

Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas

Antimicrobial effect of the essential oil of *Minthostachys mollis* on frequent microorganisms in the lower respiratory tract

Danny Peña S.^{1*}; Miriam Gutiérrez R.²

¹Hospital regional "Eleazar Guzmán Barrón" Chimbote-Perú

²Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Perú

*Autor correspondiente: dannyegb@yahoo.es (D. Peña)

RESUMEN

El incremento de resistencia bacteriana a antibióticos de uso rutinario, motivó la búsqueda de nuevas moléculas antibacterianas a partir de productos naturales. El objetivo del presente trabajo fue demostrar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas. De las hojas recolectadas en Huancavelica, distrito de Moya, (3000-3200 m.s.n.m.) se obtuvo aceite esencial por destilación por arrastre con vapor de agua, con rendimiento de 1,05 % v/p, densidad 0,964 g/ml, rotación óptica +2°45', índice de refracción 1,4760 y la cromatografía de gases identificó monoterpenos oxigenados, pulegona (8,82 %), mentona (5,92 %), linalol (0,46 %). La toxicidad, fue evaluada por concentración letal media (CL₅₀) en *Artemia salina*, con resultado de 2,57 µg/mL y dosis fija en ratones albinos, (DL₅₀) de 2 941,811 mg/kg, clasificándolo como ligeramente tóxica. Por disco difusión, a concentración de 50 µg/mL, presentó efecto antibacteriano em *Staphylococcus aureus* con halo de inhibición 19,3 mm y de 8,0 mm frente a *Klebsiella pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* no presentaron halos de inhibición. Se concluye que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tiene efecto antibacteriano frente a dos bacterias frecuentes en vías respiratorias bajas.

Palabras clave: *Minthostachys mollis*, aceite esencial, efecto antimicrobiano.

SUMMARY

The increase of bacterial resistance to antibiotics of routine use, motivated the search of new antibacterial molecules from natural products. The objective of the present work was to demonstrate the antimicrobial effect of the essential oil of *Minthostachys mollis* on microorganisms frequent in lower respiratory tract. From the leaves collected in Huancavelica, district of Moya, (3000-3200 masl) the essential oil was obtained by steam distillation, with a yield of 1.05% v / p, density 0.964 g / ml, optical rotation + 2 ° 45 ', refractive index 1.4760 and gas chromatography identified oxygenated monoterpenes, pulegone (8.82%), menthone (5.92%), linalool (0.46%). The toxicity was evaluated by mean lethal concentration (LC₅₀) in *Artemia salina*, with a result 2.57 µg / mL and by fixed dose in albino mice, (LD₅₀) of 2 941.811 mg / kg, classifying it as slightly toxic. By disc diffusion, at a concentration of 50 µg / mL, antibacterial effect was found against *Staphylococcus aureus* with inhibition halo 19.3 mm and 8.0 mm against *Klebsiella pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* did not present inhibition halos. It is concluded that the essential oil of *Minthostachys mollis* has an antibacterial effect against two frequent bacteria in the lower respiratory tract.

Key words: *Minthostachys mollis*, essential oil, antimicrobial effect.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAS) son enfermedades muy frecuentes, responsables de una gran morbi-mortalidad a nivel mundial, especialmente las de localización en el tracto respiratorio inferior, representadas básicamente por las infecciones bronquiales agudas y las pulmonares agudas del tipo neumónica, afectando principalmente a la población de los países en vías de desarrollo como el nuestro y siendo los niños menores de cinco años y los adultos mayores de 65 años la población más vulnerable. Las

infecciones respiratorias agudas fueron la tercera causa de muerte en adultos en los países de América Latina entre 2001 y 2003. Se estima que se diagnostican aproximadamente 2,1 millones de casos de neumonía cada año en Argentina, Brasil y Chile; (Instituto Nacional de Salud, 2016). En el Perú, las infecciones respiratorias agudas presentan una alta morbi-mortalidad, constituyéndose en un problema de salud vigente. Según la OPS/OMS (2014), en el año 2013, se presentaron más de 29000 casos de neumonía, correspondiendo el 50% a niños menores de 5 años y el 10% en los adultos mayores de 65 años; el promedio nacional de las tasas de mortalidad por neumonía en menores de 5 años fue de 13,9; las mayores tasas correspondieron a los departamentos de Puno, Loreto, Ucayali, Huancavelica, Cuzco y Huánuco; el 49% de muertes en menores de 5 años ocurrieron en la sierra, 34% en la Selva y 17% en la Costa, (OPS/OMS, 2014); el mayor porcentaje observado en estas áreas rurales, fue debido a las dificultades en el acceso a los servicios de salud y a la insuficiente cobertura de los mismos; de esta manera, si bien las neumonías de origen bacteriano, aún puede ser tratada con diferentes antibióticos, según informe de la OMS (OPS/OMS, 2014), sólo alrededor del 30% de los niños que padecen neumonía reciben los antibióticos que necesitan.

El 75% de las neumonías adquiridas en la comunidad son de origen bacteriano, causadas generalmente por el *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophyla* y enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* (Matthew, 2001). Las infecciones respiratorias, son uno de los principales motivos de consulta médica y la primera causa de prescripción de antimicrobianos, que en muchos casos conlleva al uso de fármacos de alto costo o uso prolongado debido al incremento de cepas resistentes frente a los antibióticos tradicionales.

