



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE  
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.)  
Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre  
*Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* y su toxicidad sobre *Artemia salina*  
en condiciones de laboratorio.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO (A)  
EN BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

**AUTORES:**

**Bach. Ordinola Becerra César Manuel**

**Bach. Vera Gonzales Maria Milena**

**ASESORA:**

**Msc. Mario C. Moreno Mantilla**

**LAMBAYEQUE - PERÚ**

**2022**



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE**  
**MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* y su toxicidad sobre *Artemia salina* en condiciones de laboratorio.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA**  
**MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**AUTORES:**

Bach. Ordinola Becerra César Manuel

Bach. Vera Gonzales María Milena

**ASESOR:**

MSc. Mario C. Moreno Mantilla

**LAMBAYEQUE – PERÚ**

**2022**

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* y su toxicidad sobre *Artemia salina* en condiciones de laboratorio.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA

**APROBADO POR:**

**PRESIDENTA**

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo

**SECRETARIA**

Dra. Ana María Del Socorro Vásquez Del Castillo

**VOCAL**

Lic. Julio César Silva Estela

**ASESOR**

MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla

**Dedicatoria**

De César Manuel Ordinola Becerra

A Dios, quien es forjador de mi camino. A mis padres por su apoyo incondicional y comprensión en todo momento para alcanzar mis logros incluido este.

**Dedicatoria**

De María Milena Vera Gonzales

A mi familia por haberme dado desde pequeña las herramientas necesarias para ser quién soy ahora, por su apoyo incondicional, sus consejos y su amor.

A mí por mi esfuerzo y por concluir satisfactoriamente mi carrera profesional.

## **Agradecimiento**

### **De César Manuel Ordinola Becerra**

Agradezco a Milena por ser mi compañera en las oportunidades y en la adquisición de conocimientos que nos brindó la universidad.

Al MSc. Mario Moreno y al Dr. Jorge Fupuy por ser ejemplo de maestros en las aulas, brindándonos lo mejor de sus copiosos(bastos) conocimientos y su apoyo en este trabajo.

### **De María Milena Vera Gonzales**

Agradezco primero a Dios por darme paciencia, inteligencia y fortaleza día a día para lograr concluir mi tesis con éxito.

A mi asesor de tesis Mario Moreno por guiarme en cada momento de dificultad y por hacer nuestra estadía en su laboratorio un lugar familiar.

A mi profesor Jorge Fupuy por ser un guía no sólo como maestro excepcional en aula sino como ejemplo de persona.

A mi compañero César Manuel por la paciencia, los momentos vividos y los ánimos dados de nunca rendirme.

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	14
ABSTRACT .....	15
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. ANTECEDENTES .....	18
2.2. BASES TEORICAS.....	23
2.2.1. <i>Especies botánicas utilizadas</i> .....	23
2.2.2. <i>Descripción de especies bacterianas</i> .....	29
2.2.3. <i>Artemia salina</i> .....	31
III. DISEÑO METODOLÓGICO .....	32
3.1. Población.....	32
3.2. Muestra.....	32
3.3. Métodos, Técnicas e Instrumentos.....	33
3.4. Material.....	34
3.4.1. <i>Material biológico y microbiológico</i> .....	34
IV. PROCEDIMIENTO .....	35
4.1. Identificación de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> ...35	
4.2. Obtención de los extractos etanólicos de las hojas de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) <i>Griseb., Argemone subfusiformis Ownbey y Solanum americanum Mill.</i> .....	38
4.3. Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de <i>Minthostachys mollis</i> <i>(Benth.) Griseb., Argemone subfusiformis Ownbey y Solanum americanum Mill.</i> .....	41

4.4.	Preparación de discos de susceptibilidad.....	42
4.5.	Preparación del inóculo <i>bacteriano</i> según método descrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú.....	43
4.6.	Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer (Kinsbruy et al.,1991). ....	43
4.7.	Prueba de identificación de CMI y CMB según el método de dilución en Caldo.....	45
4.8.	Determinación de la toxicidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. sobre <i>Artemia salina</i> (camarón salino) en condiciones de laboratorio .....	46
4.8.1.	Obtención de las concentraciones de la solución madre para el bioensayo.....	46
4.8.2.	Reproducción de los cistos de <i>Artemia salina</i> (camarón salino).....	46
4.8.3.	Bioensayo para la determinación de toxicidad con <i>Artemia salina</i> . (Fernández-Calienes et al., 2009).....	48
V.	RESULTADOS.....	50
5.1.	Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	50
5.2.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	50
5.3.	Toxicidad de los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. sobre metanauplios de <i>Artemia salina</i> . ....	51



5.4.	Análisis de varianza de los halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. ....	52
5.5.	Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. ....	57
5.6.	Evaluación de la toxicidad de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. sobre <i>Artemia salina</i> . ....	58
VI.	DISCUSIONES.....	59
VII.	CONCLUSIONES .....	61
VIII.	RECOMENDACIONES .....	62
IX.	REFERENCIAS.....	63
X.	ANEXOS .....	76

### Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones de los Extractos Etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. para el efecto inhibitorio. ....	42
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de los extractos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. para el bioensayo.....	46
<b>Tabla 3.</b> Promedio de los halos de inhibición de <i>S. aureus</i> y <i>K. pneumoniae</i> frente al extracto etanólico de las hojas de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey. y <i>Solanum americanum</i> Mill.....	50
<b>Tabla 4.</b> Promedio de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb. <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51
<b>Tabla 5.</b> Promedio de metanauplios de <i>Artemia salina</i> muertos a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey, <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb. y <i>Solanum americanum</i> Mill. ....	52
<b>Tabla 6.</b> Análisis de Varianza (ANOVA) de los Halos de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill.....	53
<b>Tabla 7.</b> Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. ....	54
<b>Tabla 8.</b> Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición en las cinco concentraciones de los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill.....	54
<b>Tabla 9.</b> Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill....	55

<b>Tabla 10.</b> Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición entre las 5 concentraciones y los extractos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill.....	56
<b>Tabla 11.</b> Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición entre los extractos etanólicos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. y las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
<b>Tabla 12.</b> Concentración Mínima Inhibitorio (CMI <sub>50</sub> ) estimada y los límites de confianza de los extractos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill.....	58
<b>Tabla 13.</b> Relación de LC50 estimada y los límites de confianza en la evaluación de la toxicidad de los extractos de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill.....	58
<b>Tabla 14.</b> Clasificación de extractos según su toxicidad (CYTED) (Pinzón R. y Sánchez C., 1995).....	76
<b>Tabla 15.</b> Registro de <i>Artemia salina</i> muertas a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey.....	83
<b>Tabla 16.</b> Registro de <i>Artemia salina</i> muertas a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.....	83
<b>Tabla 17.</b> Registro de <i>Artemia salina</i> muertas a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de <i>Solanum americanum</i> Mill.....	84

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	35
<b>Figura 2.</b> Cultivo de <i>S. aureus</i> en Agar sangre.	35
<b>Figura 3.</b> Cultivo de <i>S. aureus</i> en A. manitol salado	36
<b>Figura 4.</b> Prueba de coagulasa.	36
<b>Figura 5.</b> Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	37
<b>Figura 6.</b> Cultivo de <i>K. pneumoniae</i> en agar Mac Conkey.	37
<b>Figura 7.</b> Identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
<b>Figura 8.</b> Proceso de obtención de los extractos etanólicos de las hojas.	40
<b>Figura 9.</b> Preparación de la solución madre y de las concentraciones de <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey.	41
<b>Figura 10.</b> Concentraciones de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb., <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill.	42
<b>Figura 11.</b> Prueba de suceptibilidad bacteriana	44
<b>Figura 12.</b> Prueba de identificación de CMI y CMB.	45
<b>Figura 13.</b> Incubación de <i>Artemia salina</i> .	47
<b>Figura 14.</b> Metanauplios de <i>Artemia salina</i>	48
<b>Figura 15.</b> Placas de Petri con diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb. conteniendo 10 metanauplios de <i>Artemia salina</i> cada uno.	49
<b>Figura 16.</b> Placas de Petri que demuestra que no existe efecto inhibitorio de <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey sobre las tres cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	76
<b>Figura 17.</b> Placas de Petri que demuestran las cinco repeticiones de que existe efecto inhibitorio de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .	77
<b>Figura 18.</b> Método de dilución en tubo: CMI y CMB de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.	77

<b>Figura 19.</b> Planta <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.....	78
<b>Figura 20.</b> Planta <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey.....	79
<b>Figura 21.</b> Planta <i>Solanum americanum</i> Mill. ....	80
<b>Figura 22.</b> Concentraciones madre de los extractos etanólicos con agua marina para el bioensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i> .....	81
<b>Figura 23.</b> Preparación de las concentraciones de los extractos etanólicos con agua marina para el bioensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i> .....	81
<b>Figura 24.</b> Concentraciones preparadas de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb. <i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey y <i>Solanum americanum</i> Mill. para ser utilizadas en el bioensayo de toxicidad de <i>Artemia salina</i> .....	82

### Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Clasificación de extractos según su toxicidad (CYTED).....	76
<b>Anexo 2.</b> Fotos de resultados del efecto inhibitorio.....	76
<b>Anexo 3.</b> Método de dilución en tubo: CMI y CMB de <i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) <i>Griseb.</i> .....	77
<b>Anexo 4.</b> Especies botánicas .....	78
<b>Anexo 5.</b> Fotografías del bioensayo de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i> .....	81
<b>Anexo 6.</b> Tablas de las repeticiones del Bioensayo de <i>Artemia salina</i> .....	83
<b>Anexo 7.</b> Constancia de identificación de las plantas trabajadas.....	85
<b>Anexo 8.</b> Constancia de identificación de las cepas bacterianas trabajadas.....	86

## RESUMEN

En la presente investigación se determinó el efecto inhibitorio in vitro, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) y toxicidad sobre *Artemia salina* en condiciones de laboratorio de los extractos etanólicos de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb, *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Dicho estudio se realizó en tres etapas, en la primera etapa se identificó las cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae*, se obtuvo los extractos etanólicos de las hojas de dichas plantas y se preparó las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos. Luego por el método modificado de difusión de Kirby Bauer se determinó el efecto inhibitorio in vitro sobre *S. aureus* y *K. pneumoniae* a concentraciones de 1000 mg/mL, 800 mg/mL, 600mg/mL, 400 mg/mL y 200 mg/mL donde los extractos no presentaron efecto sobre *K. pneumoniae* pero sí sobre *S. aureus* dando como resultados para *M. mollis* (Benth.) Griseb halos promedios de 24 a 15mm, para *A. subfusiformis* Ownbey de 21 a 11mm y para *S. americanum* Mill. de 11 a 9mm; por el método de dilución en Caldo se determinó la CMI de 90, 160, 200mg/mL y CMB de 90, 150, 200mg/mL respectivamente y por último se evaluó la toxicidad por el método del bioensayo de *A. salina* dando como resultado para *M. mollis* (Benth.) Griseb 3.6mg/mL para *S. americanum* Mill. 13.8mg/mL y el extracto de *A. subfusiformis* Ownbey mató a todas las artemias del ensayo a las 24 horas.

**Palabras claves:** *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb, *Argemone subfusiformis* Ownbey, *Solanum americanum* Mill., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Artemia salina*, extractos etanólicos, CMI, CMB, toxicidad.

## ABSTRACT

In the present investigation, the inhibitory effect in vitro, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and toxicity on *Artemia salina* under laboratory conditions of the ethanolic extracts of the leaves of *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb, *Argemone subfusiformis* Ownbey and *Solanum americanum* Mill. on *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Said study was carried out in three stages, in the first stage the strains of *S. aureus* and *K. pneumoniae* were identified, the ethanolic extracts of the leaves of said plants were obtained and the different concentrations of the ethanolic extracts were prepared. Then, by the modified Kirby Bauer diffusion method, the in vitro inhibitory effect on *S. aureus* and *K. pneumoniae* was determined at concentrations of 1000 mg / mL, 800 mg / mL, 600mg / mL, 400 mg / mL and 200 mg / mL where the extracts had no effect on *K. pneumoniae* but on *S. aureus* giving results for *M. mollis* (Benth.) Griseb average halos from 24 to 15mm, for *A. subfusiformis* Ownbey from 21 to 11mm and for *S. americanum* Mill. From 11 to 9mm; by the dilution method in Broth, the MIC of 90, 160, 200mg / mL and WBC of 90, 150, 200mg / mL respectively were determined and finally the toxicity was evaluated by the *A. salina* bioassay method, resulting in *M. mollis* (Benth.) Griseb of 3.6mg / mL for *S. americanum* Mill. Of 13.8mg / mL and the extracts of *A. subfusiformis* Ownbey killed all the brine shrimp at 24 hour.

**Keywords:** *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb, *Argemone subfusiformis* Ownbey, *Solanum americanum* Mill., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Artemia salina*, ethanolic extracts, MIC, MBC, toxicity.



## I.INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales y comunitarias constituyen un problema de salud a nivel mundial y son la principal causa de mortalidad y morbilidad. Otro problema que va aumentando cada año es la resistencia bacteriana y esto se debe al uso inadecuado de antibióticos y al tratamiento empírico basado en la clínica del paciente (World Health Organization, 2014). *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* son bacterias que no solo causan infecciones sino también son bacterias multirresistentes que pueden colonizar con mayor frecuencia a pacientes que ingresan en áreas críticas (Custovic et al., 2014). Ambas bacterias son de gran interés debido a un aumento de casos con cepas resistentes a meticilina como *S. aureus* y, por otro lado, la resistencia a cefalosporinas por *K. pneumoniae* (Martínez et al., 2016; Instituto Nacional de Salud, 2014).

