las glucosiltransferasas del *Streptococcus mutans* juegan un papel importante en la cariogenicidad de esta bacteria, esto es debido a la habilidad de estos microorganismos para sintetizar glucanos adhesivos los cuales están relacionados con la acumulación y adherencia de las bacterias de la placa sobre la superficie del diente.

9.-Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs)

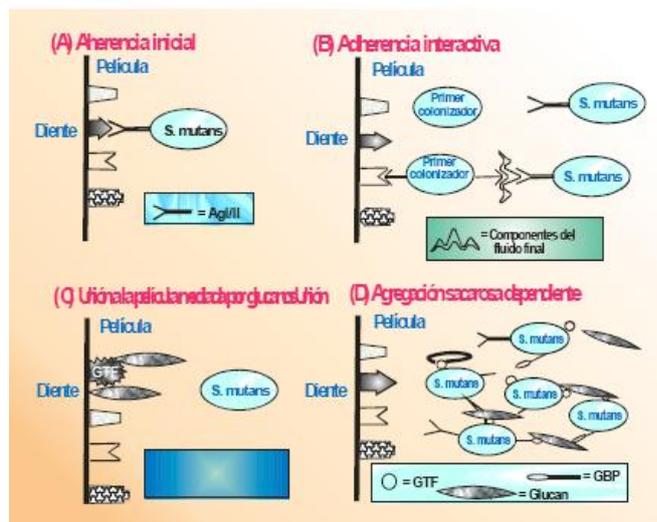
Son productos extracelulares que unen o asocian glucanos en presencia de sacarosa y por esto se encuentran involucradas en los procesos de formación de placa dental bacteriana cohesiva. Teóricamente, las proteínas fijadoras de glucanos son importantes en el ámbito molecular de la patogénesis de la caries dental por *Streptococcus mutans*. Todas las proteínas fijadoras de glucanos muestran afinidad por glucanos ricos en enlaces alfa-1,6. *Streptococcus mutans* sintetiza al menos dos proteínas fijadoras de glucanos que no tiene actividad enzimática de glucosiltransferasas, una de ellas es secretada como una proteína de 74 kDa (GBP74) que es la predominante cuantitativamente entre las obtenidas del sobrenadante de cultivos de *Streptococcus mutans*.

Smith y colaboradores (1994) aislaron y purificaron una nueva proteína fijadora de glucanos *Streptococcus mutans* cuyo peso es de aproximadamente 59 KDa, por lo que se denominó GBP. Determinaron que esta proteína es diferente de la GBPs, dado que presenta diferente tamaño, difiere en su posición de elución en gradiente salino y los antisueros para GBP 59 y GBP 74 no presentan reacción cruzada. En el mismo estudio concluyeron que aparentemente la GBP 59 es inmunogénica en humanos, ya que se encontraron anticuerpos Ig A en muestra de glándula parótida de adultos que mostraban reacción con GBP 59 en ensayos de inmunoabsorbancia. Igualmente, pudieron confirmar la actividad de fijación de glucanos de la GBP 59 y que la GBP 59 es estructural y antigénicamente diferente de la GBP 74 siendo capaz de inducir niveles significativos de Ig A salival en humanos. El antisuero para GBP 74 reaccionó también con epítopes de la GBP 87 del *Streptococcus sobrinus*, indicando que existe relación estructural entre GBPs de diferentes especies de *Streptococcus*.²²

Banas y colaboradores (1989) determinaron la secuencia de nucleótidos del gen GBP, que codifica alfa para la GBP de *Streptococcus mutans*,

encontrando que está constituido por 1689 bases con un péptido señal de 35 aminoácidos. El peso molecular de la proteína procesada se calculó en 59,039 KDa. Se encontró que las repeticiones son homologas a secuencias hipotéticamente involucradas en la unión de glucanos en la GTF-I DE *Streptococcus downei*. Y también a secuencias de proteínas codificadas por los genes *gtfB* y *gtfC* de *Streptococcus mutans*. Proponen que estas secuencias repetidas pueden representar segmentos peptídicos que son importantes en la unión de glucanos y que pueden ser distintos entre las GBPs de otras bacterias habitantes de placa o cavidad oral.

Formación de la película adquirida sobre la superficie del diente por *Streptococcus mutans*



Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos, Aricapa Paola, Bogotá 2009, pág. 64.²³

2.2.2.-PLANTAS MEDICINALES:

2.2.2.1.- PRINCIPIO ACTIVO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Thompson²⁴ refiere que el valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química – principio activo – que produce un efecto fisiológico. Mucho de los principios activos son sumamente complejos, desconociéndose aún su naturaleza química; otros

han sido purificados, sintetizados o imitados. Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, sapogeninas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas.

2.2.2.2.-DEFINICIÓN

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias volátiles con propiedades aromáticas, extraídos de plantas, en su mayoría por destilación; son generalmente líquidos y rara vez sólidos.²⁵⁻²⁷ Son el producto final del metabolismo secundario de muchas células vegetales, por lo que no se reintegran al metabolismo celular.²⁸

Augusto²⁹ define a los aceites esenciales como aquellas sustancias caracterizadas por su volatilidad, formadas por agrupaciones de un gran número de compuestos químicos aromáticos. Existen en las diferentes partes de las plantas, siendo estas sustancias no miscibles en agua. Morales³⁰ reporta que la mayoría de las esencias están constituidas por un compuesto predominante; pero que no siempre las características de olor y sabor están dadas por el compuesto principal. Otros componentes en menor traza son importantes y en algunos casos la calidad comercial de ciertas esencias depende de dichos constituyentes.

2.2.2.3.-COMPOSICIÓN

Se considera que los aceites esenciales son químicamente una mezcla compleja y muy variables de hidrocarburos alicíclicos, denominados terpenos y sus derivados oxigenados llamados alcanfores.³¹ La composición de los aceites esenciales es diversa. Están principalmente constituidos por hidrocarburos de fórmula $C_{10}H_{16}$. En la actualidad se refieren a un gran número de hidrocarburos que aparecen en la naturaleza con fórmula (C_5H_8) , sus derivados y compuestos aromáticos.²⁵⁻²⁷

Los terpenos por su composición, pueden derivar de la condensación de dos moléculas de Isopreno C_5H_8 . En los mismos aceites esenciales, y en otros productos naturales, aparecen compuestos

derivados, análogamente, del Isopreno, de modo que la calificación de terpeno se extiende a todos aquellos, dividiéndolos en hemiterpenos C_5H_8 , terpenos propiamente dichos, sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$, diterpenos $C_{20}H_{32}$ y politerpenos $(C_5H_8)_n$, siendo n un número elevado.^{26,27}

Los productos derivados de Isoterpenos que tienen oxígeno reciben el nombre de alcanfores, como ejemplo: en los hidrocarburos terpénicos figuran los limonenos, el mirceno, el pineno. Entre los alcoholes terpénicos más importantes, el geraniol (de las esencias de las rosas), citronelo, etc.^{25,26}

2.2.2.4.-PROPIEDADES FÍSICAS³²

- Líquidos a temperatura ambiente (a diferencia de los aceites “fijos”).
- Muy raramente son coloreados.
- En general, su densidad es inferior a la del agua.
- Poseen un índice de refracción elevado.
- Desvían la luz polarizada.
- Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales.
- Arrastrables en vapor de agua (muy poco solubles en ella).
- Punto de ebullición es superior a los 100 °C.

2.2.2.5.-COMPOSICIÓN QUÍMICA

Están constituidos por muchas clases de compuestos químicos, algunos por un solo componente en un alto porcentaje y otros por mezclas complejas de compuestos cíclicos aromáticos, acíclicos, heterocíclicos y derivados oxigenados.

Los constituyentes principales de los aceites esenciales son:³³

- Hidrocarburos: Mirceno, cinemo, pineno, canfeno, felandreno, bineno, limoneno, cariofileno, geranioleno, santaleno
- Alcoholes: Isoamílico, geraniol, linalol, citronelol, nerodinol, farsenol, terpinol, mentol, borneol, bencílico, fenil-etílico
- Fenoles: Timol, carbacrol, eugenol, vainillina
- Aldehídos: Citral, citronelal, anisaldehído, benzaldehído, cinamadehído
- Cetonas: Alcanfor, carvona, mentona, piperitona, acetato fenona
- Éteres: Anetol, metilchavicol, eucaliptol, ascarodol
- Ésteres: Salicilato de amilo, benzoato de metilo, acetato de terpinilo, acetato de geranilo

2.2.2.6.-LOCALIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS

Según Miller³⁴ 2000 especies de plantas producen aceites esenciales. Las especies que proporcionan mayor cantidad de aceites esenciales pertenecen a las Familias Labiadas, Umbelíferas Compuestas, Mirtáceas, Laureáceas, Rutáceas y Pináceas. Los aceites esenciales se hallan en regiones circunscritas de la planta como son: raíz, tallos hojas; son segregados por estructuras especializadas como los pelos glandulares, cavidades esquizógenas, etc.

2.2.2.7.-FUNCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LA PLANTA

Meyer³⁵ informa que no se conoce exactamente la importancia bioquímica que desempeñan los aceites esenciales en las plantas.

Probablemente deben considerarse como productos accesorios del metabolismo, es probable que tengan un papel ecológico. Sin embargo; otros estudios han demostrado que los aceites esenciales regulan la transpiración, especialmente al alterar o modificar la actividad calorífica y la presión osmótica, manifiesta que los aceites esenciales son secreciones patológicas como la resina, el bálsamo, etc., sirviendo a la planta como sustancias protectoras contra las enfermedades de los órganos dañados.³⁶

2.2.2.8.-INFLUENCIA DE LOS FACTORES EXTERNOS EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Diversas investigaciones estudiaron el tipo de influencia de los factores externos y su relación con los aceites esenciales, concluyendo que la luz, el suelo, el clima, la velocidad del viento, etc. determinan su producción.^{24,37,38}

2.2.2.9.-ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales, compuestos extraídos de varios tipos de plantas y usados para preservar alimentos y bebidas, tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. En su estudio Walton y col. demostró que el extracto destilado del ajo tiene efectos bactericidas y bacteriostáticos.³² Se conoce de la actividad antimicrobiana de varias especies vegetales en forma de extractos o hierbas aromáticas en los alimentos, inhiben la formación vegetativa de esporas, detienen el crecimiento de elementos patógenos y levaduras.³²

2.2.2.10.-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 de los aceites esenciales también dependerá del tipo de microorganismos y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos.³ Kakrani y col. establecieron, *in vitro*, la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antimicótica de los aceites

esenciales de *Aglaodoratissima*. Las investigaciones plantean que los aceites esenciales interferirían la fase del metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción.⁴

2.2.2.11.-EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Para obtener la fracción cromática del material vegetal, a lo largo de los años, se usaron diferentes procesos. Motle³⁹ en su estudio consideraba los siguientes métodos:

a) Extracción por expresión

b) Extracción por solución

Con grasas sólidas y frías

Con grasas líquidas y calientes

Con solventes volátiles

c) Extracción por destilación

Extracción por destilación con agua caliente

Extracción por arrastre de vapor

2.2.2.11.1.-Extracción por destilación por arrastre de vapor

Esta técnica resulta una de las más simples y económicas para obtener el aceite esencial de este tipo de planta y en general para cualquier otro. Las ventajas de este método son su simplicidad, bajo costo y el hecho de poder maniobrar grandes volúmenes de materia prima.

Este método se fundamenta en que los aceites esenciales son arrastrados por la corriente de vapor de agua que se genera en la fuente de

vapor, luego esta mezcla (vapor de agua y aceite) es condensada mediante su paso por un refrigerante de vidrio, para luego separar el aceite del agua por simple diferencia de densidades. La destilación es una operación farmacéutica que tiene por finalidad separar los principios volátiles (contenidos en una mezcla compleja) de los que no lo son. El equipo de destilación está compuesto por un sistema de destilación de doble balón, en el cual solo uno de los balones que contiene agua, es sometido al calor directo; mientras que el segundo balón que contiene la planta licuada recibe los vapores de agua, para luego liberar el vapor mixto (agua-aceite esencial) hacia el condensador.