Ambas situaciones, la baja cobertura del sector salud y la dificultad de adquirir los antimicrobianos, lleva a la población, especialmente en las zonas rurales, a recurrir a otras alternativas como la medicina tradicional, basada en el uso empírico de plantas con atributos curativos, siendo una de estas plantas, la *Minthostachys mollis* (muña), ampliamente distribuida en los valles andinos, conocida desde tiempos preincaicos por sus propiedades medicinales y muy utilizada en las serranías del Perú para el tratamiento de diversas dolencias, como problemas digestivos, de vías respiratorias, entre otros. Las plantas esbozadas como alternativa de tratamiento, constituirían un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en vías de desarrollo, al ser fuente directa de agentes terapéuticos, donde su uso constituiría una alternativa a los fármacos de síntesis en laboratorio o potenciarían la acción de los mismos.

La muña, planta nativa de la cordillera de los andes, habita en los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, teniendo un plano altitudinal de crecimiento entre 2500 y 3500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Es un arbusto de 1-1,5 metros de altura, difusamente ramificado, ramas largas apoyantes, muy foliosos, entrenudos cuadrangulares en corte transversal y huecos. Las hojas son opuestas, pecioladas, lámina simple de forma elíptica a ovoide-elíptica, pubescente y nervaduras prominentes; Inflorescencia axilar, conformada por 3-7 flores, de 4,5 – 5 mm de longitud; cáliz pubescente, corola tubular, color blanco con máculas lilas, bilabiada (zigomorfa) androceo formado por cuatro estambres adheridos a la corola, más cortos que la longitud de ella. (Galán y Sánchez, 2016). Posee buen grado de tolerancia a las sequías ya que es capaz de desarrollarse en las laderas con escasez de recurso hídrico (Vega-Portocarrero y López-Malo, 2009).

Desde la antigüedad, las plantas y sus derivados, como los aceites esenciales, se han utilizado en la medicina popular; los aceites esenciales son productos naturales producidos por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios y están presentes como mezclas variables de terpenoides, especialmente monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}) pueden estar presentes diterpenos (C_{20}); estas plantas también producen una diversidad de otras moléculas como alcoholes, aldehídos, ácidos, hidrocarburos alifáticos, ésteres acíclicos o lactonas (Nazzaro et al., 2013).

Desde el punto de vista farmacológico, las propiedades de los aceites esenciales son muy variadas debido a la heterogeneidad de sus componentes químicos presentes y es muy probable que su acción antimicrobiana no sea atribuible a un único mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula; en las bacterias Gram (+) y Gram (-) sensibles, uno de los principales mecanismos de acción conocidos es que los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial alterando su estructura y haciéndolos más permeables, como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y otros contenidos celulares de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular (Zecaria, 2007).

El presente estudio tiene como objetivo iniciar la búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas a partir de productos naturales, siendo la *Minthostachys mollis* (muña), una alternativa en el tratamiento de las enfermedades respiratorias de origen infeccioso o que pueden coadyuvar en el tratamiento de las mismas, validando de esta manera su uso popular.

Se ha reportado en diversos estudios realizados en esta planta, como poseedora de propiedades

antimicrobianas (Alaba y Jiménez, 2016) y antifúngicas, atribuido a la presencia de un grupo de terpenoides, sesquiterpenos y posiblemente diterpenos presentes en sus aceites esenciales (Cano, 2007); de igual manera Fuertes y Munguía (2011) en su estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* de tres regiones peruanas, determinaron su composición química, encontrándose componentes comunes como pulegona, mentona y linalol entre otros; estos componentes fácilmente podría relacionarse con sus propiedades biológicas y farmacológicas (Torre Negra et al., 2016). El efecto antibacteriano de los aceites esenciales se debería a la presencia de compuestos oxigenados (cetónicos, aldehídicos y alcoholes) y presencia de fenoles; de igual manera Gómez-Sánchez A. y López- Malo A. (2009) mencionan que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es debida al carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos que contienen. Camacho (2011) y Carhuapoma (2007), concluyeron que el aceite esencial de la “muña” representa una mayor fuente de compuestos fenólicos como isomentona, pulegona, timol y carvacrol, metabolitos bactericidas de primer orden.

Existen investigaciones que han demostrado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, como es el trabajo de Carhuapoma et al. (2009), quienes validaron la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial, demostrando en forma cuantitativa su efecto antimicrobiano frente a cuatro cepas Gram (-) como *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella tify* y *Pseudomona aeruginosa*. Camacho (2011), en su estudio sobre el efecto antibacteriano de la muña (*Minthostachys setosa*) concluyó que el aceite esencial tiene actividad sobre bacterias como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans*; de igual manera Torre Negra et al., (2016) confirmaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Scherichia coli*.

La mayoría de trabajos de investigación se centran en bacterias que habitan el aparato digestivo, no encontrando estudios similares en relación a vías respiratorias, lo que motivó el presente trabajo de investigación, cuyo objetivo fue determinar el Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) sobre microorganismos frecuentes en las vías respiratorias bajas; para ello previamente, se determinó las características organolépticas y principales constantes físicas por métodos instrumentales: densidad por picnometría, índice de refracción por refractometría, rotación óptica por polarimetría; luego se efectuó la caracterización del aceite esencial, para identificar los grupos funcionales de tipo alcohol y cetónico como parte de sus metabolitos secundarios con actividades antimicrobianas de primer, segundo y tercer orden (Carhuapoma, 2007), así como el nivel de toxicidad sobre especies animales, que incluyeron la dosis letal media (DL₅₀) en ratones albinos como valor más representativo de la toxicidad aguda de una sustancia y la concentración letal media (CL₅₀) en *Artemia Salina*, como prueba preliminar para evaluar la citotoxicidad del aceite esencial; finalmente se realizó el ensayo in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial frente a las bacterias frecuentes en las vías respiratorias bajas como: *Estreptococcus pneumoniae*, *Haemophylus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio experimental, prospectivo y longitudinal