Alrededor del 60 % de la población reemplaza medicamentos por remedios a base de plantas (Chraibi et al., 2016), generando así otra alternativa para el tratamiento de las infecciones; empleando asimismo plantas conocidas comúnmente como “hierba mora” (*Solanum americanum* Mill.), para aliviar males respiratorios como sinusitis y descongestión de las fosas nasales, también presenta propiedades antiinflamatorias, entre otras; el “poleo o muña” (*Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb), se utiliza para tratar problemas respiratorios comunes, presenta propiedades antiasmáticas, expectorantes y antiinflamatorias, y en algunas zonas del Perú es utilizado como condimento (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, 2014); por otra parte, el “cardo santo” (*Argemone subfusiformis* Ownbey) es empleado para aliviar problemas de asma y también presenta propiedades antiulcerantes, cicatrizantes, entre otras. (Ariza et al., 2009).

También existen estudios donde se reportan que *M. mollis* tiene acción antibacteriana contra *S. aureus* (Torrenegra et al., 2016) y propiedades bactericidas y bacteriostáticas sobre *S. aureus* y *K. pneumoniae* (Inga y Guerra, 2000), *S. americanum*

a una concentración de 200 mg/mL presenta efecto inhibitorio para *Staphylococcus* sp. (Domínguez et al., 2010) y con respecto a *A. subfusiformis* Ownbey no existen estudios propiamente dichos que señalen la efectividad contra *S. aureus* o *K. pneumoniae*.

Por lo antes mencionado se plantea el siguiente problema ¿Tienen efecto inhibitorio in vitro los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *S. aureus* y *K. pneumoniae*? y ¿Cuál es la toxicidad de dichas plantas sobre *Artemia salina* en condiciones de laboratorio? Siendo la hipótesis: Los extractos etanólicos de *M. mollis* (Benth.) Griseb., *A. subfusiformis* Ownbey. y *S. americanum* Mill. tienen efecto inhibitorio in vitro sobre el crecimiento de *S. aureus* y *K. pneumoniae* y dichas plantas tienen baja toxicidad sobre *A. salina* en condiciones de laboratorio.

Teniendo, así como objetivos generales determinar el efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de las hojas de *M. mollis* (Benth.) Griseb, *A. subfusiformis* Ownbey y *S. americanum* Mill. sobre *S. aureus* y *K. pneumoniae* y a su vez determinar la toxicidad de dichas plantas sobre *A. salina* en condiciones de laboratorio. Como objetivo específico tenemos determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y la CMB (Concentración Mínima Bactericida) de los extractos etanólicos de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud y diversos países reconocen la importancia del uso y aplicación de plantas medicinales en la atención primaria de salud, que se estima que casi el 80% de la población mundial utiliza para solucionar sus principales problemas de salud.(World Health Organization, Comité Regional para el Pacífico Occidental, 2001; OMS, 2002).

“Los políticos encargados de elaborar la política sobre medicina en el ámbito mundial están reconociendo que el uso de plantas medicinales continúa siendo una parte muy arraigada de la cultura, historia y creencias de un país, las cuales deben ser analizada como parte del sistema sanitario del país”(OMS, 2000).

Torrenegra et al. (2016) demostraron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tiene acción antibacteriana contra *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Escherichia coli*, cuyo principal componente antimicrobiano es el carvacrol. Aigaje y Zurita (2017) demostraron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tiene efecto antimicrobiano contra *Porphyromonas gingivalis*.

Inga y Guerra (2000) demostraron mediante un estudio las propiedades bactericidas/bacteriostáticas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente *S. aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* MC, *Salmonella Typhi*, *S. sonnei* MC, *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031, también determinaron la acción fungistática/fungicida para *Fusarium moniliforme* y *Aspergillus niger*.

Bravo et al. (2004) en su estudio de *Minthostachys mollis* "muña", determinó que sus cinco extractos tenían actividad antimicrobiana frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*; concluyendo que *Minthostachys mollis* contiene flavonoides y tiene actividad antibacteriana como resultado de la presencia de estos componentes.

Cano (2007); Cano et al. (2008) reportaron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* exhibe efectos antimicóticos contra cepas de *Candida albicans* en concentraciones de 50 y 100% y contra *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*.

Carhuapoma et al. (2009) determinaron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tuvo resultados frente a *Shigella dysenteriae* 21,41 mm; *Helicobacter pylori* 17,07 mm; *S. typhi* 14,25 mm y *Pseudomonas aeruginosa* 11,45 mm. La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida para *H. pylori*, resultó 2 µg/mL 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.

Baca (2017) determinó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tiene efecto inhibitorio sobre el género *Proteus*, así tenemos a *Proteus vulgaris* con un halo de 11.90 mm y una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 mg/mL, mientras que en *P. mirabilis* presenta 7.37 mm y 75 mg/mL, *P. rettgeri* 7.00 mm y 75 mg/mL y para *P. morganii* 6.90 mm y 75 mg/mL.

Ccallo (2013) comprobó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) inhibe a *Streptococcus mutans* y a *P. gingivalis* con una concentración mínima inhibitoria para *S. mutans* de 0.448 g/mL, y para *P. gingivalis* es mayor a 0.448 g/mL.

Calixto (2006) y Díaz (2005) concluyeron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tiene propiedades antibacterianas frente a bacterias orales: *S. mutans*, *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomicetenumcomitans* y *Actinomyces sp.*

Bustamante (2018) concluyó que el extracto etanólico de *Minthostachys mollis* inhibe el crecimiento de *Bacillus cinerea* al 100% a concentraciones de 10%, 7.5% y 5% en medio APD (agar papa dextrosa) y al 10% y 7.5% en el medio kiwisha, además que

la concentración mínima inhibitoria (MIC) para el extracto etanólico de *Minthostachys mollis* es del 5% para el medio APD y kiwicha.

Mora et al. (2009) Estudiaron y analizaron el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* por el equipo de análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas; identificando como componentes principales al pulegona (55,2%) y trans-mentona (31,5%). El aceite esencial mostró un efecto inhibitorio significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* que tuvieron un efecto inhibitorio más sensible (4 µg/mL).

Rojas (2017) concluyó que la citotoxicidad en *A. salina* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, a la Concentración de 100 µg/mL dio como resultado la Concentración Letal Media de 14,000 µg/mL, también determinó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, no posee actividad anti-*H. pylori in vivo*. Sin embargo, el INS (2011) recomienda tener cuidado en el consumo de *Minthostachys mollis*, ya sea como infusión o cocimiento, ya que no se han realizado estudios clínicos.

Cieza y Castillo (2019) concluyeron que los extractos hidroalcohólicos de *A. subfusiformis* G.B. Ownbey evaluado por el método de bioensayo de *A. salina* mostró: LC50 de 552,868 µg / mL, 562,790 µg / mL y 578,515 µg / mL para hojas, tallo y raíz respectivamente, lo que indica una ligera actividad citotóxica en los tres órganos.

Bhattacharjee et al. (2006) comprobó que los extractos de hojas y semillas de *Argemone mexicana* L. presentan efecto antibacterial sobre cepas de *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Ruiz (2016) comprobó que los extractos de *A. mexicana* tienen efecto inhibitorio sobre cepas de *E. coli* productora de betalactamasa de espectro extendido.

Arokiyaraj et al. (2013) realizaron la evaluación in vitro del extracto de hoja de *A. mexicana* contra *E. coli*, *P. mirabilis* y *B. subtilis*; informando que el extracto etanólico exhibió un efecto moderado sobre las bacterias.

Díaz (2016) concluyó que el extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana* tiene metabolitos secundarios como flavonoides y compuestos polifenólicos y que el valor LD50 en ratones del extracto hidroalcohólico de *A. mexicana* es superior a 20 g/kg.

Vidal et al. (2008) comprobaron el efecto biocida de los extractos etanólicos foliares de *A. subfusiformis* sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L.

Granados et al. (2016) evaluaron que el extracto etanólico de las partes vegetativas de *A. mexicana* inhibió el crecimiento y desarrollo de las larvas del mosquito *Culex. quinquefasciatus*, el extracto de flor y tallo, seguido del extracto de hoja, tiene la mayor eficacia larvicida.

Warikoo y Kumar (2013) desarrollaron extractos de plantas con disolventes de diferente polaridad (éter de petróleo, hexano, benceno, acetona y etanol) utilizando hojas, tallos y raíces de *A. mexicana* y lo evaluaron contra larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti*, su estudio encontró que el extracto de raíz tenía un mayor grado de efectividad que los preparados de hojas y tallos.

Domínguez et al. (2010) demostraron que *S. americanum* a una concentración de 200 mg/mL tuvo efecto moderado para *E. coli*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Neisseria sp.*, y para *Candida albicans* tuvo un efecto ligero (halo de inhibición no mayor de 12 mm), sin embargo, tuvo un efecto marcado (halo de inhibición mayor de 24 mm) para *Streptococcus sp.*

Varas (2009) en su estudio del efecto citoprotector y antisecretor gástrico del extracto acuoso de *S. americanum* Mill (hierba mora) en la inducción de úlcera gástrica en ratas, obtuvo resultados positivos en protección gástrica y con respecto a la prueba de toxicidad crónica, ha demostrado que su uso es seguro.

Cáceres et al. (1998) realizaron un estudio sobre plantas en Guatemala para el tratamiento de infecciones por protozoos, en la cual incluyeron la actividad de *S. americanum* Muller demostrando actividad sobre *Trypanosoma cruzi*.

El extracto clorofórmico de tallos y el extracto de acetato de etilo de tallos y hojas de *Solanum nigrum* L. mostraron actividad antibacteriana frente al *S. aureus* (ATCC29737) (Chang et al., 2013).

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *S. nigrum* L. “hierba mora” tiene efecto antibacteriano en cepas de *P. aeruginosa* (Cachi y Cueva, 2018).

Caño y Menco (2013) mencionan que de los extractos etanólicos de tallo, hojas y frutos de *Solanum crinitipes* Dunal sólo presenta efecto inhibitorio la parte del tallo para *E. coli* con un halo de 7mm y la parte de las hojas para *S. aureus* con un halo de inhibición de 9mm. Para la toxicidad de *S. crinitipes* Dunal emplearon *A. salina* teniendo como resultados la CL50 de 460.056mg/mL, 608.373 mg/mL y 237,432 mg/mL para hojas, tallos y frutos respectivamente. También realizaron CMI con el solvente de acetona, teniendo como resultado la inhibición de *S. aureus* a una concentración mínima de 30mg/mL.

Quispe (2017) en su estudio del extracto acuoso de las hojas del *Solanum americanum* Muller (Ñushco) demostró que la toxicidad aguda del extracto en ratones reveló que la DL50 estaría sobre una dosis mayor a 2000 mg/kg.

Pino y Jorge (2010) difunden que el bioensayo de *Artemia spp.* es una herramienta útil para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales, también nos hablan de las múltiples ventajas que tiene este bioensayo, por los que se utilizan en muchas investigaciones de toxicidad como Cruz y Morocho (2013) que utilizaron para la determinación de la concentración letal media en *A. salina* de diez extractos hidroetanólicos de especies de plantas de Zamora, González y Aportela (2001) que lo utilizan para la determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *A. salina*.

## 2.2. BASES TEORICAS

### 2.2.1. Especies botánicas utilizadas

#### 2.2.1.1. *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb.

Sistema de clasificación según Cronquist. (Cronquist, 1981).

#### **Clasificación Taxonómica**

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Asteridae

**Orden:** Lamiales

**Familia:** Lamiaceae

**Género:** *Minthostachys*

**Especie:** *Minthostachys mollis* Griseb.

*Minthostachys mollis*, nombre científico de la planta conocida como “Monka”(Castañeda, 2011), “muña”, “Muña negra”, “muña-muña”, “huycha”, “arash muña” (Sotta, 2000) otros la conocen como “poleo”, “muña”, “menta poleo” (Palacios, 1997).

La especie *Minthostachys mollis* pertenece a la familia Lamiaceae, la cual está constituida por 300 especies distribuidas en 200 géneros de plantas herbáceas, muchas de estas especies producen aceites esenciales por lo que pueden considerarse plantas aromáticas por excelencia, utilizadas también en la medicina tradicional, industria farmacéutica y perfumería (Munguía, 2000).

*Minthostachys mollis* es una planta arbustiva que alcanza una altura de 0,8 a 1,5 metros; frondosa en la parte superior erecta y pubescente; es muy ramificada desde la base. Sus hojas son simples opuestas decusadas pecioladas, penninervias, dentadas, asimétricas en la base, pubescentes en el haz y en el envés (pelos glandulosos y pelos tectores). Las flores son pentámeras, tubulosas, actinomorfas, pequeñas dispuestas en forma variada y se encuentran en la parte superior de las



ramas; corola de forma tubular de 2,5 a 4 mm de largo, pequeños estambres en el medio del tubo corolar; ovario súpero, estilo ginobásico y estigma bifido. El fruto es un folículo formado por cuatro mericarpos (López, 2006; Mostacero et al., 2002).

Es una planta originaria de los valles andinos del Perú, Bolivia, Argentina, Ecuador y Venezuela (Brako y Zarucchi, 1993). Encontrándose entre 1000 – 3400 msnm (Castillo, 2010). Se desarrolla sobre suelos franco areno-arcilloso, franco limo-arcilloso, arcilloso y areno-arcilloso; vive en laderas rocosas y pedregosas, bordes de carreteras, laderas de arbustos y bordes de campos de cultivos (Salas, 2016).

La muña es reconocida tradicionalmente por sus propiedades medicinales y comestibles, antiguamente se empleaba en preparaciones culinarias y aromáticas, posee propiedades conservantes naturales inhibiendo el deterioro oxidativo y los daños causados por microorganismos, también actúa como insecticida contra larvas, pupas y adultos de mosquitos. Se emplea en la medicina natural, industria farmacológica, de alimentos, perfumería y cosmética. En industrias, textil y de pinturas; como saborizantes, gaseosas, aromatizantes y enmascaradores de olores, como fijadores e ingredientes activos, componentes de productos de limpieza, bioinsecticidas entre otros (Stashenko, 2009; Salas, 2016; Baca, 2017).