El método involucra los siguientes pasos:⁴⁰

- a) Selección de las hojas, talluelos y flores en buen estado.
- b) Las hojas se pesan y licúan, para lo cual se utiliza una pequeña cantidad de agua destilada, éste luego se deposita en el segundo balón de destilación.
- c) Se activará el sistema al someter a calor directo (mechero de Bunsen) el balón de agua destilada.
- d) El destilado se recibe en un depósito estéril y cerrado, aquí se observa un estado difásico entre agua y aceite esencial, debido a la diferencia de densidades. Esto permite separar el aceite esencial mediante el uso de pipeta Pasteur a viales estériles.
- e) Los aceites esenciales obtenidos luego son esterilizados por filtración con membrana de Millipore de 0.22 μm ; almacenado a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización.

2.2.3.- *Minthostachys mollis* (MUÑA)

2.2.3.1.-*Minthostachys mollis*

Se denomina en la lengua Quechua “muña”, y en la Aymara tiene dos nombres: “Coa” y “Huaycha”. Debido a sus características semejantes al póleo y orégano, los españoles la denominaban póleo silvestre. Otros nombres vulgares con los que se le conoce a esta planta son: "muña

negra", "polco silvestre", "coz", "muña-muña", "arash muña", "kon" "orcco-muña".^{41,42}

La muña es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3500 m.s.n.m.⁴² Habita entre los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, comportándose como tal; existe en gran abundancia. Así como es una planta hemicriptófila que durante la época más fría del invierno y seco desaparecen sus órganos aéreos para brotar nuevamente con las primeras lluvias de la primavera.⁴⁴ Alcanza una altura de 0.80 a 1.50 m, desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, crece en lugares cercanos a acequias, manantiales sin tener grandes requerimientos de agua.³⁰ Se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, bien drenados, con buena retención de humedad, con un pH entre 5-8 y un clima con elevada luminosidad, florece en época de lluvia, se multiplica por semilla y por codo.³⁰

2.2.3.1.1.- CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA⁸

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

Fórmula floral : K(5) C(2-3) A(2-2) G(2) (13)

2.2.3.1.2.- CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL GÉNERO EN ESTUDIO

Es una planta arbustiva, leñosa, frondosa en la parte superior, de aspecto general glauco, erecta y pubescente, su tallo es ramificado desde la base. La hoja es el elemento vegetativo simple ligeramente aserrado, carece de estípulas, cortamente pedunculares de filotaxia opuesta. Su peciolo mide entre 4 y 6 mm de largo, pubescente acanalada en la parte superior y convexo en la parte inferior, es aquí donde se deposita la mayor cantidad de aceite, que al estrujarlos dejan sentir su aroma característico. Las flores son hermafroditas.

El limbo es obovado 1.7 a 2.5 cm en su mayor ancho, y de 2 a 4 cm de largo; su base es atenuada de bordes aserrados, ápice agudo de nerviación penninervia. El limbo es pubescente tanto en el haz como en el envés, debido a lo cual la hoja presenta una coloración verde pálida; sus nervaduras secundarias son muy desarrolladas y ligeramente reticuladas.

El cáliz soldado con 13 venaciones terminado en 5 lóbulos dentados casi iguales entre sí con pelos cerellosos en la base, la corola raramente es de 6 mm de largo, dividida en 2 labios: 2 lóbulos o labio superior y 3 lóbulos o labio inferior. Los pelos de las partes aéreas, o sea de las hojas y tallos, parece que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial, de aquí que al estrujarlos dejen sentir su aroma o el sabor picante que da una impresión de frío que es característico. Las flores son pequeñas, reunidas en verticilos falsos, situados en la parte superior de las ramas con pedúnculos cortos, 2 en cada axila.⁸

2.2.3.1.3.-TIPOS DE *Minthostachys*

Se indica un total de 12 especies, cuya distribución abarca desde Argentina hasta Venezuela⁴² y en el Perú encontraron 6 especies

distribuidas desde el norte (Cajamarca) hasta el sur (Cusco), con una mayor distribución en la región central, cuyas especies son: ^{43,45}

- *Minthostachys glabrenscas*
- *Minthostachys salicifolia*
- *Minthostachys setosa*
- *Minthostachys spicata*
- *Minthostachys tomentosa*
- *Minthostachys mollis (HBK) griseb*

2.2.3.1.4.-CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (HBK) griseb “MUÑA”^{29, 30}

Aspecto	líquida, clara, transparente
Color	Incoloro
Olor	característico en menta
Sabor	picante
Densidad relativa	0.92
Índice de refracción	1.4699
Solubilidad en alcohol al 70 °	5
Índice de mentona	33.88 %
Índice de menta	22 %
Índice de acidez	1.683
Índice de ésteres	5.819
Rotación específica	-2 ^a 45´
Índice de éter	16.80 %
Contenido de mentol total	4.042 %
Solubilidad en etanol	95 %

2.2.3.1.5.-COMPOSICIÓN QUÍMICA

Con respecto a la composición química del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) existen pocos trabajos de investigación por lo que se tiene poca información; el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), al igual que otros aceites esenciales, presenta una estructura aldehídica, cetónica, alcohólica (mentol y mentona), ésteres, éteres y terpenos en mayor porcentaje.⁸

Gibaja⁴⁶ realizó la desterpenación del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) determinado el 10.20 % para la parte desterpenada (compuestos oxigenados) y 89.80 % para la fracción terpénica. Chica⁴⁷ determinó la presencia de carvacril acetato, carvacrol, pulegona y mentona.

2.2.3.1.6.- MOLÉCULAS PRESENTES EN *Minthostachys mollis*⁸

La composición de la muña es: aceite esencial, glicósidos, mucílagos, saponinas, taninos, alcaloides y esteroides. Además contiene carbohidratos, calcio, fósforo, hierro, trazas de vitamina B1, esencias y mentol.

Pulegona

Es uno de los componentes más importantes de muchos aceites *Minthostachys*, pero es mejor conocido por poleo (*Mentha pulegium*). Es altamente tóxico en grandes cantidades, daña el hígado y puede provocar el aborto. Su toxicidad probablemente explica algunos de los efectos de aceite de *Minthostachys* contra las plagas y parásitos. La sustancia también se usa en perfumería y saborizantes.

Mentona

Otro componente importante, junto con la pulegona a menudo representa más del 75 % de la composición del aceite entero. El componente más conocido de la menta (*Mentha piperita*). Tiene un aroma muy agradable sabor a menta y se usa en perfumería, pero también tiene propiedades digestivas.

Carvacrol

Es un componente dominante en menor proporción, según estudios de los aceites *Minthostachys mollis*. El carvacrol también se encuentra en varias hierbas conocidos como el orégano (*Origanium vulgare*), la ajedrea de jardín (*Satureja hortensis*) o tomillo del monte serpolio (*Thymus serpyflum*).

Carvona

Como su nombre lo sugiere es conocida como un producto de semillas de alcaravea (*Carum carvi*), un Apiaceae. Tiene propiedades digestivas y se utiliza para dar sabor.

Mentol

Por lo general, mucho menos importante en *Minthostachys mollis*, pero a veces, se encuentra como componente menor de la mezcla de aceites. Se utiliza contra el dolor de garganta.

Linalol

Empleado como condimento y como insecticida, linalol es más conocido de cilantro (*Coriandrum sativium*) de la familia Apiaceae. A menudo es uno de los componentes menores del aceite de *Minthostachys mollis*.

Timol

Es un componente bien conocido de los aceites esenciales de distintas especies de tomillo. Actúa como antiséptico y contra el dolor de garganta y tos. A veces se encuentra como un componente menor en el aceite de *Minthostachys mollis*.¹⁶

2.2.3.1.7.-COMPOSICIÓN NUTRITIVA DE *Minthostachys mollis*¹⁸

En 100 gr. De parte comestible

Componentes mayores:

Agua	16 ug %
Proteínas	3.20 ug %
Grasa	2.80 ug %
Carbohidratos	66.30 ug %
Fibras	9.40 ug %
Cenizas	11.70 ug %

Minerales

Calcio	2.24 ug %
Fósforo	269 ug %
Hierro	22.40 ug %

Vitaminas

Retinol	306 ug %
Tiamina	0.35 ug %
Riboflavina	1.81 ug %
Niacina	6.85 ug %
Ac. Ascórbico	21.10 ug %

Otros componentes

Ácidos débiles	2.54 ug%
Ésteres	14.02 ug %
Taninos	Positivos
Resinas	Positivos
Fenoles	Positivos
Alcoholes	Positivos
Aldehídos	Positivos
Cetonas	Positivos
Carbonilo	22.06 ug %
Mentol	40.42 ug %

2.2.3.1.8.- USOS Y APLICACIONES DE LA ESPECIE *Minthostachys mollis*

La muña es conocida por la gente del pueblo por sus propiedades digestivas contra cólicos, flatulencias (carminativo), vómitos, diarreas, antitusígenas, antiasmático, expectorante,^{16,42} antiespasmódico,⁴⁸ antiséptico, analgésico, antiinflamatorio, febrífugas, en tratamiento de tumores y mezclándola con chilca se emplea en fracturas.³ Es excelente contra la halitosis⁴⁹ y para combatir jaquecas y soroche.¹⁶

Además es utilizada como condimento para preparar platos típicos. En el campo agrícola se emplea para la preservación de algunos productos como la papa, del ataque de insectos.^{41,42,49} A manera de fumigante orgánico vegetal contra el gorgojo de los andes y como antimoho.⁴⁸

En el campo agropecuario es utilizado para controlar los ectoparásitos y endoparásitos de los animales domésticos, además para curar sarna en equinos y camélidos.¹⁶ En otras zonas de Latinoamérica, principalmente en Argentina, se le emplea para aromatizar y fabricar licores y bebidas.¹⁷

2.2.4.- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA

La actividad antimicrobiana se mide *in vitro* para determinar principalmente la potencia de un agente antibacteriano en solución, su concentración en los líquidos del cuerpo o en los tejidos y la susceptibilidad de un microorganismo dado a concentraciones conocidas del medicamento. Los métodos más utilizados son:

2.2.4.1.- MÉTODO DE DILUCIÓN

Se incorporan cantidades graduadas de las sustancias antimicrobianas en medios bacteriológicos líquidos o sólidos; los medios se inoculan después con las bacterias de prueba y se incuban. El punto final se toma como la cantidad mínima de sustancia antibacteriana requerida para inhibir el crecimiento o para matar las bacterias de prueba.^{50,51}

Las pruebas de sensibilidad por dilución en agar consumen tiempo y su uso está limitado a circunstancias especiales. Sin embargo, el advenimiento de series preparadas de dilución de caldos para muchos fármacos distintos en placas con microdilución ha aumentado y simplificado de manera considerable al método. La ventaja de las pruebas con microdilución es que permite informar un resultado cuantitativo que indica la cantidad de un fármaco dado necesaria para inhibir (o matar) a los microorganismos sujetos a la prueba.^{50,51}

2.2.4.2.-MÉTODO DE DIFUSIÓN

Este método, que sufrió diferentes modificaciones hasta que fue estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados Unidos en 1966, representa la prueba de susceptibilidad más ampliamente utilizada en bacteriología clínica porque permite obtener resultados bastante exactos mediante un método cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo, este último es el más utilizado.

El Comité de Expertos de la OMS (NCCLS en su documento M7-T) publicó las “Normas” para efectuar algunas modificaciones al descrito por Bauer, de manera que los resultados sean comparables en todas partes del mundo. Estas normas tienen en cuenta:^{48,49}

Condiciones de la cepa:^{48,49}

- Debe aislarse del material de estudio.

- Debe obtenerse en forma de cultivo puro.
- Debe ser agente etiológico del proceso infeccioso.
- Se podrán utilizar cepas de referencia cuando existan dudas del material que se usa.