2.1 Objeto de estudio

El objeto de estudio del presente trabajo, fue determinar in vitro la capacidad antimicrobiana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre cultivos de microorganismos causantes de las infecciones respiratorias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophylus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*; la actividad antibacteriana fue evaluada a través de la medición y comparación de los halos de inhibición en el crecimiento bacteriano y como indicadores de la capacidad del aceite esencial de frenar el crecimiento del microorganismo a diferentes concentraciones; de acuerdo al tamaño de los halos de inhibición, se determinó la mayor o menor actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones del aceite esencial sobre las bacterias o población en estudio, a los cuales se les evaluó siguiendo los criterios de la escala de Duraffourd, que considera una actividad nula (-) si el halo es inferior o igual a 8 mm, sensibilidad límite (sensible = +) con un halo de 9 a 14 mm, sensibilidad media (muy sensible = ++) con un halo de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

Los conocimientos insuficientes sobre las plantas medicinales, en sus aspectos fisiológicos, fisiopatológicos, farmacológicos y clínicos constituyen una de las principales limitaciones, pero a su vez, incentivan su estudio desde un nivel científico y farmacológico, fuera del empirismo y sus imprecisiones, para demostrar la actividad y propiedades de sus extractos totales o de algunos de sus constituyentes y buscar las formas galénicas más apropiadas para su uso.

2.2 Instrumentos y equipos de laboratorio

- De uso de laboratorio: se utilizaron materiales de vidrio y plástico en condiciones asépticas: probetas, balones de 250 mL y 500 mL, matraces, beaker, refrigerantes de liebig y vigreux, pera de decantación, tubo N° 0.5 de la escala de Mac Farland, jarra de anaerobiosis, campana de vidrio para micro anaerobiosis, placas Petri, micropipetas y estufa.
- Balanza electrónica HENKEL 1200 gr/0,1gr: para pesar los ratones en los ensayos de toxicidad del aceite esencial.
- Equipo de destilación (cámara extractora, condensador): extracción del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis*.
- Refrigeradora: para refrigerar las cepas puras de las bacterias adquiridas que requerían temperaturas entre 4 - 8° C y también para conservar el aceite esencial obtenido de la destilación a 4° C evitando su oxidación.
- Incubadora Memmert: secado de placas petri por 20 minutos previo a la preparación del agar tripticasa soya, utilizada en la reactivación de las cepas puras de las bacterias, evitando el agua o formación de vapor.
- Refractómetro Mettler Toledo: medir el índice de refracción del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, obtenido por destilación.
- Estufa de 50° MELAG TYP A: incubación de las placas Petri inoculadas con las cuatro bacterias del ensayo
- Cromatógrafo de gases modelo: GC-2010 Shimadzu, inyector: AOC-20i Shimadzu, con columnas capilares 5 % diphenyl-95 % dimethyl polysiloxane (30 m x 0,25 mm ID, 0,5 µm de espesor): identificar los componentes mayoritarios del aceite esencial.
- Reactivos utilizados: Dimethyl sulfóxido (CH₃)₂SO D128-1
- Medios de cultivo liofilizados
- Agar tripticasa soya
- Agar sangre
- Agar Müller Hinton
- Agar Chocolate
- Cepas puras de bacterias liofilizadas

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC referencia 49619
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC referencia 25963
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC referencia 700603
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC referencia 49766

2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.3.1 Obtención de la muestra vegetal:

La recolección se realizó de los cerros y laderas del distrito de Moya, provincia de Huancavelica a 3162 m.s.n.m., en el mes de Febrero del año 2014, época de floración de la planta, donde crece en forma natural; recolectándose en las primeras horas de la mañana para evitar la humedad de la lluvia y el calor del sol que podrían deteriorar la planta. Se utilizó como muestra las hojas frescas que fueron separadas de las ramas y tallos de la planta de *Minthostachys mollis*, (muña) conservándose a una temperatura entre 25° a 30°C sin desecar, almacenándose un día para luego iniciar la extracción del aceite esencial. La determinación taxonómica del espécimen vegetal fue realizada en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.3.2 Obtención del aceite esencial de la especie vegetal

Se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo, por el método de destilación de arrastre con vapor de agua, por ser el más adecuado para la obtención de aceites esenciales, con la finalidad de separar los principios volátiles contenidos en la muestra.

Procedimiento: Se colocó el agua destilada en el matraz N°1 como generador de vapor; en el matraz N° 2 se colocó las hojas frescas de *Minthostachys mollis* en forma fraccionada hasta completar 2200gr.; el matraz N°1 se llevó a ebullición con el fin de generar vapor que pasó al matraz N° 2, procedimiento que logró la extracción del aceite esencial, el cual fue arrastrado junto con el vapor de agua hacia un condensador que

enfrió la mezcla. Debido a su propiedad de inmiscibilidad y diferencia de densidades, el aceite esencial obtenido se separó del agua mediante una pera de decantación; finalmente se agregó sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4 al aceite como secante para eliminar las trazas de agua; el aceite esencial obtenido fue envasado en frascos de vidrio color ámbar y conservados a una temperatura de 4°C en oscuridad (Chaquilla et al., 2012) durante el tiempo que duró la investigación para evitar su oxidación y volatilización.