Fuertes y Munguía (2001); Huamani (2015) indican que esta planta se utiliza por sus propiedades digestivas (cólicos, vómitos, diarrea, flatulencias, úlceras), antiasmático, expectorante, antireumático, antiinflamatorio, antiséptica, analgésico, tratamiento de tumores, contra jaquecas y soroche.

En diversos estudios fitoquímicos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, se evidencia productos metabólicos como: glicósidos, mucílagos, saponinas, taninos, alcaloides, esteroides, aceites esenciales, también contienen carbohidratos, calcio, fósforo, hierro, trazas de vitamina B1, esencias y mentol; (Carhuapoma, 2011). También se ha encontrado hidrocarburos como mirceno, cimeno, pineno, canfeno,

limoneno, cariofileno, germacreno; alcoholes como Linalol, citronelol, nerodinol, farsenol, mentol, bencílico, feniletílico, octanol; fenoles como timol, carvacrol, eugenol, vainillina; aldehídos como citral, citronelal, anisaldehído, benzaldehído, cinamaldehído; cetonas como alcanfor, carvona, mentona, piperitona, acetato fenona, pulegona; éteres como anetol, metil chavicol, eucaliptol, ascarodol, nerolidol; esterres como salicilato de amilo, benzoato de metilo, acetato de terpinilo, acetato de geranilo (Goldsmith y Thorpe's, 1967). El aceite esencial de *Minthostachys mollis* tiene una estructura aldehydica, cetónica, alcohólica (mentol y mentona), esterres, éteres y terpenos en porcentajes más altos. También presenta monoterpenos como son: pulegon, mentona, carvona; otros compuestos como, limoneno, isomentona,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, ácido piperínico, mentol y eucaliptol. Existen compuestos volátiles en proporciones significativas como el: carvacrol, acetato de carvacrilo y trans- $\beta$ -cariofileno (Cano, 2007; Malpartida, 2010; Ccallo, 2013; Huamani, 2015; Salas, 2016).

#### **2.2.1.2. *Argemone subfusiformis* Ownbey.**

Sistema de clasificación según Cronquist (Cronquist, 1981).

##### **Clasificación Taxonómica**

**REINO:** Plantae

**DIVISIÓN:** Magnoliophyta

**CLASE:** Magnoliopsida

**SUBCLASE:** Magnoliidae

**ORDEN:** Papaverales

**FAMILIA:** Papaveraceae

**GÉNERO:** *Argemone*

**ESPECIE:** *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

*Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey nombre científico de la planta conocida como cardo santo, cardo amarillo, cardo bendito, cardo blanco, cardón santo, carrazán, ortiguilla (Chiarini et al., 2012) entre otros.

La especie *Argemone subfusiformis* Ownbey perteneciente a la familia de las Papaveráceas, es una hierba anual, glauca, laticífera, totalmente espinosa. Sus tallos son erguidos y ramificados de 25 - 100 cm de altura con látex amarillento. Las hojas se encuentran manchadas de blanco, son glaucas, alternas, oblanceoladas, angostas, abrazadoras en la base y dentadas. Las nervaduras medias y secundarias del envés espinoso miden 10-25 cm longitud por 3-10 cm de ancho. Sus flores son grandes, solitarias y terminales, miden de 2- 8 cm de diámetro, su corola presenta entre 4-6 pétalos de color amarillo claro o blanquecino, cuneiforme o semiorbicular, estambres numerosos y libres, filamentos y anteras amarillos. El fruto tiene cápsulas espinosas, oblongas, de 4 - 5 cm de largo, dehiscentes por valvas apicales, estas capsulas presenta entre 3 – 4 hojas carpales. Semillas numerosas, esféricas u ovoides, pardo negruzcas de 2-2,5 mm de largo, con depresiones angulosas y cresta irregular lateral. *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey se distingue de *Argemone mexicana* L. por las yemas oblongas, los apéndices corniculados de los sépalos, las flores son más grandes con pétalos amarillos muy pálidos y por las cápsulas notablemente más alargadas y fusiformes (Peña, 2002).

*Argemone subfusiformis* Ownbey se encuentra distribuida en: Ecuador, Perú, Paraguay, Bolivia, Chile y en Argentina distribuida ampliamente desde el Norte hasta la Patagonia (Adanson, 2000).Habiendo sido transportada de un lugar a otro por el hombre debido a sus propiedades medicinales. Su distribución de altitud es bastante notable, desde cerca del nivel del mar en las zonas costeras hasta más de 11.000 pies en Perú (Ownbey, 1961).

*Argemone subfusiformis* es reconocida tradicionalmente por sus propiedades medicinales; El látex de la planta se usa para tratar cataratas y nubes en los ojos. Las hojas tienen propiedades antiulcerantes, cicatrizantes, dermopáticas, hipnóticas, narcóticas, oftálmicas, también se utilizan para aliviar dolores de estómago, sedantes y tratamiento de heridas externas; la decocción de hojas tiene actividad sedante,

reduce la presión arterial, relajante muscular, antiarrítmica cardíaca, fungicida, antimalárica, anti-HIV e insecticida y las flores, frutos y el aceite de las semillas tiene actividad antibacteriana. Sus raíces son eméticas y purgantes; la flor tiene propiedades emolientes y pectorales; la infusión de pétalos es empleada como antiasmática y digestiva. Las semillas se utilizan como diaforéticas y febrífugas (Cuellar et al., 2013; Chiarini et al., 2012; Luján et al., 2002; Ariza et al., 2009).

*Argemone subfusiformis* se caracteriza por poseer abundante látex, rico en polisacáridos y polifenoles. Se han detectado aminoácidos, fenoles, ácidos grasos y alcaloides altamente tóxicos. Los alcaloides que tiene *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey son berberina, protopina, sanguinarina y tres bases sin identificación (Lamien-Meda et al., 2014; Manske, 1975).

Los componentes principales que tiene toda la especie vegetal son los principios amargos (0,25 %) entre los que se encuentran la cnicina; lactona sesquiterpenica del tipo germanacrolido; también contiene benedicitna; flavonoides de tipo glucosídico, derivados de apigenol, luteolol y kaempferol; materias minerales (10-18%), resinas, pequeñas cantidades de aceite esencial (0.3%), alcohol cerílico, aceite fijo, mucilago, gomas, azúcar y esterinas (Cuellar et al., 2013).

### **2.2.1.3. *Solanum americanum* Mill.**

Sistema de clasificación según (Vibrans, 2009) y (Miller, 1768).

#### **Clasificación Taxonómica.**

**REINO:** Plantae

**DIVISIÓN:** Magnoliophyta

**CLASE:** Magnoliopsida

**ORDEN:** Solanales

**FAMILIA:** Solanaceae

**GÉNERO:** *Solanum*

**ESPECIE:** *Solanum americanum* Mill.

*Solanum americanum* Mill. nombre científico de la planta conocida como “hierba mora” perteneciente a la familia Solanaceae la cual está conformada aproximadamente por 30 000 especies (Toppino, et al., 2016).

*Solanum americanum* es una planta herbácea, erecta o rastrera de 1 - 1.5 m de alto. Su tallo es ramificado, con pelos encorvados hacia arriba. Sus hojas mayormente en pares, una más grande que la otra, los pedicelos miden hasta 3 cm de largo, tienen una lámina lanceolada u ovada, que mide de 8 -15 cm de largo y 4 - 5.5 cm de ancho, presenta un ápice de agudo a acuminado, presenta un margen de entero a sinuado dentado, base cuneada, con pelos contra la superficie en ambas caras o sin pelos. Sus inflorescencias son laterales, en forma de umbelas o cimas, pedicelos hasta de 10 mm de largo. Las flores presentan un cáliz de 1 a 2 mm de largo, sus lóbulos 5, más o menos del mismo largo que el tubo, ovados a oblongos, doblados hacia abajo en fruto; corola morada o blanca, de 4 a 7.5 mm de largo, sus lóbulos triangulares, mucho más largos que el tubo, pubescentes por fuera; anteras de 1 a 2 mm de largo, filamentos de menos de 0.5 mm de largo; ovario sin pelos, estilo pubescente en su mitad inferior, por lo general más largo que los estambres. Su fruto globoso, de 4 a 8 mm de diámetro, negro en la madurez; semillas lenticulares, de más o menos 1 mm de diámetro (Calderón y Rzedowski, 2001).

Las especies de esta familia crecen en todo el mundo, por lo que tenemos África, China, India, Indonesia, Irán, Egipto, Turquía e Italia (Toppino, et al., 2016); en Latinoamérica se distribuyen en Perú, Colombia, Bolivia, Paraguay, Brasil y Argentina (Altesor et al., 2016).

La planta se consume tradicionalmente como antiespasmódica y vermífuga. Se utiliza una decocción de toda la planta como un depurativo de la sangre, para tratar la inflamación y expulsar gusanos. La planta se aplica externamente como remedio para úlceras corrosivas, cánceres supurantes, heridas profundas, enfermedades de la piel,

se usa en cataplasmas para el tratamiento del dolor renal. El jugo extraído de las hojas se usa para calmar la conjuntivitis crónica e inflamaciones relacionadas. La infusión de hojas y tallos se consume para mejorar la función renal. La decocción de la raíz mezclada con jugo de lima y una pizca de sal, se bebe como tratamiento para malaria. Las hojas contienen alrededor de 6,990mg de beta caroteno por 100g (Defilipps et al., 2004).

Los compuestos fenólicos de la familia de las Solanáceas contribuyen a sus propiedades bioactivas (Herraiz et al., 2016).

## **2.2.2. Descripción de especies bacterianas.**

### **2.2.2.1. *Staphylococcus aureus*.**

**Clasificación taxonómica** (Garrity et al., 2004).

**DOMINIO:** Bacteria

**FILO:** Firmicutes

**CLASE:** Bacilli

**ORDEN:** Bacillales

**FAMILIA:** Staphylococaceae

**GENERO:** *Staphylococcus*

**ESPECIE:** *S. aureus*.

*S. aureus* o estafilococo dorado es una bacteria Gram positiva de forma esférica (coco) de 1µm aproximadamente de diámetro, inmóviles, agrupada en conjuntos o en pares, en cadenas cortas o en grupos en forma de racimos de uva al ser observada al microscopio, no poseen flagelos, no forman esporas y excepcionalmente pueden tener cápsula, por lo general presenta un pigmento de color amarillo en el medio de cultivo. Algunas cepas producen una toxina proteica muy estable al calor que causa enfermedades en los humanos. La prueba de la coagulasa se utiliza para la detección y diferenciación de *S. aureus* de otras especies del mismo

género. La coagulasa es una enzima que estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, por lo que prueba la capacidad de un microorganismo para coagular el plasma por la acción de esta enzima. (Gentile, et al., 2018; Prescott et al., 2004).

*S. aureus* es un microorganismo muy extendido en el medio ambiente. Es parte de la flora normal del tracto respiratorio superior humano y se ha detectado en hisopados nasales y faríngeos en personas aparentemente sanas. También coloniza la piel y mucosas de 30% a 50% de niños y adultos sanos, posee factores de virulencia como adhesinas, toxinas y enzimas, además se distribuye ampliamente, ya que forman parte de la flora comensal del organismo, Puede ser causante de una variedad de infecciones, desde piel leve y tejidos blandos hasta infecciones invasivas como neumonía, bacteriemia y sepsis. (Gentile, et al., 2018; Arce y Asalde, 2012; Carmona et al., 2014).

#### **2.2.2.2. *Klebsiella pneumoniae*.**

**Clasificación Taxonómica** (Garrity, et al. 2004).

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Klebsiella*

**Especie:** *K. pneumoniae*.

*K. pneumoniae* es una bacteria Gram-negativa, aerobia, quimiorganotrofa e inmóvil. Es capaz de producir cápsulas, posee estructuras especializadas que le permiten adherirse a las células huésped (pili) y sideróforos que le permiten obtener el hierro necesario para su desarrollo. Es un patógeno oportunista que coloniza la piel y mucosas de pacientes hospitalizados donde puede provocar infecciones invasivas

como bacteriemia o sepsis, siendo el vehículo responsable las manos contaminadas del personal que pueden llegar a causar brotes epidémicos. *K. pneumoniae* también puede producir infecciones del tracto urinario e infecciones de tejidos blandos como neumonías (Martin y Bachman, 2018; Gonzales et al., 2014).

### **2.2.3. *Artemia salina*.**

*Artemia spp.* son camarones diminutos, de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se les conoce comúnmente con el nombre de artemia, también llamados “monos de mar” o “brine shrimp” en inglés (Schmidt, 1985).

Estas especies se encuentran en todo el mundo en aguas de alta salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son una fuente de alimento para peces, aves y diversos invertebrados.

La *A. salina* tiene una notable resistencia al cambio y puede vivir en una amplia variedad de salinidades de agua. *A. salina* adulta suele ser tener un tamaño de alrededor de 8-10 mm, pero puede alcanzar hasta 15 mm dependiendo de su entorno. Tiene un cuerpo alargado dividido en al menos 20 segmentos y unido a su tronco hay alrededor de 10 conjuntos de apéndices planos, parecidos a hojas, llamados filopodios, que se baten a un ritmo regular (Salgado, 2001).

Las hembras producen huevos de los cuales eclosionan larvas de aproximadamente 1 mm de tamaño en condiciones externas favorables. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma durante un año o más. Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas,

*Artemia* es hasta la fecha el único género animal en el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está continuamente disponible comercialmente, como fuente de alimento para peces y mariscos en acuicultura. Este ha sido un elemento clave en ensayos biológicos (Vanhaecke, 1984).