Cualidades del disco de papel:^{48,49}

- Debe tener un tamaño de 5 a 7 mm y un espesor de 0.02 mm.
- Deben cargarse con una concentración de antimicrobiano selectivo de manera que se obtenga una zona de inhibición no mayor de 40 mm.
- La cantidad de antimicrobiano selectivo que contiene cada disco debe ser justa porque una sobrecarga falsearía los resultados.
- Deben mantenerse almacenados a temperaturas de 4 °C o según las instrucciones del fabricante, para que no haya deterioro en la potencia de la droga.
- Tienen que estar en un ambiente con sustancias desecadoras para evitar los vapores de condensación al almacenarlos en el refrigerador.

Indicaciones para la preparación de las placas:^{48,49}

- El medio deberá distribuirse uniformemente en la placa.
- La altura del medio debe ser de 4 mm para que se pueda estandarizar la difusión de la droga porque si se disminuyera el espesor de la capa de agar se obtendría halos inhibición más amplios.

Este método requiere experiencia de laboratorio y conocimiento de bacteriología porque de lo contrario se pueden cometer errores que repercutirán clínicamente. A continuación se detalla los pasos a seguir para realizar esta prueba:^{48,49}

- Se realizará la siembra de la placa con el agar selectivo para el microorganismo específico, esta siembra puede ser por disseminación en la superficie, por inundación o por agotamiento por estrías.
- Se deja secar entre 3 y 5 minutos.

- Con una pinza estéril de puntas finas se colocan sobre la superficie del agar sembrado discos individuales o en estrella; estos llevan impresa la abreviatura del antimicrobiano selectivo en el cual se encuentran embebidos y la serie a la cual pertenecen.
- Con respecto a los discos se debe tener en cuenta que para asegurar el contacto adecuado y por lo tanto una difusión uniforme se los debe presionar suavemente. Para permitir la lectura de los resultados se los debe colocar con la inscripción hacia arriba en el medio de cultivo. Para impedir la superposición de los halos de inhibición deben estar a una distancia no menor de 15 mm entre sí y a 1.5 cm. del borde de la placa.
- Se deja la placa no menos de media hora a temperatura ambiente para que el disco absorba agua del medio de cultivo y así permita la difusión radial del antimicrobiano selectivo, lo que produce un gradiente de concentración, es decir que cuanto más nos alejamos del disco menor será la concentración del antimicrobiano. Esta predifusión es necesaria para reducir una posible causa de error.
- Luego se incuba de acuerdo a las características de cada microorganismo. Una vez transcurrido el tiempo indicado se procede a la medición e interpretación de la zona circunda el disco, llamada halo de inhibición. Este informa si el microorganismo es sensible, resistente o intermedio. La falta de desarrollo alrededor del disco indica que la bacteria es “sensible” al antimicrobiano selectivo, lo que significa que después de tratar al paciente infectado por el microorganismo con las dosis habituales de dicho antimicrobiano se observará una respuesta favorable al tratamiento. El crecimiento del microorganismo alrededor del disco indica una cepa “resistente”, es decir, una con la cual no se obtendrá ninguna respuesta terapéutica. Existe un tercer tipo de cepa, la cepa “intermedia”, que es la que exige la administración de dosis de antimicrobianos superiores a las habituales para obtener una respuesta terapéutica favorable.
- Como el tamaño de cada halo de inhibición depende de la sensibilidad de la cepa al antimicrobiano, de la velocidad de crecimiento del microorganismo, de la cantidad (carga) de antimicrobiano selectivo

presente en el disco y de la capacidad para difundir en el medio, etc, un halo más grande no siempre indica mayor actividad antimicrobiana.

2.2.5. AMOXICILINA

Este antibiótico es frecuentemente empleado por los profesionales de la salud en el tratamiento de infecciones, por ser económico y de amplio espectro, motivo por el cual tiene mucha aceptación por parte de la población.

El mecanismo de acción de esta amino penicilina es inhibir la síntesis de la pared celular. El peptidoglucano es el mucopéptido esencial en la composición de la pared celular, cuya síntesis es impedida por el antibiótico por inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes, la droga se fija en la pared celular y cuando se produce la división de la bacteria, aparecen defectos en dichas pared, el microorganismo se hace osmóticamente sensibles, penetra líquido en su interior, estalla y se lisa.⁵²

2.3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿CUÁL ES LA CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) QUE CAUSE EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* FRENTE A *Streptococcus mutans*?

2.4.- JUSTIFICACIÓN

La caries dental según reportes del MINSA¹ es considerada la patología bucal con más alta prevalencia en la población peruana, es por ello que con el presente trabajo, buscó investigar al principal agente microbiológico causal de la caries dental que es el *Streptococcus mutans*. El producto natural de esta investigación es la Muña, planta que cada vez es más difundida y conocida, ya que las poblaciones andinas la utilizan como planta curativa para problemas gastrointestinales, además se consume como bebidas e insumos para preparación de comidas.

Este trabajo *in vitro* investiga si el *Streptococcus mutans* es susceptible al aceite esencial de muña concentrado y a determinadas diluciones. Lo que permitirá posteriormente hacer investigaciones para el uso de la muña en productos de uso masivo y que estén al alcance de la población.

2.5.- OBJETIVOS

A.- GENERALES:

- Valorar efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) en *Streptococcus mutans*.

B.- ESPECÍFICOS:

- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de Muña 100 %.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de Muña al 50 %.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de Muña al 25%.
- Comparar cuál de las concentraciones del aceite esencial de Muña presenta más efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans*.

2.6.- HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H0)

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) NO tiene efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans*.

Hipótesis alterna (H1)

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) tiene efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans*.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- TIPO DE ESTUDIO

Análisis temático: Experimental

Según la ocurrencia de los hechos: Prospectivo.

Estudio según la secuencia de los hechos: Transversal.

3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

La población a trabajar cepa estándar de *Streptococcus mutans* ATCC (25175).

3.3.-OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores	escala
Concentración del aceite esencial <i>Minthostachys mollis</i> (Muña)	Se encuentra expresada en el porcentaje en el cual el aceite esencial de muña puro va a ser diluido dimetilsulfóxido		Concentración al 100 % aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> al 100 %	Concentración 100 %
			Concentración al 50 % 100ul de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> en dimetilsulfóxido en proporción de 1:2	Concentración al 50 %
			Concentración al 25 % 100ul de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> en dimetilsulfóxido en proporción de 1:4	Concentración al 25 %

Cultivo bacteriano	Medio de cultivo en el cual mediante condiciones específicas se va a cultivar la cepa de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y le permite desarrollarse en adecuadas condiciones.		Crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> en el medio de cultivo	Si hubo crecimiento
				No hubo crecimiento
Efecto antibacteriano del aceite esencial de	Efecto en el cual tras la aplicación del aceite esencial de muña va a repercutir en el desarrollo	Cuantitativamente	Medición del diámetro de inhibición en mm	Cuantitativa Razón

<i>Minthostachys mollis</i> (Muña)	del <i>Streptococcus mutans</i> .	Cualitativamente	Medición del diámetro de inhibición en mm y calificación según las pautas de Duraffourd ²⁵	Cualitativa Ordinal
---	-----------------------------------	------------------	---	------------------------

3.4.- MATERIALES

a.- Materiales y equipos para extraer el aceite esencial:

- Hojas de muña
- Agua destilada
- Sulfato de sodio anhidro
- Vaso de precipitado
- Balón de fondo plano
- Balanza
- Soporte
- Refrigerante de bolas o serpentín

b.- Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo

- Medio de cultivo: Agar TSA (tripticase soya agar)
- Agua destilada
- Placas petri
- Pipetas
- Tubos de prueba
- Balanza
- Probetas
- Matraz de Erlenmeyer
- Mecheros
- Microscopio óptico
- Esterilizador de calor seco (horno)
- Autoclave
- Incubadora
- Refrigeradora

c.- Materiales para la prueba de sensibilidad antimicrobiana

- Agar TSA
- Discos de papel filtro estériles wathman 3
- Agua destilada

- Aceite esencial de *Mintostachys mollis*
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Discos de amoxicilina de 25 ug
- Cepa de *Streptococcus mutans* activada
- Agua destilada
- Hisopos
- Asa de siembra
- Pinzas estériles
- Placas petri
- Mecheros
- Guantes estériles

d.- Materiales para cuantificar resultados

- Vernier calibrado
- Cámara digital zoom 1.4X
- Lapicero
- Ficha de recolección de datos

3.5.- MÉTODOS

3.5.1.- OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*

3.5.1.1.- RECOLECCIÓN DE *Minthostachys mollis* (MUÑA)

La obtención del aceite esencial se realizó a partir de plantas frescas. Hasta como máximo 1 día de almacenamiento, estas plantas se colectaron de la ciudad de Tarma del departamento de Junín (3080 m.s.n.m.), las cuales fueron conservadas en condiciones óptimas y requerimientos adecuados hasta su utilización para la elaboración del aceite esencial de la muña. Aproximadamente se recolectó entre 8-9 kg de esta materia prima.

3.5.1.2.-IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Estas muestras recolectadas, fueron estudiadas y determinadas según el sistema de clasificación de Cronquist (1988), en el Museo de Historia Natural de UNMSM.⁸

3.5.1.3.- OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA

La obtención del aceite esencial se efectuó con el método por arrastre de vapor de agua, es el que más se recomienda por no usar ningún solvente. Y se siguió, según las pautas indicadas por Morales

El método consistió en colocar 8 kg 600 gramos de "Muña" a lo largo del recipiente de metal del equipo extractor de aceite, de tal modo que el material no esté en contacto directo con el agua; luego se calentó hasta el desprendimiento de vapor de agua, a los pocos minutos se observó el paso del vapor de agua conteniendo el aceite esencial a través de los refrigerantes de vidrio, fueron recolectados en una pera de decantación; se dejó en reposo hasta observar la separación del agua y del aceite, procedió luego a su decantación. El aceite obtenido fue sometido a desecación con sulfato de sodio anhidro; posteriormente fue filtrado, con ayuda de una bomba de vacío, el aceite se depositó en un frasco oscuro y se cerró herméticamente, luego se almacenó en refrigeración para su uso.¹⁸

3.5.1.4.- DILUCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA

Una vez obtenida el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), se utilizó aceite esencial de Muña puro y diluciones de este aceite, para eso se procedió a realizar las diluciones utilizando como solvente el dimetilsulfóxido (DMSO).

Concentración al 50 %, 100ul de aceite esencial de *Minthostachys mollis* en dimetilsulfóxido en proporción de 1:2.

Concentración al 25 %, 100ul de aceite esencial de *Minthostachys mollis* en dimetilsulfóxido en proporción de 1:4.⁵

3.5.2.- CEPA BACTERIANA

Se trabajó con cepas estándares de *Streptococcus mutans* ATCC (American Type Culture Collection).

Streptococcus mutans ATCC (25175), el cual se reactivó y creció en Agar TSA.

3.5.2.1.- REACTIVACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA

Para viabilizar la cepa bacteriana ATCC 25175 de *Streptococcus mutans* se sembró el contenido del vial en el Medio de Agar TSA incubado a 37 °C por 48 horas.

Al cabo de 48 horas se realizó un repicaje con este inóculo en una placa con Agar TSA, y se llevó nuevamente a incubar por 24 horas más.¹³

3.5.2.2.- PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD BACTERIANA

En un tubo de ensayo estéril con suero fisiológico aproximadamente 5 ml se le agregó un inóculo de la cepa de *Streptococcus mutans* previamente activada, y se comparó con el tubo de la escala de Mac Farland a una turbidez al 0.5. Bajo condiciones estériles se procedió a sembrar con un hisopo el inóculo bacteriano en placas que contenían Agar TSA.

Con pinzas estériles se procedió a colocar en cada placa 1 disco de amoxicilina de 25 ug, 1 disco de papel de filtro embebido de aceite esencial de *Minthostachys mollis* 100 % (10 ul), 1 disco de papel de filtro embebido de solución de aceite esencial al 50 % de *Minthostachys mollis* (10 ul), 1 disco de papel de filtro embebido de solución aceite esencial al 25 % de *Minthostachys mollis* (10 ul) y 1 disco con 10 ul de DMSO.