2.3.3 Análisis cromatográfico de gases del aceite esencial:

Se analizó en el Instituto de Investigación de Agroindustria de la Universidad Nacional del Santa-Chimbote y basado en el tiempo de retención a una temperatura y presión determinadas, usando gas transportador helio y T° detector a 270°C, y mediante estándares, permitió determinar la composición cuali-cuantitativa de tres monoterpenos: Pulegona, mentona y linalol.

2.3.4 Evaluación de la actividad citotóxica en *Artemia salina* por el método de anderson, Meyer Y Thompson (CYTED, 1995:214-225).

Materiales:

Erlenmeyer, tanque de oxígeno, focos de luz, huevos de *Artemia salina*

Metodología

Según la técnica estandarizada por la CYTED-1995; los huevos de *Artemia salina* facilitados por el Laboratorio de la Escuela de Biología en Acuicultura de la Universidad Nacional del Santa-Chimbote.

Día 1. Preparación agua de mar artificial 3,8 gr de sal de mar comercial en 100 mL de agua destilada, procediéndose a filtrar; se introdujo 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un erlenmeyer con 350 mL de agua de mar dejando eclosionar a temperatura ambiente durante 48 horas bajo régimen de luz continua con flujo constante de aire para facilitar la eclosión.

Día 2. Transferencia de la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con agua salina fresca.

Día 3. Preparación de 20 mg de aceite esencial de *Minthostachys mollis* en 2 ml de disolvente (0,5 mL de DMSO y 1,5 mL de agua destilada); a partir de esta solución se preparó diluciones de 0,1, 0,5, 1, 5, 10 y 100 ppm, transfiriendo a cada vial 0,05, 0,25, 0,5, 2,5, 5 y 50 μL de las diluciones, empleándose 3 viales por cada concentración incluyendo los controles que contenían todos los elementos del ensayo a excepción de la muestra (total 21); a cada vial se agregaron 10 nauplios de *Artemia salina* (30 nauplios por cada dilución) y luego se adicionó las diluciones del aceite esencial, se agregó agua de mar hasta completar 5 mL por vial, agregándole además una gota de suspensión de levaduras (3 mg de levaduras seca disuelto en 5 mL de agua de mar), como alimento.

Día 4. Después de 24 horas se contó y anotó el número de sobrevivientes y muertos en cada dilución, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por el método de los probits para determinar la concentración letal 50 (CL_{50}).

2.3.5 Evaluación de la toxicidad aguda por el método de dosis fija (Arencibia et al., 2009, Carhuapoma, 2007:24).

Se emplearon ratones albinos, con peso promedio: 20 y 24 gr., formándose grupos de 6 ratones, debidamente identificados para su correcta dosificación.

Su alimentación consistió en ratonina peletizada y agua a voluntad, fueron mantenidos a una temperatura ambiente de 20 a 22°C.

El aceite esencial se administró por vía oral mediante cánula intragástrica en ayunas de cuatro horas, se suministró dosis de 2250 mg/kg, 2500 mg/kg, 2750 mg/kg, 3000 mg/kg, 3250 mg/kg, 3500 mg/kg y 3750 mg/kg para determinar la dosis letal media (DL_{50}); también se consideró un grupo control al que se le suministró agua destilada, siendo observados durante las primeras 24 horas, luego diariamente por 14 días, anotándose cualquier reacción o síntoma tóxico manifestado. Después de los 14 días se sacrificó al animal efectuándose el examen macroscópico de órganos y tejidos, se realizó el examen anátomo-patológico de los órganos, (cerebro, hígado y riñón) de uno de los ratones al que se le suministró la mayor dosis y a un ratón del grupo control, a fin de comparar las diferencias macroscópicas e histológicas. La dosis letal media (DL_{50}) fue determinada mediante el método estadístico de los probits.

2.3.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Sacsquispe y Velásquez, 2002:18,19).

Obtención de los microorganismos

Se utilizaron cepas estándar ATCC de cuatro especies bacterianas frecuentes en vías respiratorias bajas, (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 25963, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Haemophilus influenzae* ATCC 49766), adquiridas en el Laboratorio GenLab® del Perú S.A.C.

Reconstitución de las cepas estándar ATCC

Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio COLECBI S.A.C. Corporación de Laboratorios de Ensayos Clínicos, Biológicos e Industriales, acreditado por INDECOPI con Registro N° LE-046 ubicado en el distrito de Nuevo Chimbote, con domicilio en la Urb. Buenos Aires Mz. A Lote 7- I Etapa.

Las cepas ATCC estuvieron en refrigeración (2°-8° C) desde el momento de su adquisición hasta la reactivación de las mismas. Las cepas liofilizadas contenidas en sus respectivos envases Kwik-Stick , se retiraron y siguiendo las instrucciones del fabricante para su reconstitución se procedió al sembrado: el *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* fueron sembradas en placas que contenían el medio de cultivo enriquecido tripticasa soya (TSA), previamente secadas en la estufa por 20 minutos para eliminar la humedad, el *Streptococcus pneumoniae* fue sembrado en agar sangre y el *Haemophilus influenzae* en agar chocolate; las cepas reconstituidas fueron llevadas a la incubadora a 37° por 24 horas y en el caso del *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* se colocaron previamente en la jarra de anaerobiosis para ser colocados en la incubadora a 37° por 24 horas.

Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer (Sacsquispe y Velásquez, 2002:18,19), (Taroco et al., 2008:666)

Procedimiento: Se preparó el medio de cultivo con agar Müller Hinton y se plaqueó en placas Petri (15cm x 5mm), se enfrió y se solidificó; paralelamente se preparó el inóculo bacteriano con las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*; en 10 mL de solución salina al 0,9 % colocados en un tubo de ensayo, se introdujo dos colonias de la bacteria, logrando una turbidez equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de Mac Farland (1,5 x 10⁸ UFC/mL). Se realizó la siembra en las placas con agar Müller Hinton por diseminación con un hisopo estéril embebido en la solución que contenía el inóculo, dejando secar cinco minutos, para luego, utilizando pinza estéril, colocar equidistante 6 discos de papel de filtro estériles (0,6 mm de grosor x 6 mm de diámetro), embebidos con 50 µL de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Minthostachys mollis*, el cual fue diluido con dimetilsulfóxido (DMSO) obteniéndose concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL; así mismo se utilizó como control negativo, discos embebidos en agua destilada y como control positivo discos de sensibilidad de amoxicilina con ácido clavulánico; este procedimiento se realizó por triplicado para validación de los resultados.

Los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, fueron llevados a la incubadora a 36° x 24 horas; el *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, fueron llevados en jarra de anaerobiosis en presencia de CO₂ 10% a 36° x 24 horas, por ser éstas bacterias anaerobias facultativas; transcurrido el período de incubación se observó las zonas de inhibición procediendo a registrar la medición de halos.

Análisis estadístico de resultados

Para el análisis de la dosis letal media (DL₅₀) y concentración letal media (CL₅₀) se utilizó el modelo de regresión Probit, utilizando el software SPSS versión 21 y para la determinación del efecto antimicrobiano se realizaron los análisis de varianza al 95 % de confianza; se utilizaron las hojas de cálculo Excel, se compararon las medias de los tratamientos sobre cada patógeno en donde se encontraron actividad antimicrobiana. Los resultados generales fueron detallados a partir de los promedios obtenidos de las evaluaciones de los halos de inhibición (mm) de tres repeticiones por tratamiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muchos trabajos de investigación han demostrado las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, sobre diferentes bacterias; estos hallazgos ha despertado el interés de realizar estudios sobre su efecto en bacterias frecuentes en las vías respiratorias bajas, causantes de las infecciones

respiratorias consideradas como patologías de alta prevalencia.

Las principales características organolépticas del aceite esencial de hojas frescas de *Minthostachys mollis* “muña”, en cuanto al aspecto se observó un líquido fluido, translúcido, de color amarillo limón, con olor intenso a mentol y sabor picante; estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos de investigación como Cano (2007), Fuertes y Munguía (2001) y Carhuapoma (2009); sin embargo, Castro (2012) obtuvo diferentes resultados en cuanto al color, ligeramente translúcido y olor a menta ligeramente atractivo, esto se debería a que este autor efectuó la extracción del aceite esencial de las hojas secas de la planta.

El rendimiento porcentual obtenido del aceite esencial fue de 1,05%, lo cual no es despreciable, si lo comparamos con los resultados obtenidos por Castro (2012) que obtuvo un rendimiento de 0,267%, Torre Negra et al., (2016) 0,6%, Camacho (2011: 83) 1,062% y Carhuapoma et al.,(2009) 2,4%, pudiendo haberse obtenido mayor porcentaje si la extracción se hubiese realizado de las hojas secas de la planta, ya que según Yáñez (2011), el tratamiento de secado de la hoja de la planta, favorece la extracción del aceite esencial permitiendo obtener mayores rendimientos.

La densidad de 0,9640 a 20°C y el índice de refracción de 1,4760 a 20°C fue ligeramente elevado en comparación con los resultados reportados por Cano (2007), Fuertes y Munguía (2001), lo que ya nos indica la presencia de sustancias oxigenadas aromáticas o alicíclicas, como lo mencionado por Agrelo de Nassif et al., (2004), “los altos valores de densidad e índice de refracción de la esencia directa, denotan un alto contenido en compuestos oxigenados”, el aceite esencial del presente trabajo tendría alto contenido de compuestos oxigenados lo que le proporcionaría considerable actividad biológica.

En el análisis de la composición química del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, por cromatografía de gases se identificaron componentes mayoritarios como pulegona (8,82%), mentona (5,92%) y linalol (0,46%) (tabla N° 1), existiendo semejanzas con otros trabajos de investigación en cuanto a los componentes químicos del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, pero con diferentes porcentajes, como los obtenidos por Cano (2007), Fuertes y Munguía (2001), Camacho (2011) y otros, estas diferencias de porcentajes se debería a diversos factores, como lugar de procedencia de la muña, sub especie, época de recolección, tiempo transcurrido entre la obtención y análisis de la muestra, por ser componentes volátiles.

En el ensayo de letalidad sobre larvas de *Artemia salina*, utilizada como prueba preliminar para evaluar sustancias citotóxicas o antitumorales (Gutiérrez et al., 2007) se encontró una concentración letal media (CL₅₀) de 2,570 µg/mL, (tabla N°2) que lo ubica como sustancia citotóxica, y según lo expresado por “Moreno et al., (2006), un aceite esencial es considerado potencialmente citotóxico cuando su CL₅₀ es ≤ que 30 µg/mL”.