### III. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente trabajo de investigación se clasificó como investigación aplicada según el propósito perseguido y como experimental según la técnica de contraste. En la prueba de hipótesis, se consideró de estímulo creciente.

#### 3.1. Población.

La población estuvo conformada por cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* que fueron aisladas de pacientes con problemas respiratorios e identificadas en el Laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; el material botánico que estuvo constituida por hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill., identificadas en el Herbario Pedro Ruiz Gallo - UNPRG y por último cistos de *Artemia salina* “Camarón salino” obtenidos comercialmente.

#### 3.2. Muestra.

La muestra para evaluar efecto inhibitorio estuvo conformada por dos especies bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* cada una con tres cepas, las cuales fueron enfrentadas a cinco concentraciones diferentes de los extractos etanólicos de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. Factorial= Dos especies bacterianas por tres cepas por cinco concentraciones por tres plantas = 90. Muestra igual 90 unidades. De cada experimento se realizó cinco repeticiones teniendo en total 450 unidades experimentales.

La muestra para evaluar la toxicidad estuvo conformada por tres especies de plantas, cinco concentraciones diferentes de cada una de ellas a las cuales se agregó diez metanauplios de *Artemia salina* por concentración. Factorial= Tres especies de plantas por cinco concentraciones por 10 metanauplios = 150. Muestra igual 150

unidades. De cada experimento se realizó tres repeticiones teniendo en total 450 unidades experimentales.

### **3.3. Métodos, Técnicas e Instrumentos.**

Para realizar este trabajo se utilizó como método la observación directa sobre la falta de crecimiento (si existe inhibición) o el crecimiento normal de *S. aureus* y *K. pneumoniae* y se procedió a evaluar el rango de inhibición del crecimiento de las bacterias en mención. Luego se empleó instrumentos para su posterior registro como fichas de resultados, teléfono móvil y fichas de muestreo, entre otros.

Para determinación de la toxicidad de los extractos etanólicos se utilizó como método la observación directa frente a una luz para evaluar la movilidad de los metanauplios. Se contaron los metanauplios vivos y muertos. Luego se emplearon instrumentos para su posterior registro como fichas de resultados, teléfono móvil y fichas de muestreo, entre otros.

### 3.4. Material.

#### 3.4.1. *Material biológico y microbiológico.*

Hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. recolectadas en áreas de cultivo de patrimonio de los investigadores, ubicados en el distrito de Ninabamba, Santa Cruz, Cajamarca.

Hojas de *Argemone subfusiformis* Ownbey recolectadas en áreas de cultivo de patrimonio de los investigadores, ubicados en el distrito de Mesones Muro, Ferreñafe, Lambayeque.

Hojas de *Solanum americanum* Mill. recolectadas en áreas de cultivo de patrimonio de los investigadores, ubicados en el distrito de Mesones Muro, Ferreñafe, Lambayeque.

Cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes con problemas respiratorios e identificadas en el Laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas

Cistos de *Artemia salina* “Camarón salino” obtenidos comercialmente.

#### IV. PROCEDIMIENTO

##### 4.1. Identificación de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Las cepas de *S. aureus* (figura 1), se sembraron en placas previamente estériles con Agar sangre (se observó las características propias de las colonias *S. aureus*, figura 2), en la identificación se realizó las pruebas de fermentación del manitol en aerobiosis (figura 3) y prueba de coagulasa (figura 4).

**Figura 1.**

*Cepas de Staphylococcus aureus.*



**Figura 2.**

*Cultivo de S. aureus en Agar sangre.*



**Figura 3.**

*Cultivo de S. aureus en A. manitol salado.*



**Figura 4.**

*Prueba de coagulasa.*



Las cepas de *K. pneumoniae* (figura 5), se sembraron en Agar Mac Conkey (figura 6) para observar las colonias características, las pruebas bioquímicas IMVIC (Indol, rojo de metilo, Vogues-proskawer y Citrato), TSI (Triple Sugar Iron), LIA (Lisina hierro), SIM (Sulfuro Indol Movilidad) y úrea se realizaron para la identificación (figura 7).

**Figura 5.**

Cepas de *Klebsiella pneumoniae*.



**Figura 6.**

Cultivo de *K. pneumoniae* en agar Mac Conkey



**Figura 7.**

*Identificación de Klebsiella pneumoniae.*



**A.** Citrato positivo, **B.** LIA (Lisina Hierro Agar): K/K **C.** TSI (Triple Sugar Iron): K/K **D.** Rojo de Metilo: negativo(amarillo) **E.** Vogues Proskawer positivo, **F.** Indol negativo, **G.** SIM (Sulfuro Indol Movilidad): negativo y **H.** Úrea positivo.

#### **4.2. Obtención de los extractos etanólicos de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.**

Se siguió el siguiente protocolo según lo indica Gonzalez (2004).

Una vez recolectadas las hojas de *M. mollis* (Benth.) Griseb., *A. subfusiformis* Ownbey y *S. americanum* Mill. de los lugares antes mencionados se llevó al Laboratorio de Microbiología Humana.

Estando en el Laboratorio, se procedió a lavar con abundante agua potable y las desinfectaremos con hipoclorito de sodio al 2%, seguidamente se volvió a lavar con agua destilada estéril, para eliminar el cloro residual.

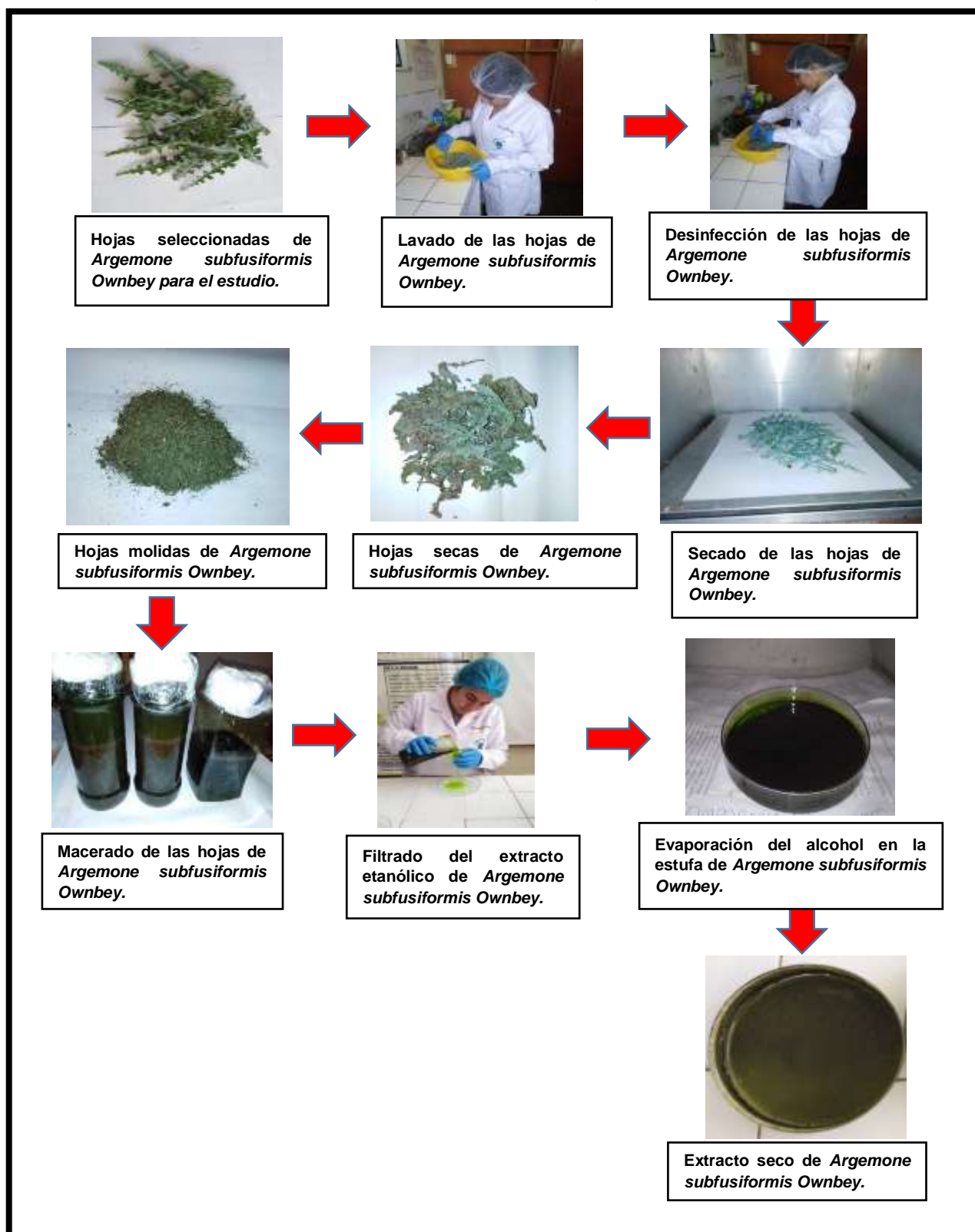
Las hojas se dejaron secar al medio ambiente bajo sombra o en la estufa a 37°C hasta que seque.

Una vez secas las hojas se molieron y luego pasaron a un frasco grande de vidrio de aproximadamente 1000mL de capacidad al cual se le agregó el doble de la porción de etanol al 96 %, es decir en proporción 1:2 para su posterior maceración por 7 días sin contacto con la luz solar. Pasados los 7 días, se procedió a filtrar, que se llevó a cabo con el papel filtro Whatman N° 1 y se colocó en crisoles para su evaporación (Figura 8).



**Figura 8.**

*Proceso de obtención de los extractos etanólicos de las hojas.*



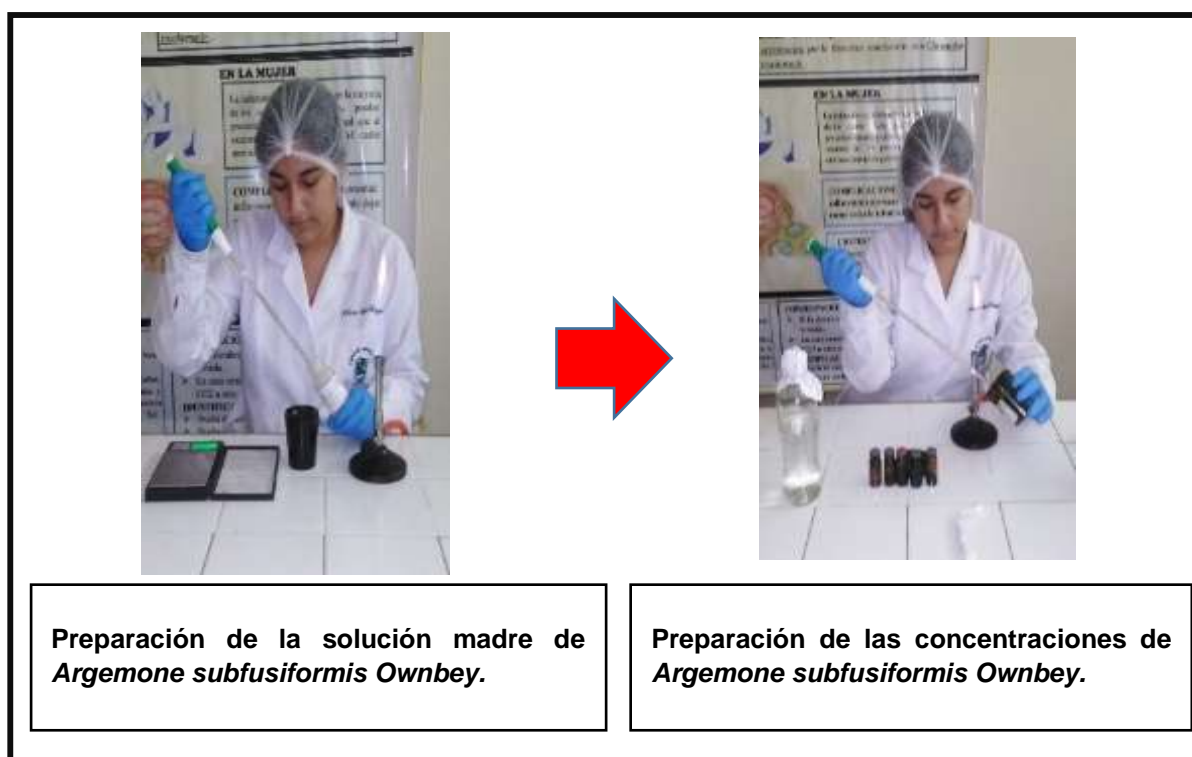
**4.3. Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.**

Del peso obtenido se agregó alcohol al 40 % (1:1), y así se obtuvo una concentración de 1000 mg/mL a la que se denominó “solución madre”.

Partiendo de la solución madre se procedió a realizar las respectivas diluciones para obtener las concentraciones de 200mg/mL, 400mg/mL, 600 mg/mL y 800mg/mL, tomando un volumen de la solución stock y completando con agua destilada estéril (Figura 9 y 10).

**Figura 9.**

*Preparación de la solución madre y de las concentraciones de Argemone subfusiformis Ownbey.*



**Figura 10.**

Concentraciones de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

**Tabla 1**

Concentraciones de los Extractos Etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. para el efecto inhibitorio.

Solución madre (mL)	Agua destilada estéril (mL)	Concentración (mg/mL)
2	0	1000*
1	0.25	800
1	0.66	600
1	1.5	400
1	4	200

Nota: \*Concentración de la solución madre.

#### 4.4. Preparación de discos de susceptibilidad

Se utilizó papel Whatman N° 01 del cual se obtuvo discos de 6 mm de diámetro con ayuda de un perforador.