Las quince placas fueron sometidas anaerobiosis bajo microaerofilia con el método de la vela en extinción (se colocan en el

interior de un recipiente con una vela encendida que al ser cerrada va a consumir en oxígeno) e incubados a 37 °C por un periodo de 48 a 72 horas. Se procedió a la lectura de las medidas de los halos de inhibición con la ayuda del vernier previamente calibrado.¹³

3.5.2.3.-EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

La evaluación se realizó tanto cuantitativamente por medición numérica de los halos de inhibición, y cualitativamente siguiendo las pautas por Duraffourd.²⁵

Muchos microorganismos han desarrollado diferentes grados de resistencia a los quimioterápicos, lo que en algunos casos, con el paso del tiempo causan efectos colaterales; lo que no sucede con el uso de los principios activos de una planta.²⁵ Duraffourd ha trabajado mucho en fitoterapia clínica, aplicando tratamientos en base de principios activos comparándolos con la actividad de antibióticos, según lo que reportó, el uso de principios activos en humanos no mostró efectos secundarios.

Para demostrar la susceptibilidad que tienen los microorganismos a diversos aceites esenciales Duraffourd y col. realizaron estudios estadísticos determinando tablas de actividad antimicrobiana basada en porcentajes.²³ Estos consideran la actividad de los aceites esenciales en función al diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano (HICB):

- Nula (-), para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8a 14 mm.
- Medio (muy sensible =++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++).

3.5.3.- RECOLECCIÓN DE DATOS

Se procedió a llenar los datos obtenidos en una ficha elaborada (ver anexos), estos datos se obtuvieron de forma visual y manual.

Para la medición de los halos de inhibición se utilizó un vernier previamente calibrado, con el fin de minimizar errores y cerciorarse que la ficha de recolección de datos no presente errores.

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición sobre el crecimiento del organismo alrededor del disco.

3.5.4.- PROCESAMIENTO DE RESULTADOS

El análisis se realizó con los datos obtenidos y previamente llenados en las fichas, en el programa estadístico SPSS versión 19.

3.5.5.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se aplicó la prueba estadística de análisis de varianza ANOVA para establecer si hubo o no diferencias significativas entre los halos de inhibición; es decir, en las variables cuantitativas a comparar: en el grupo del aceite esencial de muña y el control positivo amoxicilina. Y en el análisis del efecto antibacteriano cualitativo según la escala de Duraffourd se utilizó la prueba Chi cuadrado.

IV.- RESULTADOS

4.1.-ACEITE ESENCIAL

Aproximadamente se obtuvo 48 mililitros de aceite esencial de 8 kilos 600 gramos de hojas de *Minthostachys mollis* (VER ANEXOS), mediante la técnica de arrastre de vapor de agua, el cual representa el 56 % de rendimiento.

Se determinó las propiedades físicas y químicas

CUADRO 01:

solubilidad
esencial de

SOLVENTES	RESULTADOS
Agua	-
Metanol	+++
Etanol 96°	+++

Ensayo de
del aceite

***Minthostachys mollis* (VER ANEXOS)**

Acetato de etilo	+++
Diclorometano	+++
Clorofórmica	RESULTADO
Olor	Sui generis
Color	Ligeramente amarillento
Sabor	Ardiente
Aspecto	Líquido denso

Muy miscible (+++) poco miscible (++) no miscible (-)

CUADRO 02: Ensayo físico-químico del aceite esencial de *Minthostachys mollis*

	RESULTADO
Densidad	0.976
pH	5.5

CUADRO 03: Análisis organoléptico del aceite esencial de *Minthostachys mollis*

4.2.-ACCIÓN ANTIBACTERIANA

El aceite esencial fue aplicado en la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC® (25175), la cual fue adquirida de laboratorio Genlab®, la cual fue reactivada exitosamente en Agar TSA y posteriormente fue sometida a tinción Gram donde se obtuvo como resultado coloración Gram (+) (VER ANEXOS)

CUADRO 04: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* EN CEPA DE *Streptococcus mutans*

Sustancia aplicada	Halo de inhibición	
	Presenta	No presenta
Aceite esencial de muña al 100 %	15 (100 %)	0 (0 %)
Aceite esencial de muña al 50 %	15 (100 %)	0 (0 %)

Aceite esencial de muña al 25 %	0 (0 %)	15 (100 %)
Control negativo (Dimetilsulfóxido)	0 (0 %)	15 (100 %)
Control positivo (Amoxicilina)	15 (100 %)	0 (0 %)

Se evalúa por la presencia de halo de inhibición

En el cuadro se aprecia que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 %, el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 50 % y el control positivo amoxicilina presentaron halos de inhibición, mientras que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 25 % y el control negativo DMSO no presentaron halos de inhibición

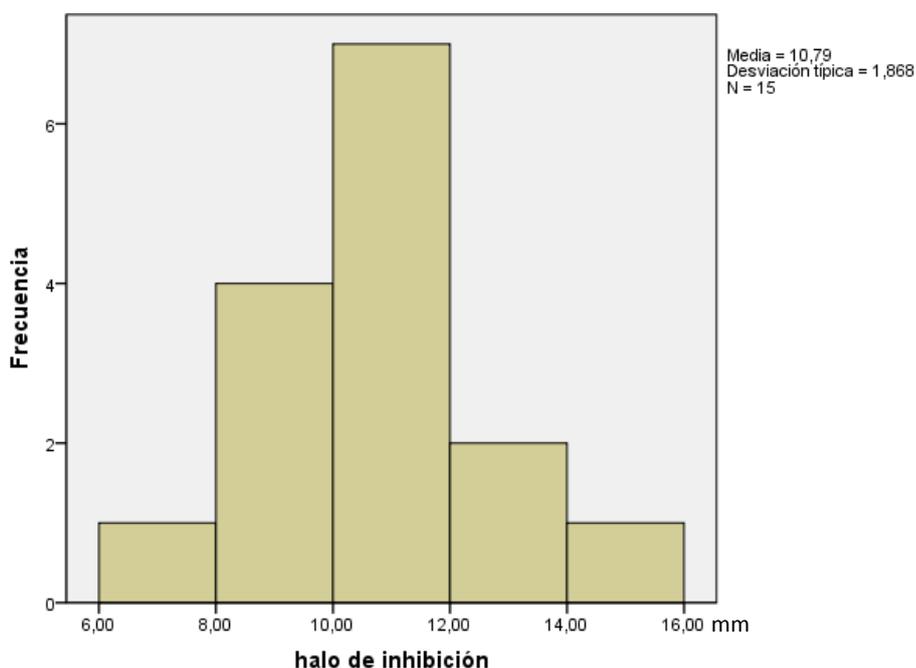
CUADRO 05: HALOS DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* DESPUÉS DE APLICAR ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %

Aceite esencial de muña al 100 %

Media	10,7920 mm
Mediana	10,5200 mm
Desv. típ.	1,86806 mm
Varianza	3,490 mm ²
Valor Mínimo	7,75 mm
Valor Máximo	15,32 mm

Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 5 mm

FIGURA 01: HALOS DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* DESPUÉS DE APLICAR ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %



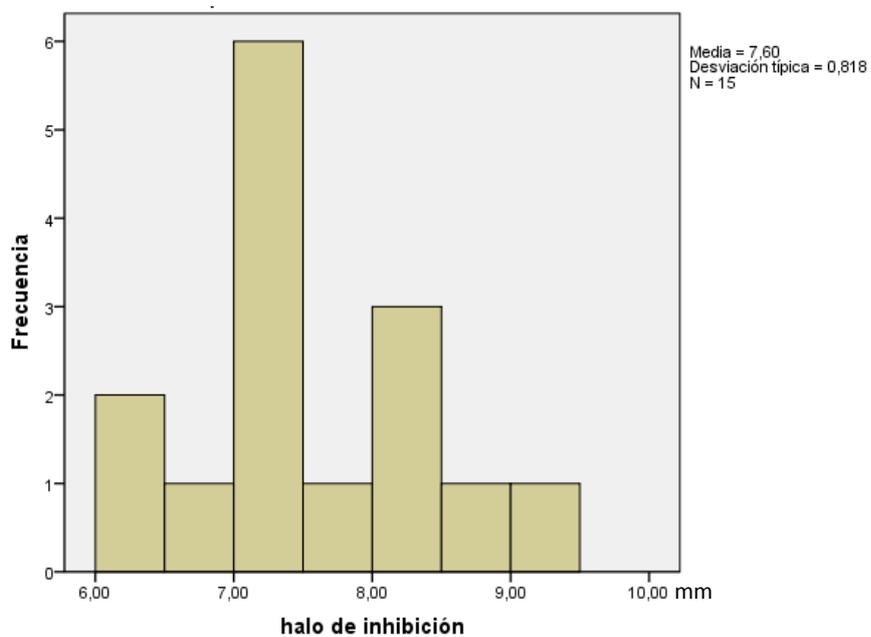
Se observan los halos de inhibición desarrollados por la cepa tras la posterior aplicación del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % los valores que presentaron promedio es 10,79 mm, su valor mínimo se obtuvo 7,75 mm y valor máximo se obtuvo 15,32 mm.

CUADRO 06: HALOS DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* DESPUÉS DE APLICAR ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 50 %

Aceite esencial de muña al 50 %	
Media	7.6007 mm
Mediana	7.4000 mm
Desv. típ.	0.81831 mm
Varianza	0,670 mm ²
Valor Mínimo	6.44 mm
Valor Máximo	9.17 mm

Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 5 mm

FIGURA 02: HALOS DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* DESPUÉS DE APLICAR ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 50 %



Se observa los halos de inhibición desarrollados por la cepa tras la posterior aplicación del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 50 % los valores que presentaron promedio es 7,6 mm, su valor mínimo se obtuvo 6,44 mm y valor máximo se obtuvo 9,17 mm.

CUADRO 07: HALOS DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* DESPUÉS DE APLICAR ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 25 % Y CONTROL NEGATIVO (DMSO)

Aceite esencial de muña al 25 % Y DMSO	
Media	5,0000 mm
Mediana	5,0000 mm
Desv. típ.	0,0000 mm
Varianza	0,0000 mm ²
Valor Mínimo	5,00 mm
Valor Máximo	5,00 mm

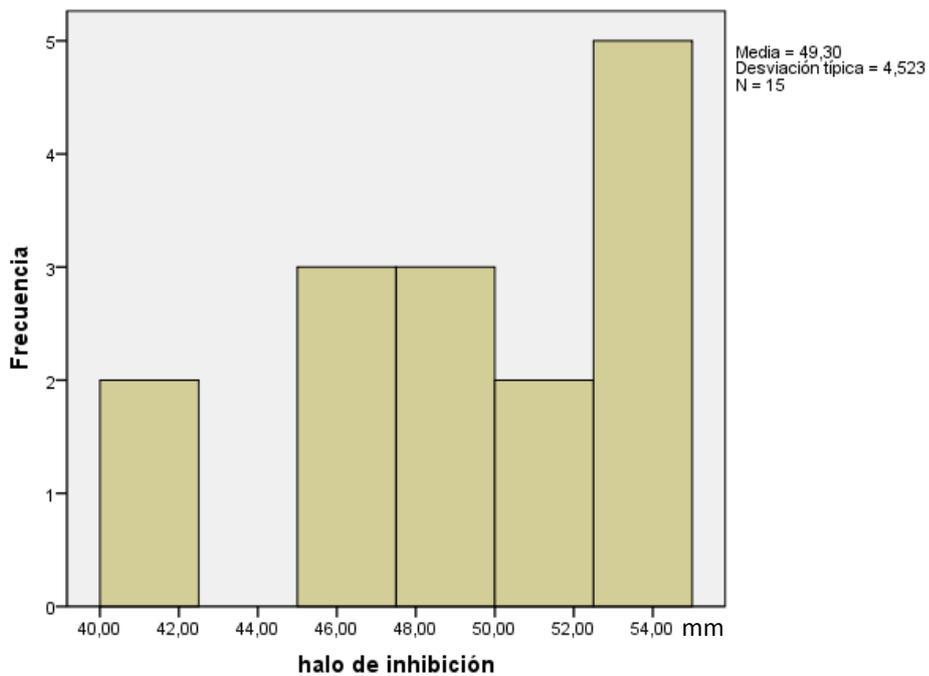
Se observa los halos de inhibición desarrollados por la cepa tras la posterior aplicación del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 25 % y el control negativo DMSO no presentaron halos de inhibición en la cepa de *Streptococcus mutans*, los 5 mm indica el diámetro de los discos.