La dosis letal media (DL₅₀) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, realizada en ratones *Mus musculus* var. Albinus, fue de 2 941,811 mg/kg catalogado como ligeramente tóxica, siguiendo el criterio de toxicidad aguda de sustancias de Williams, que califica como sustancias ligeramente tóxicas aquellas cuyos valores de dosis letal media (DL₅₀) sean menores de 5000 mg/kg. (Arroyo y Cisneros 2012). Si se compara con otros aceites esenciales como el de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), estudiado por Huamán et al., (2003) que obtuvo una dosis letal media (DL₅₀) de 1,755 mg/kg y el de *Satureja brevicalyx*, (urqu muña) estudiado por Carhuapoma (2007) con una dosis letal media (DL₅₀) de 655,263 mg/kg, se puede concluir que el resultado obtenido de la “muña” en el presente trabajo, indica una menor toxicidad, es decir, que para producir la muerte del 50% de ratones, de acuerdo al resultado obtenido, (tabla N°3) se necesitó una dosis mayor que las utilizadas por los autores mencionados, confirmando la menor toxicidad del aceite esencial de la muña del presente trabajo. Esta baja toxicidad, podría deberse a que uno de sus componentes químicos como la pulegona presentó una proporción menor de 8,82%, en comparación con la pulegona de otros estudios como *Minthostachys mollis* 9,84%, *Satureja brevicalyx* 27,2%. Sobre este hallazgo, Agrelo de Nassif et al., (2004), señala que la pulegona tiene marcada acción abortiva y hepatotóxica, usada desde la antigüedad para favorecer el parto y expulsar la placenta.

El aceite esencial de *Minthostachys mollis*, presentó efectos antibacterianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* a una concentración de 50 µg/mL, evidenciándose por la formación de halos como expresión de la inhibición del crecimiento bacteriano; la amoxicilina + ácido clavulánico, que es el fármaco más utilizado contra esta bacteria, fue utilizado como control en el presente trabajo, inhibió el crecimiento bacteriano a una concentración de 30 µg/mL, observándose que el estándar tiene mayor efecto que el aceite esencial. El efecto antimicrobiano del aceite esencial en estudio se debería a la presencia de compuestos de tipo fenol, (Yapuchura, 2010), alcohol (como el linalol) y cetónico (como la pulegona y mentona) que actuarían en sinergismo con el resto de componentes. (Carhuapoma, 2007), (Gómez-Sánchez y López- Malo, 2009).

Alaba y Jiménez (2016), demostraron mediante ensayos in vitro, que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* puro y diluido al 50% presentaron efectividad antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, con halos de inhibición de 11mm y 8mm, de igual manera Carhuapoma (2009) determinó el efecto antibacteriano de *Minthostachys mollis* de cuatro cepas de bacterias Gram (-), con halos de inhibición de 11,45 mm a 21,41 mm; el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” en el presente estudio formó un halo de inhibición de 19,3 mm para el *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram (+) clasificado según la escala de Duraffourd como efecto inhibitorio Medio (muy sensible=++) y para la *Klebsiella pneumoniae* bacteria Gram (-) un halo de inhibición de 8,0 mm, clasificado en la escala de Duraffourd como sensibilidad límite (sensible =+) (Duraffourd, et al., 1987); en la tabla N° 4 se muestran los halos de inhibición, donde se observa claramente la mayor actividad del aceite esencial de la “muña” en la bacteria Gram (+) y menor actividad contra la bacteria Gram (-) a nivel de vías respiratorias bajas, probablemente debido a su naturaleza patógena; se observó además un mayor halo de inhibición en el ensayo al incrementar la concentración del aceite esencial, (tabla N° 4), así con 300 µg/ml, se obtuvo un halo de inhibición de 35,7 mm en el *Staphylococcus aureus* y un halo de inhibición de 23 mm en la *Klebsiella pneumoniae*, lo que no solo estaría confirmando su actividad antibacteriana en esta investigación, sino se evidencia su amplio espectro de acción al inhibir el crecimiento de cepas Gram (+) y Gram (-); este efecto también ha sido reportados por otros autores como Camacho (2011), Coy y Acosta (2013) quienes evaluaron la actividad antibacteriana in vitro de los aceites esenciales de *Rosmarynus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a cepas Gram (+) y bacterias Gram (-), en la que *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo más sensible con porcentajes de inhibición de 60 y 70 %, coincidiendo con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, que presentó un mayor halo de inhibición frente al *Staphylococcus aureus* de 19,3 mm a una concentración de 50 µg/ml y menor halo de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae*; si hay similitudes en cuanto al efecto antibacteriano, se observa diferencias en los tamaños de los halos entre ambos estudios que podría deberse a la concentración de la muestra, métodos utilizados, medios de cultivo, vigencia del aceite esencial, composición química, edad del inóculo, condiciones de incubación entre otros.

Generalmente, los aceites que poseen propiedades antimicrobianas, contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el carvacrol, el timol y el eugenol; el carvacrol y el timol son capaces dependiendo de la concentración de inclusión, de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram (-), el eugenol (componente mayoritario del aceite del clavo) y el cinamaldehído (componente de la canela) actúan inhibiendo la producción de enzimas intracelulares tales como, amilasas y proteasas lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular (Zecaria, 2007).

Otros autores han propuesto que los componentes de los aceites esenciales actúan de diferentes maneras para dar lugar a la pérdida de viabilidad microbiana. Los efectos del aceite esencial generalmente conducen a la desestabilización de la bicapa de fosfolípidos, la destrucción de la función y composición de la membrana plasmática, la pérdida de componentes intracelulares vitales y la inactivación de mecanismos enzimáticos, en algunos casos alteran la permeabilidad de la membrana al destruir el sistema de transporte de electrones; una serie de componentes de los aceites esenciales como el timol y el carvacrol conducen a un aumento de la concentración intracelular de ATP, un evento que está vinculado a la destrucción de la membrana microbiana. La inhibición del transporte de electrones para la producción de energía y la interrupción de la fuerza motriz del protón, la translocación de proteínas y la síntesis de componentes celulares, son todos los cambios fisiológicos que puede dar lugar a la lisis celular y muerte, (Nazzaro et al., 2013).