Los discos se colocaron dentro de tubos de ensayo y fueron esterilizados en autoclave (15 Lb. de presión a 121 °C por 15 minutos).

Se dejó secar en horno a 80°C por 2 horas.

Posteriormente los discos se colocaron en cada una de las concentraciones del extracto etanólico de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. a 200mg/mL, 400mg/mL, 600mg/mL, 800mg/mL y 1000mg/mL, se dejó en reposo por 5 minutos para luego realizar la prueba de susceptibilidad.

Se tuvo en cuenta como control negativo etanol al 40%.

#### **4.5. Preparación del inóculo bacteriano según método descrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú**

Se utilizó solución salina fisiológica esterilizada como diluyente para estandarización hasta obtener una densidad poblacional semejante al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC / mL.

#### **4.6. Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer (Kinsbruy et al.,1991).**

En placas de Petri previamente estériles se sirvió entre 25 mL a 30 mL. de Agar Muller Hinton para *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Se dejó solidificar y se realizó el control de esterilización llevándolas a incubación a 37 °C por 24 horas.

Se introdujo el hisopo esterilizado dentro del inóculo estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo, luego se sembró superficialmente por estría en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar y se dejó secar durante diez minutos.

Se colocó los discos embebidos del extracto etanólico de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., en otras placas los discos correspondientes al extracto de *Argemone subfusiformis* Ownbey y en otras placas los discos del extracto de *Solanum americanum* Mill. que tengan las diferentes concentraciones descritas anteriormente y además el disco de control con etanol al 40% (Figura 11)

Posteriormente se llevó las placas a incubación a 37 °C por 24 horas. Trascurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (mm) y se registraron las medidas de cada una de las cepas.

**Figura 11.**

*Prueba de susceptibilidad bacteriana.*



**A.** Se sirvió placas de Agar Muller Hinton., **B y C.** Se introdujo el hisopo esterilizado dentro del inóculo estandarizado y se sembró en placas de Muller Hinton., **D.** Se colocó los discos en los extractos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.



#### 4.7. Prueba de identificación de CMI y CMB según el método de dilución en Caldo.

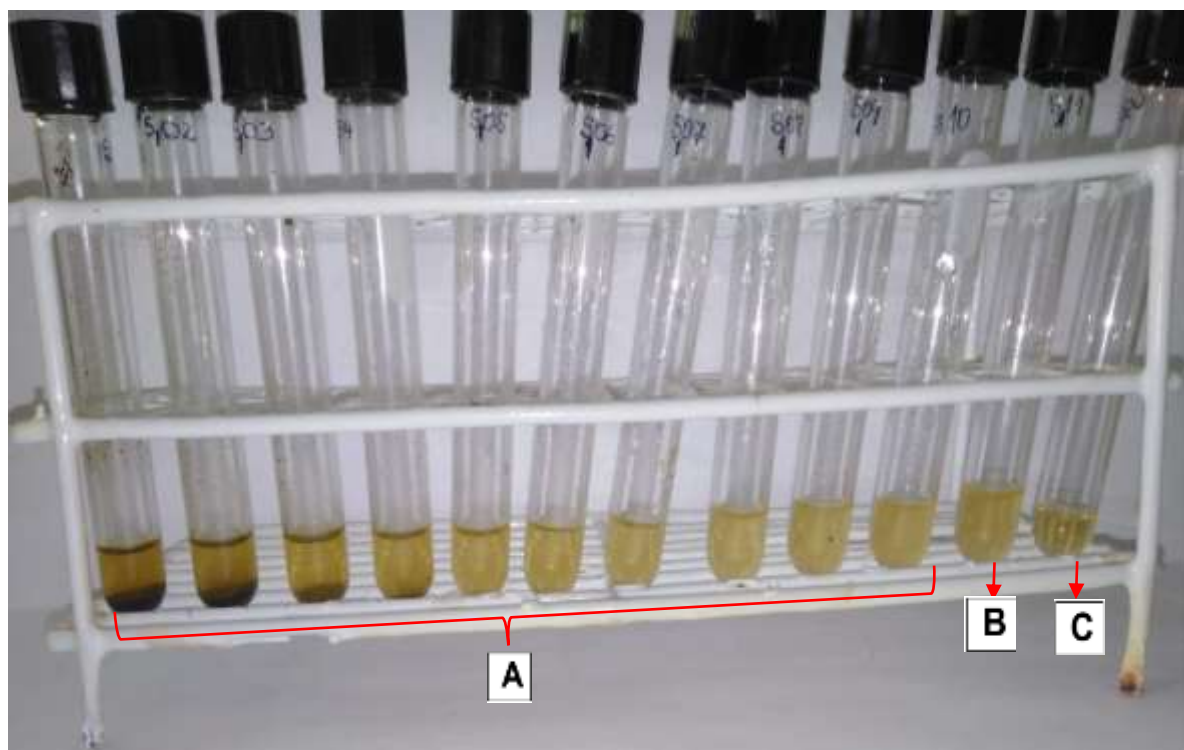
Se trabajó a partir de la concentración que hizo menos efecto inhibitorio y se diluyó hasta obtener concentraciones decrecientes del extracto, en tubos con un caldo nutritivo.

Un tubo de caldo nutritivo se mantuvo sin inocular como control negativo de crecimiento y otro sólo con el microorganismo sin añadirle a este el extracto etanólico que se utilice.

Después de un periodo de 18 a 24 horas de incubación adecuada se observó la turbidez de los tubos que indica el desarrollo bacteriano. (Figura 12)

**Figura 12.**

*Prueba de identificación de CMI y CMB.*



**A.** Concentraciones decrecientes del extracto., **B** Tubo con inóculo bacteriano. y **C.** Tubo sin inóculo bacteriano.

Posteriormente de los tubos que se observó el menor crecimiento bacteriano se procedió a sembrar en placas de Agar Tripticasa Soya previamente servidas y puestas a

control de esterilidad. Se utilizó un asa bacteriológica calibrada. Luego de incubarlas a 36°C por 24 horas se realizó el recuento de colonias de cada placa.

\*A partir de la CMI, se sembró una cantidad conocida de inóculo de cada uno de los tubos de caldo que no tienen turbidez en placas de agar, y el número de colonias que crece en estos subcultivos, después de incubar durante 18-24 horas, se comparará con el número de UFC/mL del cultivo original. La mínima concentración del agente antibacteriano que permitirá sobrevivir a menos de 0,1 % del inóculo original se denominará concentración bactericida mínima (CBM).

#### 4.8. Determinación de la toxicidad del extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Artemia salina* (camarón salino) en condiciones de laboratorio.

##### 4.8.1. Obtención de las concentraciones de la solución madre para el bioensayo.

En un recipiente estéril se colocó el extracto puro de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. y se procedió a realizar diluciones con agua de mar artificial esterilizada teniendo así diferentes concentraciones. Se repite el mismo procedimiento para *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

#### Tabla 2.

Concentraciones de los extractos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. para el bioensayo.

Solución madre (mL)	Diluyente (mL)	Concentración (%v/v)
1	9	50
0.6	9.4	30
0.4	9.6	20
0.2	9.8	10
0.1	9.9	5

Volumen total: 10 mL = 100%; solución madre: 500mg/mL; diluyente: agua de mar

##### 4.8.2. Reproducción de los cistos de *Artemia salina* (camarón salino).

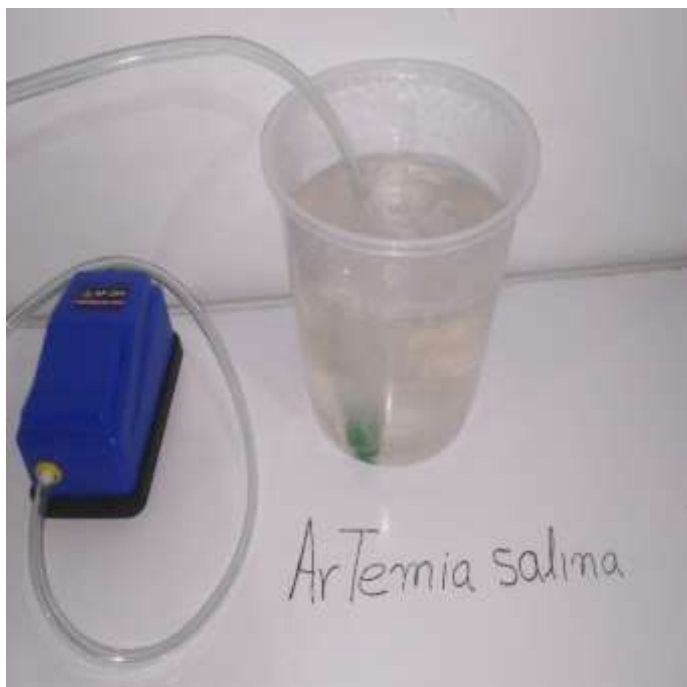
En un recipiente se distribuyeron aproximadamente 500 mg de cistos de *A. salina* certificados en 1 L de agua de mar artificial con oxigenación. Los cistos se incubaron a temperatura de ambiente y se expusieron por 1 hora a una fuente luminosa y 24 horas en oscuridad.

Se transfirieron los nauplios (organismos recién nacidos) con una pipeta Pasteur a otro recipiente con medio fresco y para ello se empleó una fuente luminosa que facilitó la transferencia de los nauplios, ya que estas son fototácticas. Se incubaron a 25°C por 24 horas más en oscuridad hasta que los nauplios alcanzaron el segundo estadio (metanauplios).

Al cabo de las 24 horas se seleccionaron las vivas y se desecharon las muertas y luego estuvieron listas para ser utilizadas como organismos de ensayo.

**Figura 13.**

*Incubación de Artemia salina.*





**Figura 14.**

*Metanauplios de Artemia salina.*



**4.8.3. Bioensayo para la determinación de toxicidad con Artemia salina.  
(Fernández-Calienes et al., 2009).**

Con una pipeta Pasteur se colocó 10 metanauplios de *A. salina* sobre 10mL de cada concentración, más dos tipos de controles un blanco con agua de mar artificial y un control positivo con Etanol.

Se incubó por 24 horas a temperatura de ambiente, en oscuridad. En este ensayo se realizó tres repeticiones para un mejor análisis de los resultados.

La lectura se realizó al cabo de 24 horas de contacto con las sustancias, se evaluó el nivel de mortalidad observando la movilidad frente a una luz. Se contó las larvas vivas y muertas posteriormente se anotaron en la hoja de registro de datos.

**Figura 15.**

Placas de Petri con diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. contiendo 10 metanauplios de *Artemia salina* cada uno.



## V. RESULTADOS

### 5.1. Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Mediante los resultados de la investigación se demostró que los extractos etanólicos de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. a concentraciones de 1000 mg/mL, 800 mg/mL, 600mg/mL, 400 mg/mL y 200 mg/mL presentaron efecto inhibitorio sobre *S. aureus*. Por lo contrario, no presentaron efecto inhibitorio sobre *K. pneumoniae* en las diferentes concentraciones (tabla 3).

**Tabla 3.**

Promedio de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* frente al extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey. y *Solanum americanum* Mill.

Concentración del extracto etanólico (mg/mL)	Promedio de los halos de inhibición (mm)					
	<i>M. mollis</i> (Benth.) Griseb.		<i>A. subfusiformis</i> Ownbey.		<i>S. americanum</i> Mill.	
	S. aureus	K. pneumoniae	S. aureus	K. pneumoniae	S. aureus	K. pneumoniae
<b>1000</b>	24	6	21	6	11	6
<b>800</b>	21	6	16	6	11	6
<b>600</b>	19	6	14	6	11	6
<b>400</b>	17	6	13	6	10	6
<b>200</b>	15	6	11	6	9	6

### 5.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Staphylococcus aureus*.

*M. mollis* (Benth.) Griseb. y *S. americanum* Mill presentaron un CMI y CMB sobre *S. aureus* de 90mg/mL y 200mg/mL respectivamente. Mientras que el extracto etanólico de *A. subfusiformis* Ownbey presentó diferentes valores para el CMI y CMB siendo 160mg/mL y 150mg/mL respectivamente.

**Tabla 4.**

Promedio de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Staphylococcus aureus*.

<i>M. mollis</i> (Benth.) Griseb.	<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	<i>S. americanum</i> Mill.
Concentraciones de los extractos etanólico(mg/mL)		
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
200	200	500
150	190	450
100	180	400
<b>CMI-90-CMB</b>	170	350
80	<b>CMI-160</b>	300
70	<b>CMB-150</b>	250
60	140	<b>CMI-200-CMB</b>
50	130	150
40	120	100
30	110	50

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, CMB: Concentración Mínima Bactericida

### 5.3. Toxicidad de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre metanauplios de *Artemia salina*.

En la tabla 5 se muestra el promedio de metanauplios muertos de *A. salina* a las 24 horas, donde *A. subfusiformis* Ownbey mató a los metanauplios en las 5 concentraciones, *M. mollis* (Benth.) Griseb y *S. americanum* Mill mostraron una menor letalidad en las dos primeras concentraciones.

**Tabla 5**

*Promedio de metanauplios de Artemia salina muertos a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de Argemone subfusiformis Ownbey, Minthostachys mollis (Benth.) Griseb. y Solanum americanum Mill.*

Concentración (mg/mL)	Población total	Extractos etanólicos		
		ASO	MM	SA
0	10	0	0	0
5	10	10	7	1
10	10	10	9	4
20	10	10	10	10
30	10	10	10	10
50	10	10	10	10
Alcohol de 96°	10	10	10	10

ASO: *Argemone subfusiformis* Ownbey; MM: *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb y

SA: *Solanum americanum* Mill.