CUADRO 08: HALOS DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* DESPUÉS DE APLICAR CONTROL POSITIVO (AMOXICILINA)

Amoxicilina	
Media	49,3000 mm
Mediana	49,7800 mm
Desv. típ.	4,52317 mm
Varianza	20,459 mm ²
Valor Mínimo	40,56 mm
Valor Máximo	54,65 mm

Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 5 mm

FIGURA 03: HALOS DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* DESPUÉS DE APLICAR CONTROL POSITIVO (AMOXICILINA)



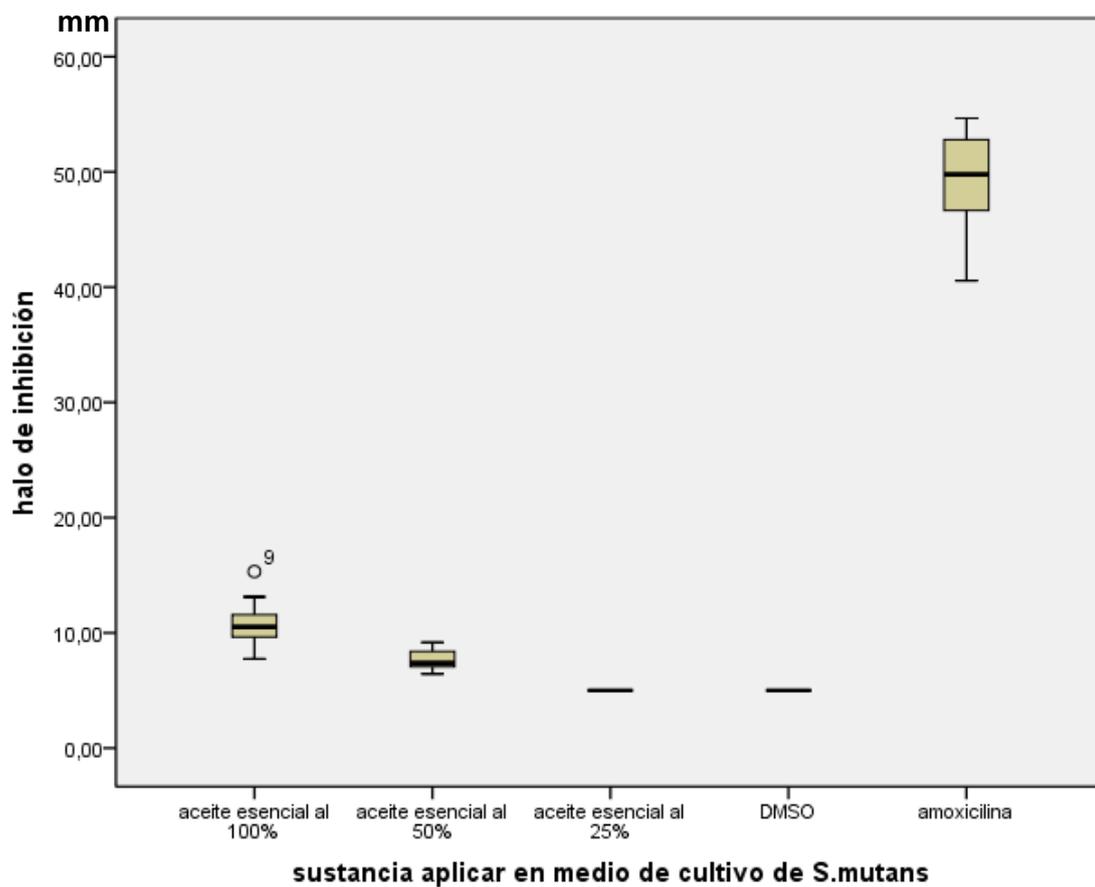
Se observa los halos de inhibición desarrollados por la cepa tras la posterior aplicación del control positivo amoxicilina los valores que presentaron promedio es 49,3 mm, su valor mínimo se obtuvo 40,56 mm y valor máximo se obtuvo 54,65 mm.

CUADRO 09: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %, 50 % Y 25 %

SUSTANCIA	Media (mm)	Mediana (mm)	Desv. típ. (mm)	Varianza (mm ²)	Valor Mínimo (mm)	Valor Máximo (mm)
Aceite esencial al 100 %	10,7920	10,5200	1,86806	3,490	7,75	15,32
Aceite esencial al 50 %	7,6007	7,4000	0,81831	0,670	6,44	9,17
Aceite esencial al 25 %	5,0000	5,0000	0,00000	0,000	5,00	5,00
Control negativo (DMSO)	5,0000	5,0000	0,00000	0,000	5,00	5,00
Control positivo (AMOXICILINA)	49,3000	49,7800	4,52317	20,459	40,56	54,65

Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 5 mm

FIGURA 04: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %, 50 % Y 25 %



En el cuadro 09 se observan los promedios obtenidos de las sustancias aplicadas en la cepa de *Streptococcus mutans* el promedio del control positivo (amoxicilina) fue el mayor 49,3 mm, el aceite esencial de muña al 100 % se

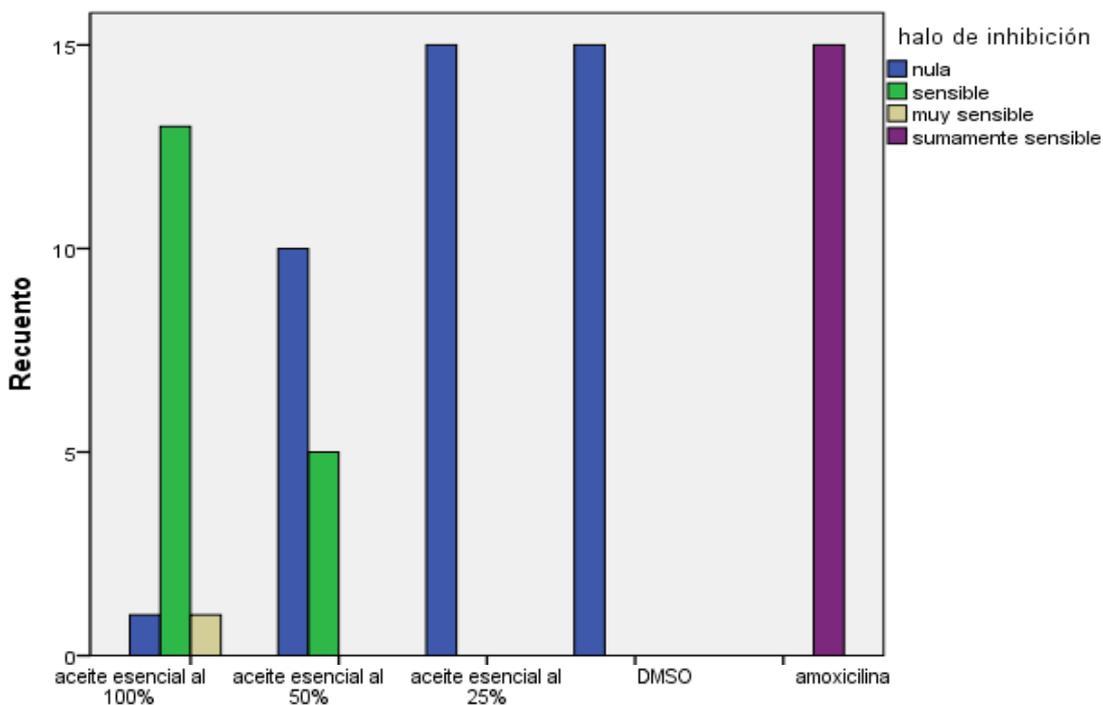
obtuvo un halo de inhibición promedio de 10,79 mm, el aceite esencial de muña al 50 % un halo de inhibición promedio de 7,6 mm y tanto el aceite esencial de muña al 25 % y el control negativo DMSO (dimetilsulfóxido) no obtuvieron halos de inhibición de crecimiento bacteriano, lo que se consideró fue los 5 mm de diámetro del disco, en cuanto a la varianza de las sustancias aplicadas en el control positivo (amoxicilina) se obtuvo un valor mayor de 20,459 mm². Antes se realizó la prueba de Normalidad donde se obtuvo un $p > 0.005$, por lo tanto es compatible para realizarse la prueba estadística de ANOVA, Al tratarse de variables cuantitativas al obtenerse como resultados datos numéricos, se realizó el análisis estadísticos de variables cuantitativas la prueba de ANOVA por ser más de dos grupos, tras realizarla prueba de ANOVA, con las tres diluciones, amoxicilina y DMSO Se obtuvo $p(0.000) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**.

Posteriormente se realizó las pruebas comparaciones múltiples HSD de Tukey y Bonferroni entre las tres diluciones, amoxicilina y DMSO se obtuvieron aceite esencial al 100 %-amoxicilina $p(0.000) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**; aceite esencial al 50 %-amoxicilina $p(0.000) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**; aceite esencial al 25 %-amoxicilina $p(0.000) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**; con el control negativo aceite esencial al 100 %-DMSO $p(0.002) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**; aceite esencial al 50 %-DMSO $p(0.017) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**; aceite esencial al 25 %-DMSO $p(1.000) > 0.005$ **(estadísticamente no significativo)**; y posteriormente entre las distintas diluciones aceite esencial al 100 %-aceite esencial al 50 % $p(0.002) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**; aceite esencial al 100 %-aceite esencial al 25 % $p(0.000) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**; aceite esencial al 50 %-aceite esencial al 25 % $p(0.017) < 0.005$ **(estadísticamente significativo)**

CUADRO 10: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* 100 %, 50 % Y AL 25 % EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* SEGÚN ESCALA DE DURAFFOURD

Sustancia aplicar	Halo de inhibición				Total
	Nula (-)	Sensible (+)	Muy sensible (++)	Sumamente sensible (+++)	
Aceite esencial de muña al 100 %	1(6,67 %)	13(86,67 %)	1(6,67 %)	0(0 %)	15
Aceite esencial de muña al 50 %	10(66,67 %)	5(33,33 %)	0(0 %)	0(0 %)	15
Aceite esencial de muña al 25 %	15(100 %)	0(0 %)	0(0 %)	0(0 %)	15
Control negativo (DMSO)	15(100 %)	0(0 %)	0(0 %)	0(0 %)	15
Control positivo (Amoxicilina)	0(0 %)	0(0 %)	0(0 %)	15(100 %)	15
Total	41	18	1	15	75

FIGURA 05: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* 100 %, 50 % Y AL 25 % EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* SEGÚN ESCALA DE DURAFFOURD



En el cuadro 10 se organizó los resultados según la escala de medición de Duraffourd, en el que se obtuvo para el aceite esencial de muña al 100 % un 6,67 % con acción nula, un 86,67 % con acción sensible y un 6,67 % con acción muy sensible en cepas de *Streptococcus mutans*, el aceite esencial al 50 % se obtuvo un 66,67 % con acción nula y un 33,33 % con acción sensible en cepas de *Streptococcus mutans*, el aceite esencial al 25 % se obtuvo un 100 % con acción nula, al igual que el control negativo (DMSO) que se obtuvo un 100 % con acción nula, a diferencia del control positivo (amoxicilina) que el 100 % presentó acción sumamente sensible en cepa de *Streptococcus mutans*.

Al ser categorizada mediante la escala de Duraffourd como variables cualitativas se le realizó la prueba de Chi cuadrado, en donde se obtuvo un $p(0.000) < 0.005$ (**estadísticamente significativo**).