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, no mostró actividad frente al *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophylus influenzae* debido a que no hubo formación de halos (tabla N° 4) lo que demuestra resistencia de estos microorganismos frente al aceite esencial.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, así como similares trabajos realizados con anterioridad, demuestran las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, por lo que a corto plazo podría ser utilizado para la formulación de nuevos fármacos con amplio espectro, menor costo y más accesible a las poblaciones más alejadas de nuestra serranía, donde las necesidades básicas insatisfechas son altas; por tanto, la especie vegetal de *Minthostachys mollis* podría ser considerado como un aporte a un problema de salud.

Finalmente, es importante señalar las limitaciones en el presente estudio; la falta de equipos de alta tecnología para obtener información estructural e identificación química de los componentes del aceite esencial, como es el espectrómetro de masa (GC-MS), Infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (NMR) y la inadecuada implementación de reactivos y/o insumos, dificultaron la realización de la totalidad de los ensayos; cabe destacar la disponibilidad y apoyo de los profesionales docentes en el desarrollo del ensayo, por lo que de haberse contado con la logística necesaria para la ejecución del estudio, se hubiera podido profundizar la investigación como son los estudios de eficacia, para la valoración del interés terapéutico en

relación con su seguridad, mecanismo de acción de los componentes químicos antimicrobianos del aceite esencial y otros.

Tabla N° 1. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” identificados por cromatografía de gases.

Minutos	Tiempo de retención	
	Compuesto	%
26,617	Linalol	0,46
27,801	Mentona	5,92
28,822	Pulegona	8,82

Tabla N° 2. Concentración letal media (CL₅₀) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* en larvas de *Artemia salina*

Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> Concentración (µg/mL)	Concentración letal media CL ₅₀ (µg/mL)
0,1	
0,5	
1	
5	2,570
10	
100	

Tabla N° 3. Dosis letal media (DL₅₀) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” en *Mus musculus* “ratón” var. Albinus

Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Concentración mg/kg)	Dosis letal media (DL ₅₀)
2250	
2500	
2750	
3000	2 941,811
3250	
3500	
3750	
Testigo (agua destilada)	

Tabla N° 4. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

Concentración aceite esencial (ug/mL)	Halos de inhibición (mm)			
	<i>Stafilococcus aureus</i> *	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
50	19,3	8,0	0,0	0,0
100	23,7	18,0	0,0	0,0
150	24,3	17,7	0,0	0,0
200	26,3	20,3	0,0	0,0
250	30,0	21,7	0,0	0,0

Concentración aceite esencial (ug/mL)	Halos de inhibición (mm)			
	<i>Stafilococcus aureus*</i>	<i>Klebsiella pneumoniae*</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
300	35,7	23,0	0,0	0,0
Amoxicilina/clavulánico (30 ug/mL)	35,00	14,00	0,0	0,0
Agua destilada	0,0	0,0	0,0	0,0

*El análisis de varianza para comparar los promedios de halos de inhibición por dosis sólo se realizó con aquellas bacterias que mostraron inhibición frente al aceite esencial.

4. CONCLUSIONES

Las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”, tuvo un rendimiento de 1,05 % de aceite esencial, presenta compuestos oxigenados como la pulegona 8,82 %, mentona 5,92 % y linalol 0,46 %.

En el ensayo de citotoxicidad presentó una concentración letal media (CL₅₀) de 2,570 µg/mL, dosis letal media (DL₅₀) de 2 941,811 mg/kg calificada como ligeramente tóxica.

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, tiene diferente acción antibacteriana frente a los patógenos más comunes de las vías respiratorias bajas, mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus*, mediana actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* y nula actividad sobre *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” debido a sus propiedades antimicrobianas, podría ser utilizado para la formulación de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Microbiólogo Ángel Gustavo Vargas Ramos, Director de la Corporación de Laboratorios de ensayos clínicos, biológicos e industriales COLECBI, por su apoyo desinteresado en la realización de mi trabajo de tesis en su Laboratorio de microbiología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrelo de Nassif, A.; Ricciardi, G.; Torres, A.; Ricciardi, A.; 1994. Aceite esencial de *Mentha pulegium*. Laboratorio Dr. Gustavo A. Fester- Facultad de Cs Exactas y Naturales y Agrimensura – UNNE corrientes-Argentina. Pág.: 1,2
- Alaba, W.; Jiménez, C. 2016. Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) sobre colonias de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Revista Simiykita., Perú vol. 1 (1): 15-22
- Arencibia, D.; Rosario, L.; López, Y.; Fariñas, M.; Infante, J.; Díaz, D. 2009. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. Retel, Revista Cubana. Vol. 1: 22.
- Arroyo, J.; Cisneros, C. 2012. Modelos experimentales de investigación farmacológica, 1ª Edición Lima-Perú, publicaciones ASDIMOR S.A.C. Pág.: 136
- Camacho, H. 2011. Caracterización físicoquímica del aceite esencial de la muña (*Minthostachys setosa*) y su estudio antibacteriano. Tesis para la obtención de título profesional de Ingeniero Químico. Universidad Nacional del callao, Facultad de Ingeniería Química Callao-Perú. Pág.: 83-115
- Cano, C. 2007. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del Aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis*. Tesis de Maestría en recursos vegetales y terapéuticos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. Pág.: 14-43
- Carhuapoma, M. 2007. Composición química, actividad anti-*helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling. Tesis de Doctorado en Farmacia y bioquímica, Universidad Nacional Mayor de san Marcos. Lima-Perú. Pág.: 9, 24, 60, 61.
- Carhuapoma, M.; López, S.; Andamayo, D.; Bell, C. 2009. Aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*, Griseb y su efecto antibacteriano frente a cuatro cepas de bacterias Gram negativas. Rev. Acad. Perú Salud, 16: 2. Pág.: 51-53.