#### 5.4. Análisis de varianza de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* frente a los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

De acuerdo a las Tablas 12 se evidenció la interacción para cada una de las variables estudiadas, observándose que existen diferencias significativas en las variables: extracto, concentración (CC), cepa, extracto\*CC, extracto\*cepa, donde se rechazan las hipótesis y no existe diferencia significativa entre CC\*cepa, extracto\*CC\*cepa, donde se aceptan las hipótesis.

#### HIPÓTESIS:

**H0-1:** No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

**H0-2:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

**H0-3:** No existen diferencias significativas entre las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*.

**H0-4:** No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las concentraciones utilizadas.

**H0-5:** No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las cepas bacterianas estudiada.

**H0-6:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

**H0-7:** No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos, las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

**Tabla 6.**

*Análisis de Varianza (ANOVA) de los Halos de Inhibición de Staphylococcus aureus frente a los extractos etanólicos de Minthostachys mollis (Benth.) Griseb., Argemone subfusiformis Ownbey y Solanum americanum Mill.*

efecto	SS	DF	MS	F	P	Decisión
<b>Extracto</b>	2757.44	2	1378.72	100.34	0.00	Rechaza H0-1
<b>CC</b>	1224.98	4	306.24	22.29	0.00	Rechaza H0-2
<b>cepa</b>	375.39	2	187.69	13.66	0.00	Rechaza H0-3
<b>extracto*cc</b>	354.78	8	44.35	3.23	0.00	Rechaza H0-4
<b>extracto*cepa</b>	293.81	4	73.45	5.35	0.00	Rechaza H0-5
<b>cc*cepa</b>	20.57	8	2.57	0.19	0.99	Acepta H0-6
<b>extracto*cc*cepa</b>	91.83	16	5.74	0.42	0.98	Acepta H0-7
<b>Error</b>	2473.20	180	13.74			

Nota: SS: Sum of squares (Suma de cuadrados) DF: Degree of freedom (grado de libertad) MS: Middle square (cuadrado medio) F: Test P: Probability (Probabilidad)

Por medio de la Prueba de significación de Tukey se observó que los extractos etanólicos empleados forman halos promedios muy distintos sobre *S. aureus*, siendo *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. el que presentó mayor efecto inhibitorio a diferencia de *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. (Tabla 7).

**Tabla 7.**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de los extractos etanólicos de Minthostachys mollis (Benth.) Griseb., Argemone subfusiformis Ownbey y Solanum americanum Mill.*

Extracto	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia $\alpha < 0.05$
<b><i>Solanum americanum</i> Mill.</b>	11.1	a
<b><i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey.</b>	14.9	b
<b><i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.</b>	19.7	c

En las diferentes concentraciones experimentales el efecto inhibitorio para las 4 concentraciones iniciales poseen ciertos grados de mezcla, por ejemplo, la concentración de 200 mg/mL y 400 mg/mL posee el mismo grado de significancia, pero la concentración de 200 mg/mL difiere de la concentración de 600 mg/mL, sin embargo, la concentración de 1000 mg/mL es diferente a todas las anteriores (Tabla 8).

**Tabla 8.**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición en las cinco concentraciones de los extractos etanólicos de Minthostachys mollis (Benth.) Griseb., Argemone subfusiformis Ownbey y Solanum americanum Mill.*

CC (mg/mL)	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia $\alpha < 0.05$
200	12.1	a
400	13.7	a b
600	15.3	b c
800	16.3	c
1000	18.9	d

Con respecto a las cepas empleadas de *Staphylococcus aureus* la cepa 2 y la cepa 3 presentan halos de inhibición muy similares y son las más resistentes, por otro lado, la cepa 1 es más sensible ya que presenta un halo de inhibición mayor (16.96 mm) (Tabla 9).

**Tabla 9.**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de Staphylococcus aureus frente a los extractos etanólicos de Minthostachys mollis (Benth.) Griseb., Argemone subfusiformis Ownbey y Solanum americanum Mill.*

Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia $\alpha=0.05$
2	13.8	a
3	15.0	a
1	16.9	b

Se demostró a través de la prueba de significación de Tukey el comportamiento de las variables “extracto\*concentración” con el cuál se determinó de acuerdo a los halos que forman, que el extracto *S. americanum Mill* en la concentración de 200 mg/mL presentó menor efecto inhibitorio (9.86mm) y el extracto *M. mollis (Benth.) Griseb.* en la concentración de 1000 mg/mL presentó mayor efecto inhibitorio (24.40 mm) que los demás extractos (Tabla 10).



Tabla 10.

Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición entre las 5 concentraciones y los extractos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

Extracto	CC (mg/mL)	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia $\alpha=0.05$				
<i>S. americanum</i> Mill.	200	9.9	a				
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	200	10.5	a	b			
<i>S. americanum</i> Mill.	400	10.7	a	b			
<i>S. americanum</i> Mill.	800	11.7	a	b	c		
<i>S. americanum</i> Mill.	600	11.7	a	b	c		
<i>S. americanum</i> Mill.	1000	11.7	a	b	c	d	
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	400	12.6	a	b	c	d	
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	600	14.7		b	c	d	e
<i>M. mollis</i> (Benth.)	200	15.9			c	d	e f
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	800	16.3				d	e f g
<i>M. mollis</i> (Benth.)	400	17.9				e	f g h
<i>M. mollis</i> (Benth.)	600	19.5				f	g h
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	1000	20.8					g h i
<i>M. mollis</i> (Benth.)	800	20.9					h i
<i>M. mollis</i> (Benth.)	1000	24.4					i

El comportamiento de las variables “extracto\*cepa” el cuál se determinó de acuerdo a los halos, señala que el extracto de *S. americanum* Mill presentó menor efecto inhibitorio y la cepa 2 mostró mayor resistencia (8.6 mm), por el contrario, el extracto de *M. mollis* (Benth.) Griseb. presentó mayor efecto inhibitorio y la cepa 1 tuvo mayor sensibilidad 22.24 mm (Tabla 11).

Tabla 11.

Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición entre los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. y las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Extracto	Cepa	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia $\alpha < 0.05$		
<i>S. americanum</i> Mill.	2	8.6	a		
<i>S. americanum</i> Mill.	3	10.8	a	b	
<i>S. americanum</i> Mill.	1	14.0		b	c
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	2	14.2			c
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	1	14.6			c
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	3	16.1		c	d
<i>M. mollis</i> (Benth.) Griseb	3	18.1			d
<i>M. mollis</i> (Benth.) Griseb	2	18.7			d
<i>M. mollis</i> (Benth.) Griseb	1	22.2			e

#### 5.5. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

En la tabla 12 se muestra la CMI<sub>50</sub> (concentración que inhibe al 50% de las cepas bacterianas) de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. las cuales presentaron valores de 84,4 mg/mL, 145 mg/mL y 194,8 mg/mL respectivamente.

**Tabla 12.**

Concentración Mínima Inhibitorio ( $CMI_{50}$ ) estimada y los límites de confianza de los extractos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

Extractos etanólicos	CMI <sub>50</sub> (mg/mL)	95% Limite de confianza	
		Inferior	Superior
<i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.	84,4	80,9	87,7
<i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey	145,0	141,3	148,6
<i>Solanum americanum</i> Mill.	194,8	-	-

**5.6. Evaluación de la toxicidad de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. sobre *Artemia salina*.**

La dosis letal (LC<sub>50</sub>) que presentan los extractos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. y *Solanum americanum* Mill. son 3,562 mg/mL y 13,791 mg/mL. respectivamente. En el caso de *Argemone subfusiformis* Ownbey no presentó un valor estadístico debido a que el número total de individuos expuestos mueren.

**Tabla 13.**

Relación de LC<sub>50</sub> estimada y los límites de confianza en la evaluación de la toxicidad de los extractos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

Extractos etanólicos	LC <sub>50</sub> (mg/mL)	95% Limite de confianza	
		Inferior	Superior
<i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.	3,6	1,4	5,0
<i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey	-	-	-
<i>Solanum americanum</i> Mill.	13,8	-	-

## VI. DISCUSIONES

Los resultados mostraron que los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. tuvieron efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* tal como lo afirma Torrenegra et al. (2016) quién demostró que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tiene acción antibacteriana contra *S. aureus* en un 92,8%. Por otro lado, Domínguez et al. (2010) demostraron que *Solanum americanum* a una concentración de 200 mg/mL tuvo un halo de inhibición no mayor de 12 mm para *Staphylococcus sp.* no necesariamente *S. aureus*.

Con respecto al extracto etanólico de *Argemone subfusiformis* Ownbey no existen estudios propiamente dichos que señalen la efectividad contra *S. aureus* sin embargo, basados en el estudio de Bhattacharjee et al. (2006). con otra especie del mismo género señala que los extractos de hojas y semillas de *Argemone mexicana* L. presentan efecto antibacterial sobre cepas de *S. aureus*.

Por lo contrario ninguno de los tres extractos etanólicos tuvieron efecto inhibitorio sobre *K. pneumoniae* sin embargo, Inga y Guerra (2000) demostraron mediante un estudio las propiedades bactericidas y bacteriostáticas del aceite esencial *Minthostachys mollis* sobre *K. pneumoniae* esto se puede explicar debido a que método de obtención del extracto es diferente ya que Inga y Guerra (2000) nos habla del aceite esencial de dicha planta mas no de un extracto etanólico y el estudio de Cano et al. (2008) reconoce que los aceites esenciales dependen de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas, así tenemos a los terpenoides que pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana, desacoplándola e interfiriendo en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP.

Otro factor por el cual los extractos etanólicos presentaron efecto sobre *S. aureus* se debe a la simple composición de la pared celular, la cual está constituida por peptidoglucano

y ácido lipoteicoico, por otra parte *K. pneumoniae* posee una cápsula, y una pared celular más compleja constituida por peptidoglucano y lipopolisacáridos que la hace más compleja y difícil de destruir.

Los componentes por lo cual las plantas poseen efecto antibacterial son los monoterpenos para *Minthostachys mollis* como lo demuestra Cano et al. (2008); los principios amargos para *Argemone subfusiformis* Ownbey (Cuellar, et al., 2013) y flavonoides, taninos y fenoles, triterpenos o esteroides, alcaloides, cumarinas y saponinas para el género *Solanum* como menciona Chang et al. (2013).

El estudio de Torrenegra et al. (2016) señala que la CMI del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Benth.) sobre *S. aureus* es de 500ug/mL mientras que el presente estudio realizado la CMI del extracto etanólico es de 90mg/mL.

Los resultados de toxicidad del extracto etanólico de *M. mollis* (Benth.) realizados sobre *Artemia salina* la  $LC_{50}$  es de 3,56mg/mL siendo relativamente inocuo. Por otro lado, el estudio de Rojas (2017) nos señala que el aceite esencial de *M. mollis* (Benth.) posee una concentración letal media de 14000ug/mL siendo relativamente inocuo, de acuerdo a los valores establecidos por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (Pinzón y Sánchez, 1995).

Con respecto a la toxicidad de *Argemone subfusiformis* Ownbey sobre *Artemia salina* en la cual el extracto mató a todos los especímenes a las 24 horas, indicaría que esta planta es tóxica como lo menciona Cieza y Castillo (2019) donde concluye que los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey sobre *Artemia salina* mostraron una  $LC_{50}$  de 552.868  $\mu$ g/mL, 562.790  $\mu$ g/mL y 578.515  $\mu$ g/mL para hojas, tallo y raíz respectivamente, presenta una ligera actividad citotóxica en los tres órganos según CYTED.

## VII.CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de las hojas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. a concentraciones de 1000 mg/mL, 800 mg/mL, 600mg/mL, 400 mg/mL y 200 mg/mL presentaron efecto inhibitorio sobre *S. aureus*. Por lo contrario, no presentaron efecto inhibitorio sobre *Klebsiella pneumoniae* en las diferentes concentraciones.

La CMI y la CMB de los extractos etanólicos sobre *Staphylococcus aureus* fue para *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. de 90mg/mL para ambas, en *Argemone subfusiformis* Ownbey es de 160mg/mL y 150mg/mL respectivamente y *Solanum americanum* Mill. es de 200mg/mL para ambas.

La LC<sub>50</sub> de los extractos etanólicos sobre *Artemia salina* a las 24 horas es para *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. 3.6mg/mL y para *Solanum americanum* Mill. 13,8mg/mL siendo ambas relativamente inocuo tomando como referencia los valores establecidos por el CYTED. Mientras que *Argemone subfusiformis* Ownbey desintegro a todos los especímenes del ensayo.

## VIII. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones para determinar la actividad antimicótica de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill.

Continuar con estudios fitoquímicos de las plantas *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb., *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill. para determinar la presencia y porcentaje de sus metabolitos secundarios.

Realizar estudios de la toxicidad del extracto etanólico de *Argemone subfusiformis* Ownbey sobre *Artemia salina* a concentraciones menores de 5mg/mL.

Seguir con el estudio de diferentes plantas medicinales, tanto de la región como del país que posean propiedades antibacterianas y a la vez evaluar su toxicidad con la finalidad de ampliar el conocimiento de la Fitoterapia; brindando así una alternativa económica para los problemas de salud.