V.- DISCUSIÓN

En el estudio realizado se recolectó *Minthostachys mollis* “muña” del distrito de Huagapo ubicado en la provincia de Tarma, se tomó en cuenta estudios de Fuertes-Munguía⁹ y Cano³ de *Minthostachys mollis* por poseer mejores propiedades físico-químicas, lo que nos indicaría que el aceite esencial mejores presenta condiciones para este estudio.

El aceite esencial de muña se obtuvo fue una sustancia oleosa, color ambar, producto de la destilación de la planta (hojas) mediante el método arrastre vapor de agua, el efecto antibacteriano del aceite esencial de muña, coincide con estudios de González²¹ quien concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, siendo la CMI de 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la CMB, de 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a 0.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$; de Alcalá²⁰ concluyó que el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (al 100 %) tuvo mayor efecto contra la *Candida albicans* que el Fluconazol; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25 %, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50 %; Castillo¹⁹ concluyó que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “Muña” al 50 % y 100 % presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 255586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277; Azaña¹⁸ el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” 100 % presentó una efectividad antibacteriana, mayor en comparación a las diluciones del 50 % y 25 % frente a las cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular; Carhuapoma¹⁵ concluyó que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* es mayor que el ciprofloxacino y que se debería posiblemente a los componentes del aceite esencial; Mora¹⁶ determinó dos componentes principales son: pulegona (55.2 %) y trans-mentona (31.5 %). El aceite esencial mostró efecto inhibitorio significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella tiphy* (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$); Cano³ observó un alto efecto antimicótico

frente a las cepas de *Cándida albicans*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagophys*, *Microporun canis* a las concentraciones de 50 % y 100 % y encontró en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: pulegona, mentona y limoneno; Díaz¹³ trabajó con cepas de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Actinomyces sp.* encontrando que la bacteria más sensible fue *Fusobacterium nucleatum*, seguida del *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* con un promedio de 16.5 mm de halo de inhibición, refiere que la propiedad antimicrobiana se debería a las sustancias terpenoides presentes en el aceite esencial de *Minthostachys mollis*.; Inga⁸ demostró propiedades bactericidas/bacteriostáticas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. cereus* MC, *Salmonella typhi*, *S. sonnei* MC, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031; en contraposición de Guiza¹⁴ no encontró actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” en combinación con inactivación térmica sobre cepas de *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*. En su estudio, Salmón⁶ no obtuvo halos de inhibición con *Minthostachys mollis*, en contraposición al resto de estudios donde empleó las *E. coli* y *S. aureus*.

Se reportaron estudios de haber utilizado otros vehículos aparte del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, Paredes¹⁷ utilizó infusiones de muña combinada con té verde donde su efecto antibacteriano en bacterias de flora salival mixta fue menor que la infusión de té verde puro; Palacios¹² utilizó preparados de *Minthostachys mollis* y agua destilada, evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* de *Streptococcus orales* no obteniendo resultados positivos.

En la presente investigación se trabajó con cepa estándar de *Streptococcus mutans* principal bacteria implicada en el proceso de caries dental coincidente con Díaz¹³ González.²¹ En la prueba de susceptibilidad con las diluciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* se empleó el método de Difusión, estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados Unidos en 1966, se demuestra la gran utilidad de los ensayos *in vitro*, el cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas

en un medio sólido y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros.^{47,48}

Se empleó el método de difusión en Agar TSA con disco que contenían las distintas diluciones del aceite esencial *Minthostachys mollis* con el objetivo de comparar el efecto antibacteriano en la cepa de *Streptococcus mutans*, a diferencia de las investigaciones previas de Bravo y col.¹¹ que emplearon el método de difusión en agar con perforaciones para estudiar la presencia de Flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia millerii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Investigaciones como las de Díaz¹³, Cano³, Guiza – Rincón¹⁴ y Mora¹⁶ avalan el buen funcionamiento del método Difusión en agar con disco en trabajos similares de *Minthostachys mollis*.

En nuestro estudio; el aceite esencial de *Minthostachys mollis* en su dilución al 100 %, enfrentado con cepas de *Streptococcus mutans* presentó halos de inhibición promedio 10.79 mm de mayor diámetro en comparación con las diluciones del aceite esencial al 50 % cuyo promedio fue 7.06 mm y al 25 % no presentó halos de inhibición; de las tres sustancias estudiadas, el que obtuvo mayor diámetro de halo de inhibición fue el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 %, comparado con el control positivo (amoxicilina) cuyo diámetro 40.3 mm fue mucho menor, comparado con estudios anteriores Díaz¹³ utilizó entre otras cepas también de *Streptococcus mutans* donde obtuvo un halo de inhibición tras aplicar aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % un halo de 16.50 mm.

Para poder analizar nuestros resultados cualitativamente se tomó en cuenta los parámetros que postuló Duraffourd y col.²⁴ que se basaron en el trabajo de Lapraz que en 1979 realizó estudios estadísticos que le permitieron establecer tablas de actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a un gran número de microorganismos determinando el porcentaje de acción de los aceites esenciales diversas plantas.

En el presente estudio; el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 %, enfrentado a cepa de *Streptococcus mutans* presentó mayor efecto antibacteriano en comparación con las otras diluciones, el halo de inhibición fue

menor que el control positivo (amoxicilina), según las pautas de Duraffourd, mostró el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % un 93.3 % fue sensible (+), el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 50 % un 66.67 % fue nula (-) y el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 25 % el 100 % fue nula (-). La utilización de este análisis se basó en el estudio de Alzamora y Morales³⁹ que estudió la actividad antimicrobiana y antifúngica de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en la medicina tradicional del Perú de forma cualitativa, usando los parámetros de Duraffourd, encontrando diversa actividad antimicrobiana.

No se halló halos de inhibición mayor a 20 mm; rango correspondiente, según Duraffourd, al valor sumamente sensible (+++), ya que con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % se obtuvo como promedio 10.79 mm lo que equivale en la escala de Duraffourd sensible (+), a diferencia del estudio de Alzamora y Morales³⁹ donde determinaron halos de inhibición mayores a 20 mm.

En la presente investigación se observa, en todos los casos, que el efecto antibacteriano de tipo cuantitativa o cualitativa del aceite esencial *Minthostachys mollis* es directamente proporcional a la concentración del aceite esencial en la dilución, esto coincide con el trabajo de Azaña¹⁸ que estudiaron la actividad antimicrobiana de *Minthostachys mollis* frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular hallando una relación directamente proporcional entre la concentración y el tamaño de la inhibición; y con Alcalá²⁰ que trabajó con *Candida albicans* comparó el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 %, 50 % y 25 % con Fluconazol, concluyendo que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % presentó mayor efecto antifúngico comparado con las diluciones del 50 %, 25 % y Fluconazol representado cuantitativamente por la medición de halos de inhibición.

VI.- CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 %, presentó mayor efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans* con un halo promedio de 10.79 mm, comparado con las diluciones al 50 % y 25 %.
- Según la escala de Duraffourd, el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % presentó actividad sensible (+) en *Streptococcus mutans* .
- El control positivo (amoxicilina 25 ug) presentó mayor halo de inhibición promedio de 40.3 mm, comparado con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % cuyo promedio fue 10.79 mm, lo que indica comparado con este control presentó menor efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans*.

VII.- RECOMENDACIONES

- Se recomienda comparar efecto antibacteriano del aceite esencial y extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* en cepas de diferentes bacterias de interés estomatológico.
- Realizar estudios de comparación efecto antibacteriano del aceite esencial con diferentes especies de *Minthostachys*.
- Determinar la CMI (concentración mínima inhibitoria) cepas de diferentes bacterias de interés estomatológico.
- Realizar estudios de composición química del aceite esencial de aceite esencial de *Minthostachys mollis* de diferentes regiones del Perú para determinar el componente que produzca efecto antibacteriano en cepas de interés estomatológico.
- La preparación de productos de uso masivo tales como pastas dentales, colutorios los cuales tenga como componentes la muña.

RESUMEN

El presente trabajo se evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* en *Streptococcus mutans*, la especie vegetal se recolectó de la ciudad de Tarma (Junín) aproximadamente 8 kilos de hojas de muña, que fueron procesados para la obtención del aceite esencial, realizado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UNMSM)

Se adquirió la cepa patrón de *Streptococcus mutans*, se reactivó y sembró en placas con medio de cultivo Agar tripticase soya (TSA), se realizó las pruebas de susceptibilidad. Para estas pruebas, se prepararon diluciones del aceite esencial. Se utilizaron discos de papel de filtro estériles que fueron embebidos con 10 microlitros del aceite esencial de muña al 100 %, otros discos se prepararon con aceite esencial de muña al 50 % y 25 % utilizó como solvente y control negativo DMSO (dimetilsulfóxido), y como control positivo se utilizó discos de amoxicilina. Cada disco se colocó de manera ordenada y equidistante en el medio de cultivo; se incubó en anaerobiosis mediante el método de la vela en extinción a 37 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo se realizó la observación e interpretación de los resultados. Se realizó las mediciones de los halos de inhibición utilizando vernier. En la muestras de aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100% obtuvo promedio de 10.79 mm, aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 50 % promedio de 7.6 mm, aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 25 % promedio de 5 mm (tamaño de discos) igual que el control negativo (DMSO), el control positivo (amoxicilina) promedio de 49.3 mm. Se procesó los datos en el paquete estadístico SPSS versión 19 y se realizó el análisis de ANOVA de los datos numéricos de los halos de inhibición, se obtuvo $p (0.000) < 0.005$ (estadísticamente significativo). Se concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % comparado con el control positivo (amoxicilina) presentó menor efecto antibacteriano.

ABSTRACT

This paper antibacterial effect in vitro of the essential oil of *Minthostachys mollis* in *Streptococcus mutans* was evaluated, the plant species was collected from the city of Tarma (Junín) about 8 kilos of leaves muña, which were processed to obtain the essential oil, held at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry (San Marcos)

The pattern of *Streptococcus mutans* strain was purchased, was revived and plated in culture medium with trypticase soy agar (TSA), susceptibility testing was performed. For these tests, essential oil dilutions were prepared. Paper discs were soaked sterile filter with 10 microliters muña essential oil 100 %, other discs were prepared with essential oil muña 50 % and 25 % used as a solvent and DMSO (dimethyl sulfoxide) negative control were used, and as a positive control was used amoxicillin discs. Each disc was placed in an orderly and equidistantly in the culture medium; incubated anaerobically by the method of extinguishing the candle at 37 ° C for 48 hours. Allow time observation and interpretation of the results was performed. Measurements of inhibition zones were performed using vernier. In the samples of essential oil *Minthostachys mollis* 100 % scored average of 10.79 mm, essential oil *Minthostachys mollis* 50 % average of 7.6 mm essential oil *Minthostachys mollis* 25 % average of 5 mm (size disks) as the negative control (DMSO), positive control (amoxicillin) average of 49.3 mm. Data were processed in SPSS version 19 and ANOVA analysis of numerical data of the inhibition halos was performed, was obtained $p(0.000) < 0.005$ (statistically significant). It was concluded that *Minthostachys mollis* essential oil 100 % compared with the positive control (amoxicillin) had lower antibacterial effect.