- Castro, M. 2012. Comparación de los compuestos terpénicos del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) extraídos de las hojas frescas y secas. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo. Pág.: 54-55
- Chaquilla, G.; Estela, W.; Torres, V.; Ballines, M.; Gastélum, M.; Nevárez, V. (2012). Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de “muña” *Minthostachys setosa* Briq Epl y anís *Pimpinella anisum* L. Revista ECIPERU., Vol. 8:2., Pág.: 108.
- Coy, C.; Acosta G. 2013. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de Romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y curcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. Revista Cubana de Plantas medicinales, 8 (2). Pág.: 3
- Cyted, 1995. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de técnicas de Investigación, Madrid-España, 214-225.
- Duraffourd, C.; Dhervicourt, L.; Lapraz, J., Cuaderno de fitoterapia clínica. Barcelona: Masson 1987.
- Fuertes, C.; Munguía, Y. 2001. 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, 4(1). Pág.: 23-39. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3389/2810>.
- Galán, A.; Sánchez, I. 2016. Principios de Botánica Farmacéutica. Ed. UPAGU, Universidad de Cajamarca Perú. Pág. 47.
- Gómez-Sánchez, A.; López-Malo, A. 2009. Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Revista Mexicana. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. Vol 3 (1). Pág.: 33-45.
- Gutiérrez, H.; Gutiérrez, R.; Herles, E.; Hernández, M.; Horna, P.; Hoyos, P. 2007. Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii*, Walp) en tres especies de animales modelo: Artemia franciscana (Crustácea, anostraca), pez Guppy (*Poecilia reticulata*) y ratón (*Mus musculus*). Revista Horizonte Médico, Universidad San Martín de Porres. Vol., 7: 2., Pag: 106.
- Huaman, S.; Hurtado H.; Kong, V.; León C.; León D.; Lister P. 2003. Estudio toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomum zeylanicum* (canela). Universidad San Martín de Porres, Revista Horizonte médico 3 (1/2) Pág.: 73.
- Instituto Nacional de Salud 2016. Vigilancia y análisis del riesgo en Salud Pública. Protocolo de vigilancia en Salud Pública. Infección respiratoria Aguda (IRA). República de Colombia. Versión 05. Pag:4
- Matthew, E. 2001. Neumonías comprendidas en las infecciones pulmonares necrotizantes. En: Brawnwald, E., Hauser, S., Fauci A, Longo, D., Kasper, D., Jameson, L., Harrison. Principios de Medicina Interna. 15° ed., 2 Vols. USA, McGrawHill. Pág.: 1729-1737.
- Moreno, M.; Shailili, M.; Crescente, V.; Oscar, E.; Ortiz, M. 2006. Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens triana*. Revista Científica de América Latina y el Caribe, España y Portugal, 31 (10), 745-747.
- Nazzaro, F.; Fratianni, F.; de Martino, L.; Coppola, R.; de Feo, V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Journal list Pharmaceuticals (Basel) v. 6 (12):1451-1474.
- OPS/OMS 2014. Infecciones Respiratorias Agudas en el Perú. Experiencia frente a la temporada de bajas temperaturas Lima Perú. Pág.: 2-6. Disponible en: <http://www.paho.org/per/images/stories/FtPage/2014/PDF/iras.pdf?ua=1>.
- Sacsquispe, R.; Velasquez, J. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión Lima-Perú: Instituto Nacional de Salud. Pag:18-19. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_1%20sensibilidad.pdf.
- Taroco, R.; Seija, V.; Vignoli, R. 2008. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>.
- Torrenegra, M.; Granados, C.; Durán, M.; León, G.; Yáñez, X.; Martínez, C., Pájaro, N., 2016. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. Colombia., Rev. Orinoquia vol. 20, (1):69-74
- Vega-Portocarrero, E.; López-Malo, A. 2009. Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas. Revista Mexicana Temas selectos de Ingeniería de Alimentos Vol. 3 (1):85-95.

- Yañez, C.; Ríos, N.; Mora, F.; Rijas, L. 2011. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd de los llanos venezolanos. Revista peruana de biología 18 (2): 149-151.
- Yapuchura, R. 2010. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb) E. Inca muña (*Clinopodium Bolivianum* (Benth) Kuntze). Tesis de Maestría en Tecnología de Alimentos. Universidad Agraria la Molina. Lima-Perú. Pág.: 59.
- Yañez, X.; Parada, D.; Lugo, L. 2011 Variabilidad del rendimiento del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* nativo de norte de Santander (Colombia) de acuerdo con el tratamiento de la hoja. Bistua: Revista de la Facultad de ciencias básicas de la Universidad de Pamplona, Colombia, 9 (1). Pág.: 51
- Zecaria, D. 2007. Los aceites esenciales, una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorios Calier. España Pag: 4. Disponible en:
http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_Aceites_esen_como_promotores.pdf .