## IX. REFERENCIAS

- Adanson, M. (2000). PAPAVERACEAE Adans. In *FLORA FANEROGÁMICA ARGENTINA - Familia de Plantas Parte II* (pp. 1–18). Retrieved from <http://www.floraargentina.edu.ar/wp-content/uploads/2019/01/PAPAVERACEAE-FUMARIACEAE.pdf>
- Aigaje, A., y Zurita, M. (2017). Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis*. *Dominio de Las Ciencias*, 3(1), 3–20. <https://doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.1.3-20>
- Altesor, P., González, A., y Schmidt, S. (2016). First report of *Tequus schrottkyi* (Konow) (Hymenoptera: Pergidae) in Uruguay, and information about its host plant and biology. *Biodiversity Data Journal*, 4(1). <https://doi.org/10.3897/BDJ.4.e7538>
- Arce, Z., y Asalde, R. (2012). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en trabajadores del centro integral de salud de la Universidad Católica Santo Toribio d e Mogrovejo-Chiclayo 2009. *Rev Cuerpo Med HNAAA*, 5(1), 2009–2011. Retrieved from [https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cuerpomedicohnaaa/v5n1\\_2012/pdf/a08v5n1.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cuerpomedicohnaaa/v5n1_2012/pdf/a08v5n1.pdf)
- Ariza, L., Barboza, G., Cantero, J., Núñez, C., y Pacciaroni, A. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34(1–2), 7–365. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11336/24328>
- Arokiyaraj, S., Saravanan, M., Udaya Prakash, N. K., Valan Arasu, M., Vijayakumar, B., y Vincent, S. (2013). Enhanced antibacterial activity of iron oxide magnetic nanoparticles treated with *Argemone mexicana* L. leaf extract: An in vitro study. *Materials Research Bulletin*, 48(9), 3323–3327. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.05.059>
- Baca, C. (2017). *Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” Minthostachys mollis sobre el*



*género Proteus, causantes de infecciones del tracto urinario* (Universidad Nacional del Altiplano). Retrieved from

[http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4777/Baca\\_Melo\\_Cynhia\\_Madein\\_e.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4777/Baca_Melo_Cynhia_Madein_e.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Bhattacharjee, I., Chatterjee, S., Chatterjee, S., y Chandra, G. (2006). Antibacterial potentiality of Argemone mexicana solvent extracts against some pathogenic bacteria. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(6), 645–648. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000600011>

Brako, L., y Zarucchi, J. (1993). Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.*, 45, 875.

Bravo, M., Hernández, N., Tereschuk, M., Romero, C., y Abdala, L. (2004). Minthostachys mollis Griseb. y Lepechinia meyenii (Walp.) Epling. Actividad antimicrobiana de sus extractos. Determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. *CIZAS*, 5(1 y 2), 7–23. Retrieved from [http://editorial.unca.edu.ar/Publicacione on line/CIZAS/imagenes/pdf/V5/1.pág.7-23.Bravo.pdf](http://editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20online/CIZAS/imagenes/pdf/V5/1.p%20g.7-23.Bravo.pdf)

Bustamante, S. (2018). *Evaluación del potencial antifúngico de los extractos etanólicos de Phyllanthus niruri y Minthostachys mollis frente al hongo Botrytis cinerea* (Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/9058/Bustamante\\_gs.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/9058/Bustamante_gs.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I., y Maki, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(3), 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00140-8)

Cachi, K., y Cueva, M. (2018). *Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de las hojas de Solanum nigrum L. “hierba mora” en cepas de*

- Pseudomonas aeruginosa* (UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO). Retrieved from <http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/803/FyB-019-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Calderón, G., y Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. In *Instituto de Ecología, A.C.* Retrieved from [https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora\\_del\\_Valle\\_de\\_Mx1.pdf](https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora_del_Valle_de_Mx1.pdf)
- Calixto, M. (2006). Plantas medicinales utilizadas en odontología: parte I. *Kiru*, 3(2), 80–85. Retrieved from <https://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2006rv2/Kiru7.pdf>
- Cano, C. (2007). Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña” (Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2573/Cano\\_pc.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2573/Cano_pc.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., y Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (MUÑA). *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, 25(3), 298–301. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2008.253.1281>
- Caño, T., y Menco, M. (2013). ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE VEGETAL *Solanum crinitipes* Dunal (Solanaceae) Y EVALUACIÓN DE USO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Carhuapoma, M. (2011). *Plantas aromáticas nativas del Perú* (CONCYTEC, Ed.). Lima - Perú.
- Carhuapoma, M., Lopez, S., y Roque, M. (2009). Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “RUYAQ MUÑA.” *Ciencia e Investigación*, 12(2), 83–89.

Retrieved

from

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3404/4499>

Carmona, E., Sandoval, S., y García, C. (2014). Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(2), 206–211. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2012.292.342>

Castañeda Sifuentes, R. Y. (2011). *Valor de uso de las plantas silvestres en Pamparomás, Áncash*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Castillo, E. (2010). Análisis fitoquímico y efecto sinérgico protector de las hojas de *minthostachys mollis* y *malva sylvestris* sobre la mucosa gástrica de *rattus rattus* var. *albinus* (Universidad Nacional de Trujillo). Retrieved from <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5417>

Ccallo, S. (2013). *Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del Minthostachys mollis (muña), frente a la actividad bacteriana de Streptococcus mutans y Porphyromonas gingivalis* (Universidad Nacional del Altiplano). Retrieved from [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/1905/Ccallo\\_Laucata\\_Sofia\\_Nancy.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/1905/Ccallo_Laucata_Sofia_Nancy.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Chang, L., Garcia, A., Rosabal, Y., Espinosa, A., Ramos, M., y Remon, H. (2013). Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* L. que crece en Cuba. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 44(4), 30–35. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n4/v44n4a4.pdf>

Chiarini, F., Gimelfarb, L., Juri, M., Montero, L., Ormeño, M., y Prosperi, A. (2012). Usos de plantas medicinales y aromáticas silvestres Chilecito-Famatina. *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca - Universidad Nacional de Chilecito*. Retrieved from <https://docplayer.es/51831091-Usos-de-plantas-medicinales-y-aromaticas-silvestres->

chilecito-famatina.html

- Chraibi, M., Farah, A., Lebrazi, S., Elamin, O., Iraqui Houssaini, M., y Fikri-Benbrahim, K. (2016). Antimycobacterial natural products from Moroccan medicinal plants: Chemical composition, bacteriostatic and bactericidal profile of *Thymus satureioides* and *Mentha pulegium* essential oils. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 836–840. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.08.002>
- Cieza, M., y Castillo, E. (2019). *Actividad antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de Argemone subfusiformis G.B. Ownbey "Cardo santo"*. (Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/11223/Cieza\\_hm.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/11223/Cieza_hm.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants* (Columbia University Press, Ed.). Nueva York.
- Cruz, C., y Morocho, L. (2013). Determinación De La Concentración Letal Media En Artemia Salina De Diez Extractos Hidroetanólicos De Especies De Plantas De Zamora Chinchipe. *Centro de Biotecnología*, 2(1), 25–33.
- Cuellar, N., Cosa, M., y Lujan, M. (2013). *Argemone subfusiformis* ( Papaveraceae ) especie nativa de interés etnomédico : su anatomía y aplicación en el control de calidad. *Arnaldoa*, 20(1), 69–82. Retrieved from [http://www.upao.edu.pe/Museo/pdf/Arnaldoa20\\_1/06Argemone\\_subfusiformis\\_\(Papaveraceae\).pdf](http://www.upao.edu.pe/Museo/pdf/Arnaldoa20_1/06Argemone_subfusiformis_(Papaveraceae).pdf)
- Custovic, A., Smajlovic, J., Hadzic, S., Ahmetagic, S., Tihic, N., y Hadzagic, H. (2014). Epidemiological Surveillance of Bacterial Nosocomial Infections in the Surgical Intensive Care Unit. *Materia Socio Medica*, 26(1), 7. <https://doi.org/10.5455/msm.2014.26.7-11>
- Defilipps, R., Maina, S., y Crepin, J. (2004). *MEDICINAL PLANTS OF THE GUIANAS (GUYANA , SURINAM , FRENCH GUIANA)*. Retrieved from

[http://www.sepanguy.com/files/ressources/DePhillips-&-al.-\(2004\)-medicinal-plants-of-the-guianas-\(guyana-surinam-french-guiana\).pdf](http://www.sepanguy.com/files/ressources/DePhillips-&-al.-(2004)-medicinal-plants-of-the-guianas-(guyana-surinam-french-guiana).pdf)

Díaz, H. (2016). *Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de Argemone mexicana ("Cardo santo")* (Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5069/Diaz\\_mh.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5069/Diaz_mh.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Domínguez, A., Rodríguez, R., Escobar, A., y Dutok, C. (2010). Toxicidad de extractos herbáceos sobre microorganismos aislados en infecciones nosocomiales. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 57(3), 148–153.

Fernández-Calienes, A., Mendiola, J., Monzote, L., García, M., Sariego, I., Acuña, D., Gutiérrez, y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*, 61(3), 254–258. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602009000300009&script=sci\\_arttext%5Cnhttp://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v61n3/mtr09309.pdf](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602009000300009&script=sci_arttext%5Cnhttp://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v61n3/mtr09309.pdf)

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), 23–39. Retrieved from <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3389/2810>

Garrity, G., Bell, J., Lilburn, T., y Lansing, E. (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Second Edition*. (May). <https://doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>

Gentile, A., Bakir, J., Ensínck, G., Cancellara, A., Casanueva, E., Firpo, V., y López, S. (2018). Infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad: hospitalización y riesgo de letalidad en 10 centros pediátricos de Argentina. *Archivos*

*Argentinos de Pediatría*, 116(1), 47–53. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.e47>

Goldsmith, J., y Thorpe's. (1967). *Dictionary of applied Chemistry*. (10°, Vol. 8). Londres: Editorial Sir Ian Heilbron.

Gonzales, A., Alcantar, D., Cuauhtli, M., Daza, C., Gayoso, C., Solache, G., y Alpuche, C. (2014). Multiresistant Extended - Spectrum  $\beta$  - Lactamase – Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing an Outbreak of Nosocomial Bloodstream Infection • Author ( s ): Artemio Gonzalez - Vertiz , MD ; Dolores Alcantar - Curiel , PhD ; Marcela Cuauhtli , Mejia , MD ; J. *Chicago Journals*, 22(May), 723–725.

Gonzalez, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Universidad Nacional de Colombia.

González, Y., y Aportela, P. (2001). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología*, 1(1), 104–108. Retrieved from [https://www.academia.edu/16931181/DETERMINACIÓN\\_DE\\_LA\\_TOXICIDAD\\_AGUDA\\_DEL\\_DICROMATO\\_DE\\_POTASIO\\_EN\\_LARVAS\\_DE\\_ARTEMIA\\_SALINA](https://www.academia.edu/16931181/DETERMINACIÓN_DE_LA_TOXICIDAD_AGUDA_DEL_DICROMATO_DE_POTASIO_EN_LARVAS_DE_ARTEMIA_SALINA)

Granados, C., Ortega, B., Chan, M., Reyes, M., y Camacho, J. (2016). Efecto del extracto etanolico de partes vegetales de argemone mexicana (papaveraceae) sobre larvas y pupas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (DIPTERA: CULICIDAE). *Entomologia Agrícola*, 3(1), 436–440. Retrieved from [http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2016/EA/Em\\_436-440.pdf](http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2016/EA/Em_436-440.pdf)

Herraiz, F., Villaño, D., Plazas, M., Vilanova, S., Ferreres, F., Prohens, J., y Moreno, D. (2016). Phenolic Profile and Biological Activities of the Pepino ( *Solanum muricatum* ) Fruit and Its Wild Relative *S. caripense*. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 394. <https://doi.org/10.3390/ijms17030394>

Huamani, W. (2015). “*Estudio de compuestos bioactivos del aceite esencial de muña (Minthostachys mollis) por cromatografía de gases-espectrometría de masas en tres*

- niveles altitudinales del distrito de Huando*” (Universidad Nacional de Huancavelica). Retrieved from [http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/116/TP\\_UNH\\_AGROIND\\_0030.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/116/TP_UNH_AGROIND_0030.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Inga, B., y Guerra, M. (2000). *Efecto del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. (2014). Boletín de la Comisión Nacional contra la Biopiratería, Boletín de Muña. In *Comisión Nacional contra la biopiratería*. Retrieved from [https://www.indecopi.gob.pe/documents/20182/143803/boletin\\_intro\\_munia.pdf](https://www.indecopi.gob.pe/documents/20182/143803/boletin_intro_munia.pdf)
- Instituto Nacional de Salud. (2011). Boletín Semanal Instituto Nacional de Salud. *Boletín Semanal Instituto Nacional de Salud*, 20, 1–7. Retrieved from <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/boletin/pdf/BOLETIN202011.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. (2014). *Boletín Epidemiológico (Lima), Semana Epidemiológica N° 34. (Vol. 23)*. Retrieved from <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2014/34.pdf>
- Kinsbruy, D., Warner, R., & Seagel, G. (1991). *Manual de Microbiología Médica* (Orientació). España.
- Lamien-Meda, A., König, K., Mischka, M., Meda, R., Compaoré, M., Kiendrebeogo, M., y Novak, J. (2014). Argemone Mexicana. *Austria*, (September 2012-2014), 45–45. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71095-0\\_787](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71095-0_787)
- López, G. (2006). *Actividad antibacteriana del aceite esencial de Minthostachys mollis “ruyac muña” Ayacucho*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho.
- Luján, M., Barboza, G., Dottori, N., y Gil, R. (2002). *Caracterización morfo-anatómica de plantas medicinales argentinas y su aplicación en el control de calidad*. Retrieved from

<https://catalogo.biblio.unc.edu.ar/Record/quimicas.5721/Details>

Malpartida, F. (2010). *“Efecto Inhibidor del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de Enterococcus faecalis. Estudio in vitro. Lima 2009”* (Universidad Alas Peruanas). Retrieved from <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/FEDERICOMARTINMALPARTIDAQUISPE.pdf>

Manske, R. (1975). *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. (Vol. 15). <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1932.tb53124.x>

Martin, R., y Bachman, M. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(4), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>

Martínez, M., Hernández, N., Apaulaza, K., Díaz, M., y Cordero, A. (2016). Portadores asintomáticos nasal y faríngeo de *Staphylococcus aureus* en trabajadores de un hospital pediátrico Nasal and pharyngeal asymptomatic carriers of *Staphylococcus aureus* in pediatric-hospital workers. *Ciencias Médicas de Pinar Del Río*, 20(3), 298–305. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rpr/v20n3/rpr07316.pdf>

Miller, P. (1768). *The gardeners dictionary*. Retrieved from <https://www.biodiversitylibrary.org/item/10276#page/4/mode/1up>

Mora, F. D., Araque, M., Rojas, L. B., Ramírez, R., Silva, B., y Usubillaga, A. (2009). Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) griseb vaught from the Venezuelan Andes. *Natural Product Communications*, 4(7), 997–1000. <https://doi.org/10.1177/1934578x0900400726>

Mostacero, J., Mejía, F., y Gamarra, O. (2002). *Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú*. (Vol. 1; Concytec, Ed.). Trujillo - Perú.