BIBLIOGRAFÍA

1. http://www.minsa.gob.pe/porta1web/06prevención/prevención_2.asp?sub5=13 fecha de acceso 15-08-13
2. Figueroa Gordon M, Alonso Guillermina, Microorganismos presentes en las diversas etapas de la progresión de caries dental. Acta odontológica venezolana- volumen 47 N°1/2009.
3. Cano C. actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis de Maestría para Magister en recursos vegetales y terapéuticos, Lima- UNMSM, 2007.
4. Kakrani K, Nai V. Antibacterial and antifungal activity of volatile oil from the seeds of *Aglaiaodoratissima*. Fitoterapia 1982; 53: 107-109.
5. Contreras G. Actividad antimicrobiana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a bacterias enteropatógenas. Tesis para optar el Título de Biólogo UNALM. Lima 1983; 52-73.
6. Salmón L., Contribución al estudio de la especie vegetal (*Minthostachys mollis*) Kunt Griseb, (Muña) en los aspectos fitoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico., 1994; 5-15.
7. Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. Arch Pharm Res. 1998 Jun; 21(3):348-52.
8. Inga A y Guerra B. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. Tesis de bachiller para Químico Farmacéutico. Lima: UNMSM; 2000.
9. Fuertes C y Munguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Ciencia e Investigación 2008; IV (1): 23-39
10. Primo V, Rovera M, Zanón S, Oliva M, Demo M, Daghero J, et al. Determinación de La actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* Griseb Epling. Rev Argent Microbiol 2001; 33(2): 113-117.
11. Bravo O, Hernández E, Tereschuk L, Romero A, Abdala R. *Minthostachys mollis* griseb y *Lepechinia meyenii* walp epling: actividad

- antimicrobiana de sus extractos, determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. Revista del CIZAS Nov 2004; 5(1 y 2): 7-23
12. Palacios E, Mendoza A, Salcedo D. Efecto bactericida *in vitro* de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Streptococcus* orales. Instituto de Investigación Estomatológica. Lima: UNMSM; 2004.
 13. Díaz K. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis de bachiller para Cirujano Dentista, Lima: UNMSM; 2005.
 14. Guisa D y Rincón L. Estudio de efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Tesis de bachiller para Microbiólogo industrial, Bogotá, PUJ, 2007.
 15. Mario Carhuapoma, Sofía López, Mirtha Roque, Billie Velapatiño, Carlos Bell, Delia Whu, Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “ruyaq muña”, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM. Ciencia e investigación 2009;12(2)83-89
 16. Mora F. et al. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil *Minthostachys mollis* from Venezuela Andes. Natural Product Communications, Mora F. et al, 2009; 4(7): 997-1000.
 17. Ney Alberto Paredes Sampen, Efectividad antibacteriana *IN VITRO* de una infusión a base de *Camellia sinensis* y *Minthostachys mollis* sobre flora salival mixta. Tesis de bachiller para Cirujano Dentista, Facultad de Odontología-UNMSM 2009.
 18. Isaac Azaña Espinoza, Efectividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico, Tesis de bachiller para Cirujano Dentista, Facultad de Odontología-UNMSM 2010.
 19. Diana Castillo Andamayo, Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Satureja brevicallix* Epling “Muña” al 50 y 100 % comparado con Clorhexidina al 0.2 % frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, Tesis de bachiller para Cirujano Dentista, Facultad de Estomatología – Universidad Peruana Cayetano Heredia 2010.
 20. Alcalá-Marcos Katherine M, Alvarado-Gamarra A. Giancarlo, Alejandro-Paredes L Arturo, Huayané-Linares Eduardo. **Actividad**

antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el Fluconazol en cultivo de *Candida*

albicans, Universidad Nacional Federico Villarreal. CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana, vol. 16, núm. 2, 2011, pp. 83-86, Federación Latinoamericana de Sociedades Científicas de Estudiantes de Medicina Organismo Internacional

21. González Cabezas, J.; Asmat Abanto, A; Saavedra Urteaga, C. Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Streptococcus mutans* UPAO 2013, <http://www.upao.edu.pe/investigacionupao/?a=iniver9889> fecha de acceso 14-04-14.
22. <http://www.encolombia.com/odontologia/investigaciones/caries.htm> fecha de acceso 15-11-13
23. Aricapa Barrera Diana Paola, Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Bacteriología Bogotá 2009
24. Thompson W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1ª Edición. Barcelona: Editorial Blume; 1981: 119.
25. Duraffourd C, D' hervicourt L, La praz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1ª edición. París: editorial Masson SA; 1983
26. Diccionario de botánica" Editorial labor S.A. Barcelona – España. 1979.
27. Look de Ugaz, O "Investigación fotoquímica". Métodos en el estudio de productos naturales PUCP Fondo editorial 1988.
28. Strasburger E, Noll E, Schenk H. Tratado de Botánica. 7ª edición: ediciones Marín Barcelona - España 1978.
29. Augusto W. Fraccionamiento del aceite esencial de *Minthostachys mollis*(muña) y su aplicación en la inhibición del brotamiento de papa cultivar mariva. Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNALM; 1975.
30. Morales A. Estudio de la extracción y características de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y de *S. Sagittata* (hierba buena). Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNALM; 1973.

31. Marques AMC. Estudo comparativo da actividade de antimicrobiana de soluções irrigadoras à base de Clorexidina em diferentes concentrações sobre microorganismos frequentemente encontrados no canal radicular. Estudo *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia Salvador; 1997.
32. Agapito T. y Sung I. Fito Medicina 110 Plantas Medicinales. 1º edición. Lima: Editorial Isabel IRL; 2003.
33. Goldsmith J. Thorpe's Dictionary of applied Chemistry. 10º Edición. Londres: Editorial Sir Ian Heilbron; 1967(8): 658.
34. Miller E. Fisiología Vegetal. 1º Edición. México D.F.: Editorial Centro Regional de Ayuda Técnica; 1967: 111-114.
35. Meyer L. Introducción a la Fisiología Vegetal. 3º Edición. Buenos Aires: Editorial EUDEBA; 1970: 272.
36. Guenter M. The essential Oils. 1º Edición. New York: Editorial D. Van Nostrand Company; 1960.
37. Ricse C. Contribución al estudio de la esencia de *Minthostachys setosaefl.* Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNMSM; 1962.
38. Chobanu L. Variability of the composition of terpenoids for *Mentha longifolia sp.* Caucasic Brig. In ontogénesis. Mater ResPKon. Fiziol Bokhim 1976: 262-271.
39. Motle P. Proyecto de factibilidad para la instalación de una planta de extracción de aceite esencial de Menta. Tesis de bachiller. Lima: UNI; 1977.
40. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández 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; 62 (2): 156 – 161.
41. Bardales A, Yarlequé M, Rueda L. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de *Minthostachys mollis* "Muña". I Congreso Internacional de Biología - XIII Congreso Nacional de Biología- VII Simposium de Educación en Ciencias Biológicas. Lima: Perú; 1999.
42. Sotta N. Plantas aromáticas y medicinales de la región Arequipa. 1º edición. Arequipa: Editorial Akuarella; 2000: 99-100.

43. Weberbauer M. El mundo vegetal de los Andes Peruanos. 1° edición. Lima: Editorial Lumen S.A.; 1945.
44. Oviedo F. Ensayos toxicológicos preliminares con aceite esencial de 'muña'. Tesis de bachiller. Cuzco: UNSAAC; 1979.
45. Jaroslav S. Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. 1° edición. Lima: Editorial Salesiana; 1970.
46. Gibaja S. Investigaciones químicas de la muña *Minthostachys mollis*. Tesis de bachiller para el título de Químico. Lima: UNMSM; 1960.
47. Chica N, Sánchez J, Carascal K, Melgarejo M, antimicrobial activity of *Minthostachys mollis* (Lamiaceae) essential oil, APS Caribbean Division 2007; 97(7) (Suppl).
48. Oblitas E. Plantas medicinales en Bolivia: farmacopea Callaway. 2° Edición. La Paz: Editorial los amigos del libro; 1998. p. 8.
49. Agencia de cooperación técnica del Perú (ACT) del Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: Perspectivas de desarrollo en la región Los Libertadores Wari (curso regional). Ayacucho (Perú): 1999. p: 237 – 246.
50. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 1° edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999. p: 203 - 215
51. Brooks G, Butel J, Ornston N. Microbiología Médica de *Jawetz, Melnicky Adelberg*. 15° edición. México: Editorial Manual Moderno; 1996.
52. Litter M. compendio de farmacología. Editorial El Ateneo, 4° edición 1992; 681

ANEXOS

Instrumento de recolección de datos

Medición del halo de inhibición

Cuadro: Aplicación de aceite esencial de muña 100 %, 50 % y 25 %

Placa	Aceite esencial de muña 100 % (mm)	Aceite esencial de muña al 50 % (mm)	Aceite esencial de muña al 25 % (mm)	DMSO (dimetil sulfóxido) (mm)	Amoxicilina (mm)
-------	------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------	------------------

1	9,53	6,45	5	5	52,93
2	11,52	8,6	5	5	54,32
3	10,22	8,37	5	5	54,65
4	10	7,29	5	5	40,7
5	9,09	6,44	5	5	45,71
6	12,53	9,17	5	5	53,51
7	7,75	7,13	5	5	40,56
8	13,12	7,34	5	5	52,49
9	15,32	8,43	5	5	50,64
10	9,12	7,01	5	5	47,16
11	10,52	7,44	5	5	46,14
12	10,87	6,89	5	5	49,78
13	10,88	7,4	5	5	48,64
14	11,65	8,41	5	5	49,63
15	9,76	7,64	5	5	52,64

CERTIFICADO DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE SAN MARCOS



"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

CONSTANCIA N° 304-USM-2013

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **Grace Medalith HUARI GUERRERO**, de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Minthostachys*

ESPECIE: *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.

Nombre vulgar: "Muña".
Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 04 de diciembre de 2013


Dra. **HAYDEE MONTOYA TERREROS**
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

**FIGURA 1: LUGAR DE RECOLECCIÓN EN LA DISTRITO DE HUAGAPO
PROVINCIA DE TARMA**



FIGURA 2: PLANTA A RECOLECTAR MUÑA



FIGURA 3: OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*



FIGURA 4: ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*



FIGURA 5: MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

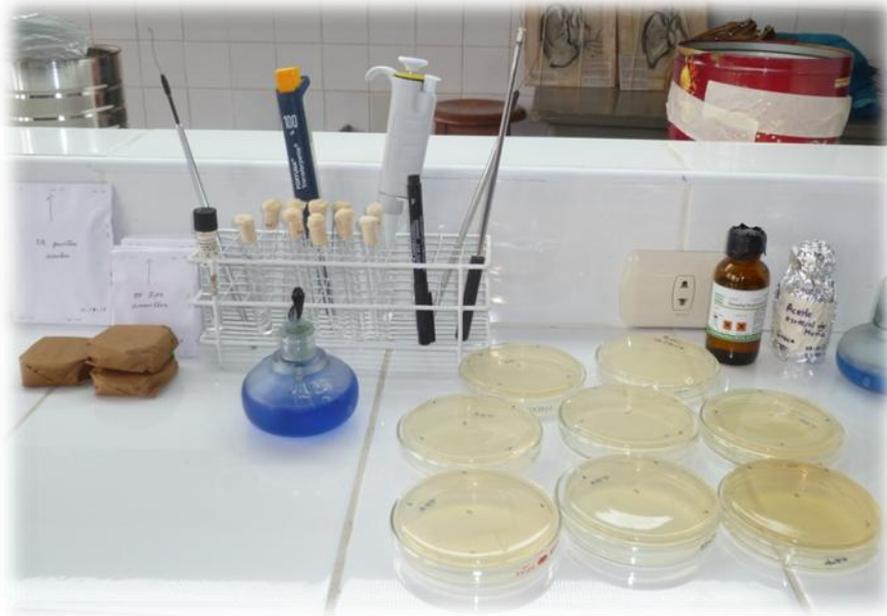


FIGURA 6: MEDIO DE CULTIVO AGAR TSA

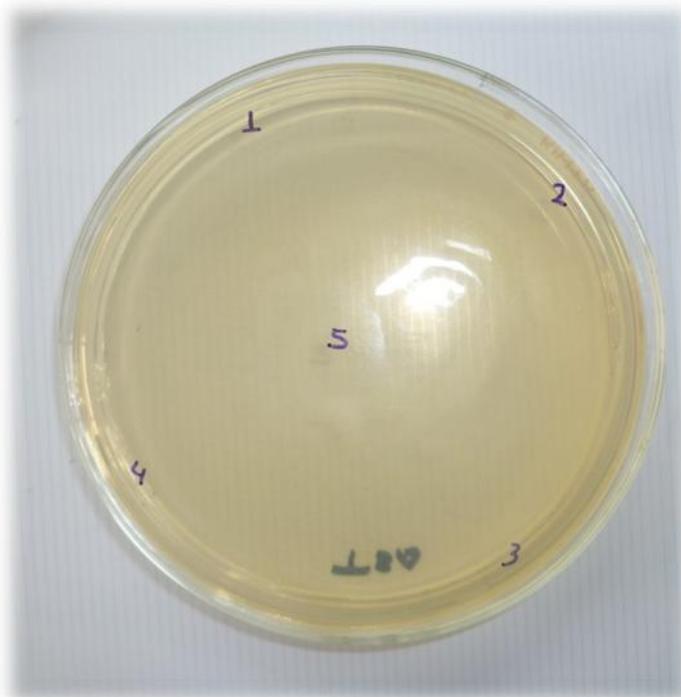


FIGURA 7: CEPA DE *Streptococcus mutans* REACTIVADA EN AGAR TSA



FIGURA 8: CEPA DE *Streptococcus mutans* COMPARADA A LA ESCALA DE MAC FARLAND AL 0.5