Munguia, C. (2000). *Estudio comparativo del aceite esencial de Minthostachys mollis (Kunth)*



*Griseb “Muña” de 3 regiones peruanas por GC-MS.*

Organización Mundial de la Salud. (2000). Regional Meeting on Regulatory Aspects of Herbal Products. 13 – 16 de Noviembre de 2000. *Informe Final, Washington DC. Washington, DC. Oficina Regional Del La OMS Para Las Américas/Organización Panamericana de La Salud.*

Organización Mundial de la Salud. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. In *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>

Ownbey, G. (1961). The Genus *Argemone* in South America and Hawaii. *Brittonia*, 13(1), 91–109. <https://doi.org/10.2307/2805287>

Palacios, J. (1997). *Plantas medicinales nativas del Perú*. (1ra ed.). Retrieved from [http://biblioteca.cultura.pe:8020/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=551&query\\_desc=an%3A1537](http://biblioteca.cultura.pe:8020/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=551&query_desc=an%3A1537)

Peña, R. (2002). El género *Argemone* (Papaveraceae) en Chile. Retrieved from Chloris Chilensis website: <https://www.chlorischile.cl/argemone/ArgemoneFromChile.htm>

Pino, O., y Jorge, F. (2010). Artemia Bioassay: Useful Working Tool for Ecotoxicologists and Chemists of Natural Products. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), 34–43. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n1/rpv08110.pdf>

Pinzón R, y Sánchez C. (1995). Manual de Técnicas de Investigación: CYTED. Subprograma X. Química fina farmacéutica; 45-47.

Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2004). *Microbiología*. Madrid - España.

Quispe, K. (2017). *Efecto antiespasmódico y toxicidad aguda del extracto acuoso de las hojas del Solanum americanum Muller (Ñushco)* (Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/7311/Quispe\\_nk.pdf?seque](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/7311/Quispe_nk.pdf?seque)

nce=1&isAllowed=y

- Rojas, O. (2017). *Evaluación fitoquímica y actividad anti-helicobacter pylori del aceite esencial de Minthostachys mollis "muña" en pacientes con gastritis del Hospital Militar Central* (Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/9628>
- Ruiz, M. (2016). *Efecto inhibitorio in vitro del extracto alcohólico de Rosmarinus officinalis y Argemone mexicana sobre el crecimiento de Escherichia coli productora de betalactamasa de espectro extendido*. (Universidad Nacional De Trujillo). Retrieved from [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/2564/TESIS\\_MAESTRÍA\\_MIGUEL\\_ANGEL\\_RUIZ\\_BARRUETO.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/2564/TESIS_MAESTRÍA_MIGUEL_ANGEL_RUIZ_BARRUETO.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Salas, A. (2016). *Efecto antimicótico del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) en cepas de Candida albicans. Puno - 2015*. (Universidad Nacional Del Altiplano). Retrieved from [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3339/Salas\\_Apaza\\_Alex\\_Mario.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3339/Salas_Apaza_Alex_Mario.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Salgado, I. (2001). La Artemia y su cultivo en el Perú. *Universidad Nacional de Piura*, 113. Retrieved from [http://portal.unap.cl/~cordunap/archivos/amunoz/Nutrici%F3n\\_y Enfermedades/La Artemia y su Cultivo.pdf](http://portal.unap.cl/~cordunap/archivos/amunoz/Nutrici%F3n_y Enfermedades/La Artemia y su Cultivo.pdf)
- Schmidt, F. (1985). Optical motility test for the detection of Trichothecenes using Brine shrimp. *Mycotoxin Research*, 1(1), 25–29. <https://doi.org/10.1007/BF03191951>
- Sotta, N. (2000). *Plantas aromáticas y medicinales de la región Arequipa* (CEPRORUI.). Retrieved from <https://catalog.hathitrust.org/Record/101245451/Cite>
- Stashenko, E. (2009). Aceites Esenciales. In *Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales* (Vol. 1).

- Toppino, L., Barchi, L., Lo Scalzo, R., Palazzolo, E., Francese, G., Fibiani, M., y Rotino, G. (2016). Mapping quantitative trait loci affecting biochemical and morphological fruit properties in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00256>
- Torrenegra, M., Granados, C., Durán, M., León, G., Yáñez, X., Martínez, C., y Pájaro, N. (2016). Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia*, 20(1), 69–74. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v20n1/v20n1a08.pdf>
- Vanhaecke, P., & Persoone, G. (1984). The ARC-Test: A standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and Evaluation. *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, 2(January 1984), 143–157. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(78\)80003-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(78)80003-7)
- Varas, R. (2009). *Efecto citoprotector y antisecretor gástrico del extracto acuoso de Solanum americanum Mill (Hierba mora) en inducción de úlcera gástrica en ratas* (Universidad Nacional Mayor de San Marcos.). Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/225/Varas\\_pr.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/225/Varas_pr.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vibrans, H. (2009). *Solanum americanum* - ficha informativa. Retrieved June 18, 2020, from Malezas de México website: [http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/solanum-americanum/fichas/ficha.htm?fbclid=IwAR3nJxA6uvvt6n0Rp-3vu2kpJlzWVtc040g3pG\\_pvh45FNXqehYWEExG4PkM](http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/solanum-americanum/fichas/ficha.htm?fbclid=IwAR3nJxA6uvvt6n0Rp-3vu2kpJlzWVtc040g3pG_pvh45FNXqehYWEExG4PkM)
- Vidal, J., Carbajal, A., Sisniegas, M., y Bobadilla, M. (2008). Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. *Revista Peruana de Biología*, 15(2), 103–109. <https://doi.org/10.15381/rpb.v15i2.1733>

- Warikoo, R., y Kumar, S. (2013). Impact of *Argemone mexicana* extracts on the cidal, morphological, and behavioral response of dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 112(10), 3477–3484. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3528-7>
- World Health Organization, Comité Regional para el Pacífico Occidental, 052. (2001). The Work of WHO in the Western Pacific Region. Report of the Regional Director, 1 de julio de 2001 – 31 de junio de 2001. In Manila: Oficina Regional de la OMS para el Pacífico Occidental (Ed.), *World Health Organization*. Retrieved from Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific website: <http://iris.wpro.who.int/handle/10665.1/7580>
- World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva: World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en.%0A%0A>



**Figura 17.**

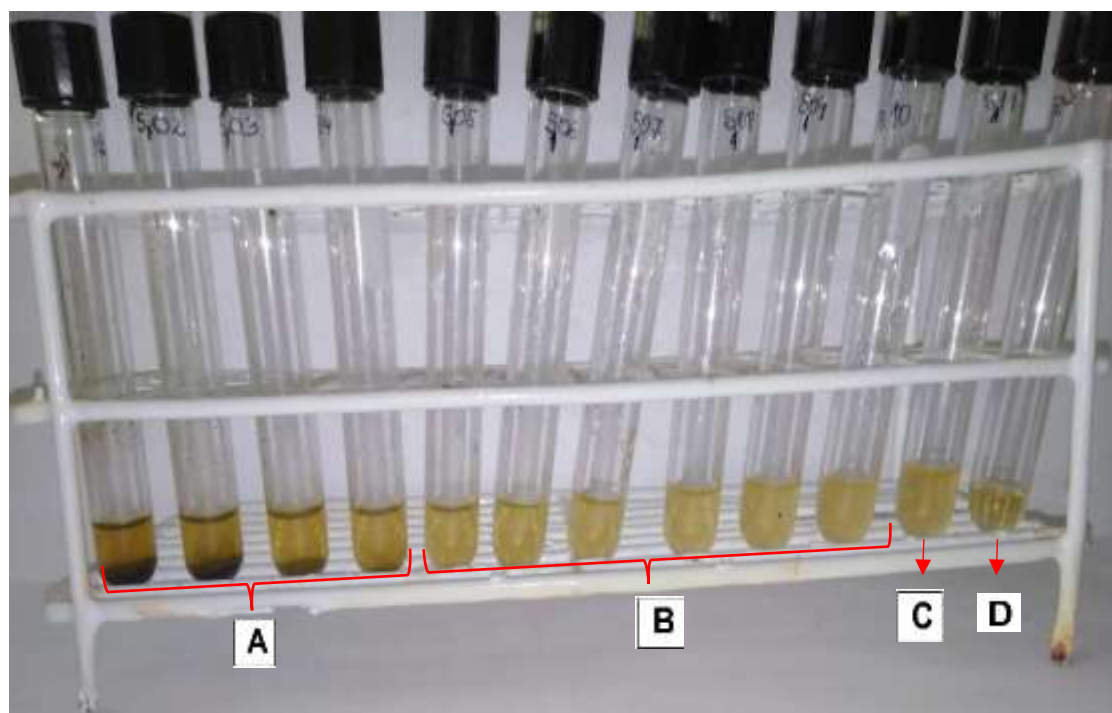
*Placas de Petri que demuestran las cinco repeticiones de que existe efecto inhibitorio de Minthostachys mollis (Benth.) Griseb. sobre Staphylococcus aureus.*



### Anexo 3.

**Figura 18.**

*Método de dilución en tubo: CMI y CMB de Minthostachys mollis (Benth.) Griseb.*



**A:** Tubos sin turbidez **B:** Tubos con turbidez **C:** Tubo con inóculo **D:** Tubo sin inóculo

**Anexo 4.***Especies botánicas***Figura 19.**

*Planta Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb.



**Figura 20.**

*Planta Argemone subfusiformis* Ownbey.





**Figura 21.**

*Planta Solanum americanum Mill.*



### Anexo 5.

*Fotografías del bioensayo de toxicidad sobre Artemia salina*

**Figura 22.**

*Concentraciones madre de los extractos etanólicos con agua marina para el bioensayo de toxicidad con Artemia salina.*



**Figura 23.**

*Preparación de las concentraciones de los extractos etanólicos con agua marina para el bioensayo de toxicidad con Artemia salina.*



**Figura 24.**

Concentraciones preparadas de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb. *Argemone subfusiformis* Ownbey y *Solanum americanum* Mill para ser utilizadas en el bioensayo de toxicidad de *Artemia salina*.



### Anexo 6.

#### Tablas de las repeticiones del Bioensayo de *Artemia salina*

**Tabla 15.**

*Registro de Artemia salina muertas a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de Argemone subfusiformis Ownbey.*

Concentración (mg/mL)	Población total	N° Ensayos		
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	10	0	0	0
5	10	10	10	10
10	10	10	10	10
20	10	10	10	10
30	10	10	10	10
50	10	10	10	10
Alcohol de 96°	10	10	10	10

**Tabla 16.**

*Registro de Artemia salina muertas a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de Minthostachys mollis (Benth.) Griseb.*

Concentración (mg/mL)	Población total	N° Ensayos		
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	10	0	0	0
5	10	7	8	6
10	10	8	9	9
20	10	10	10	10
30	10	10	10	10
50	10	10	10	10
Alcohol de 96°	10	10	10	10

**Tabla 17.**

*Registro de Artemia salina muertas a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de hojas de Solanum americanum Mill.*

Concentración (mg/mL)	Población total	N° Ensayos		
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<b>0</b>	10	0	0	0
<b>5</b>	10	1	0	1
<b>10</b>	10	2	4	5
<b>20</b>	10	9	10	10
<b>30</b>	10	10	10	10
<b>50</b>	10	10	10	10
<b>Alcohol de 96°</b>	10	10	10	10

### Anexo 7.

*Constancia de identificación de las plantas trabajadas.*



## HERBARIO

### PEDRO RUIZ GALLO "PRG"

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



### CONSTANCIA

LA DIRECCIÓN DEL HERBARIO PRG DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO, QUE SUSCRIBE,

**Hace constar:**

Que, los señores: MARIA MILENA VERA GONZALES Y CESAR ORDINOLA BECERRA, estudiantes de la escuela de Biología de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Pedro Ruiz Gallo, han hecho llegar al Herbario PRG 03 muestras botánicas (cardo santo, muña y hierba mora), como parte de su proyecto de tesis: Efecto inhibitorio in vitro de extractos etanólicos de poleo, cardo santo y hierba mora sobre *Staphylococcus aureus* y *klebsiella pneumoniae* y toxicidad sobre *Artemia salina* en condiciones de laboratorio, las mismas que han sido identificadas:

Nombre Común	Nombre científico	Familia
Cardo Santo	<i>Argemone subfusiformis</i> Ownbey	Papaveraceae
Poleo	<i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.	Lamiaceae
Hierba mora	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Solanaceae

Lambayeque, 27 de diciembre del 2019




MSc. Josefa Ecurra Pulcón



**Anexo 8.**

*Constancia de identificación de las cepas bacterianas trabajadas.*



**UNPRG** | UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO

**CONSTANCIA**

El jefe de Laboratorio de Microbiología Humana de la Especialidad de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, deja constancia de que las cepas bacterianas otorgadas al Bach. César Manuel Ordinola Becerra y a la Bach. María Milena Vera Gonzales para a realización de su proyecto de tesis, pertenecen a las especies *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Lambayeque, 17 de diciembre del 2019

Dr. Mario Moreno Mantilla  
Jefe del Laboratorio de Microbiología Humana