FIGURA 9: SEMBRADO DE LA CEPA DE *Streptococcus mutans* EN AGAR TSA



FIGURA 10: ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %, 50 % Y AL 25 %



FIGURA 11: COLOCACIÓN DE DISCOS DE PAPEL ESTÉRILES Y AMOXICILINA



FIGURA 12: PREPARACIÓN DE DISCOS CON ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %, 50 %, AL 25 %, DMSO Y AMOXICILINA

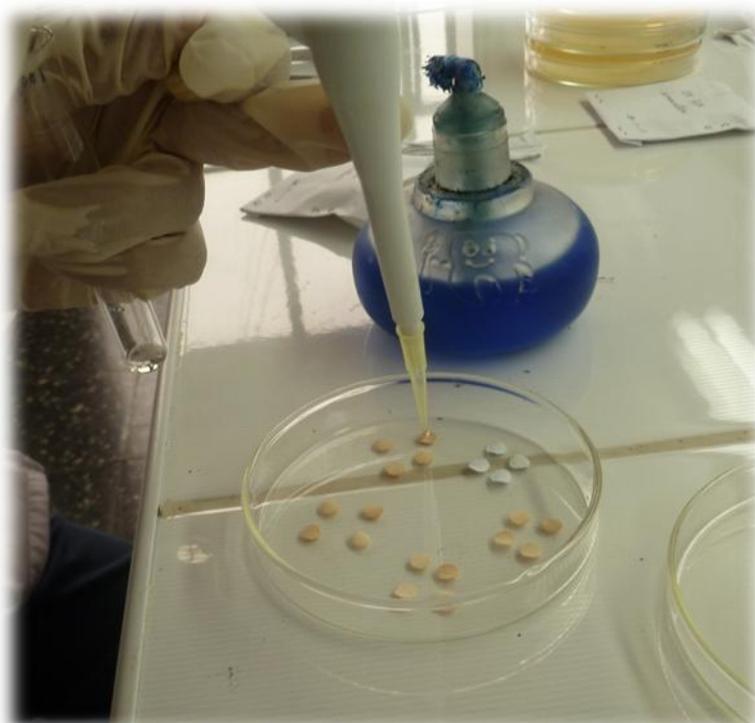


FIGURA 13: COLOCACIÓN DE DISCOS CON ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %, 50 %, AL 25 %, DMSO EN AGAR TSA CON CEPA DE *Streptococcus mutans* REACTIVADA



FIGURA 14: COLOCACIÓN DE DISCOS DE AMOXICILINA EN AGAR TSA



FIGURA 15: DISCOS EN AGAR TSA

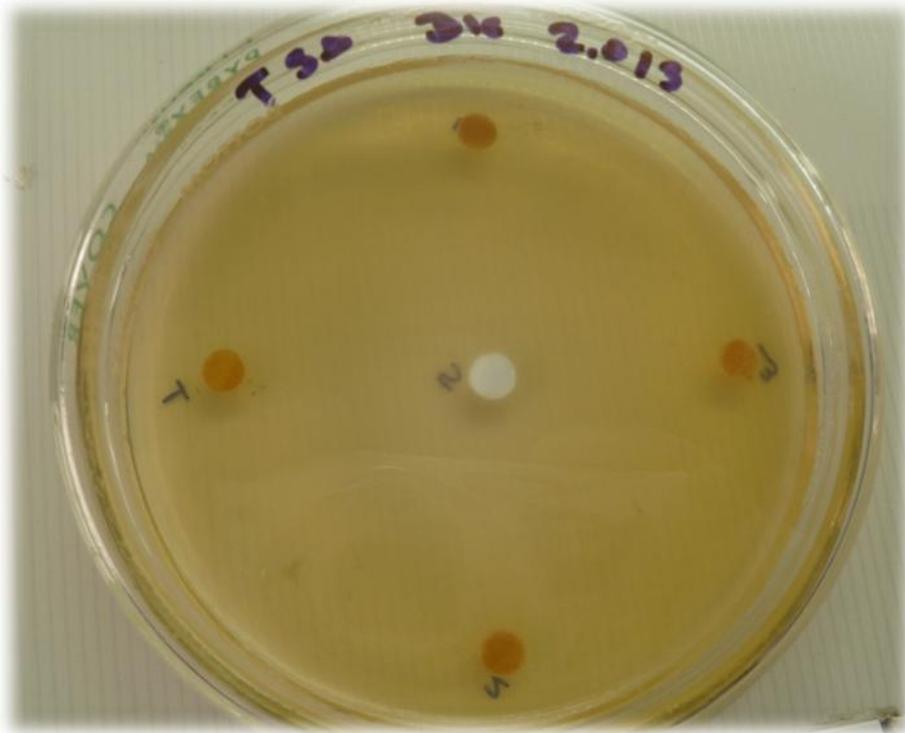


FIGURA 16: COLOCACIÓN DE PLACAS PETRI EN JARRA DE ANAEROBIOSIS



FIGURA 17: HALOS DE INHIBICIÓN DISCOS CON ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* AL 100 %, 50 %, AL 25 %, DMSO Y AMOXICILINA

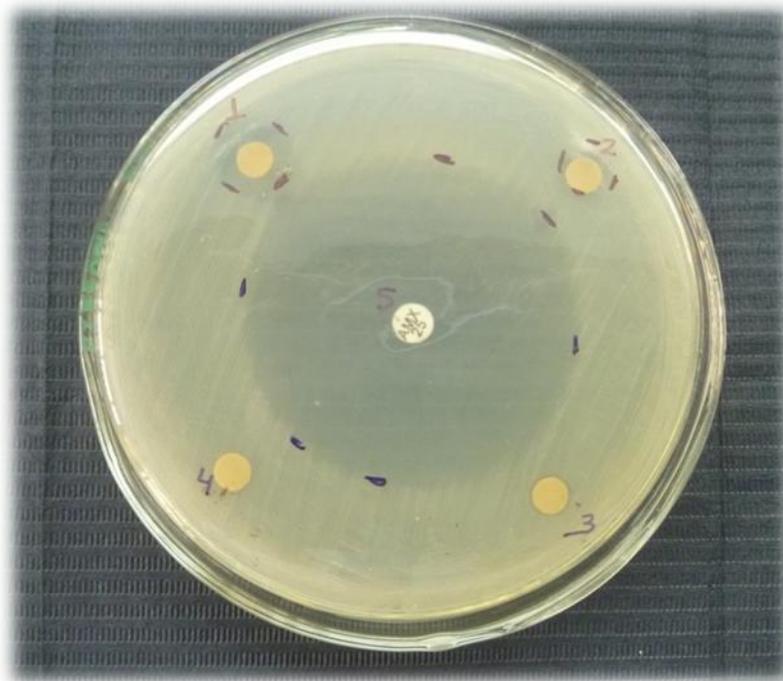


FIGURA 18: MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNMSM



FIGURA 19: MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN UTILIZANDO VERNIER



FIGURA 20: CUANTIFICACIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN UTILIZANDO VERNIER

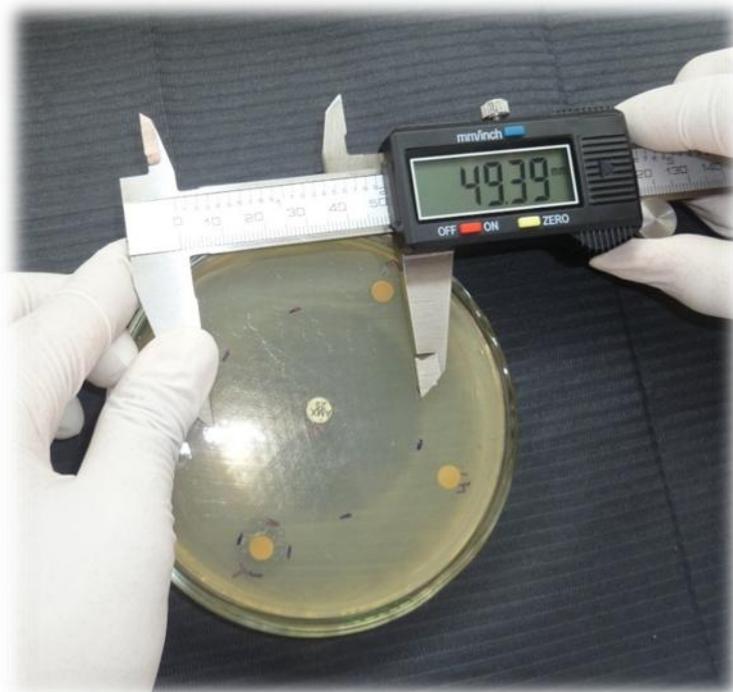


FIGURA 21: COLORACIÓN GRAM POSITIVA DE LA CEPA DE *Streptococcus mutans*



PRUEBAS FÍSICO-QUÍMICOS

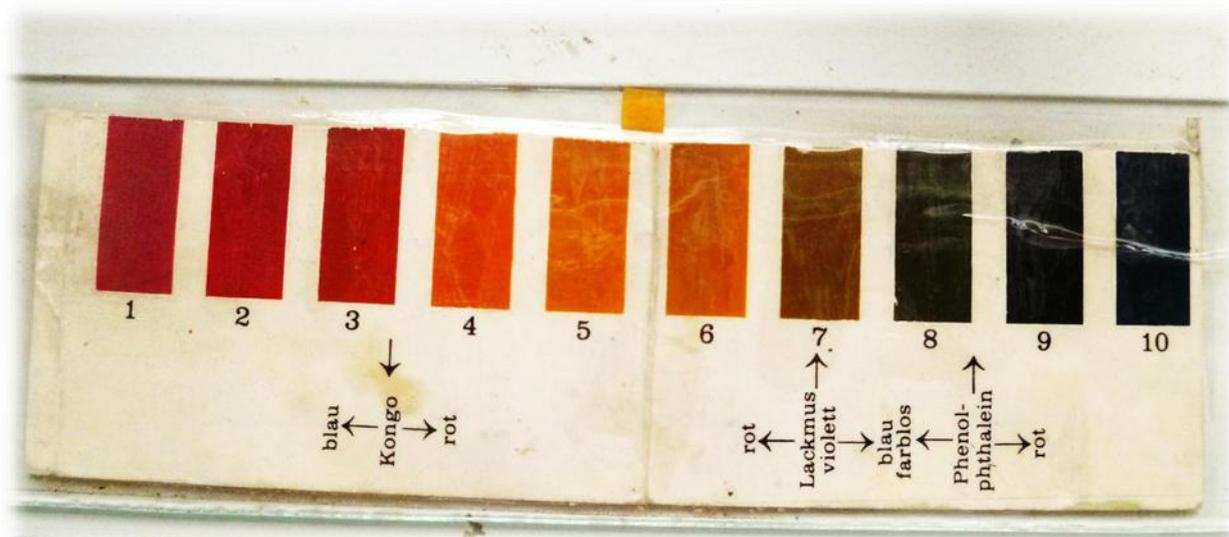
FIGURA 22: DILUCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* EN AGUA DESTILADA



FIGURA 23: DILUCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* EN SOLVENTES ORGÁNICOS



FIGURA 24: pH DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*



**FIGURA 25: PICNÓMETRO PARA DETERMINAR LA DENSIDAD DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis***

