

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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “*in vitro*” DEL ACEITE
ESENCIAL DE MENTA (*Mentha piperita* L.) FRENTE A
Escherichia coli ENTEROPATÓGENA (EPEC).**

TESIS

PRESENTADO POR:

Br. JHONNY ZUNI MAMANI

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PUNO – PERÚ

2017

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




ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “*in vitro*” DEL ACEITE ESENCIAL DE MENTA (*Mentha piperita* L.) FRENTE A *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA (EPEC).


TESIS
 PRESENTADO POR:
 Br. JHONNY ZUNI MAMANI


PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
 LICENCIADO EN BIOLOGÍA
 FECHA DE SUSTENTACIÓN: 10 DE MAYO DEL 2017

APROBADO POR EL JURADO REVISOR:

PRESIDENTE : 
 M.Sc. Eva Laura Chauca De Meza

PRIMER MIEMBRO : _____
 Lic. Hilver Charca Mamani

SEGUNDO MIEMBRO : 
 Mg. Dante Mamani Sairitupac

DIRECTOR DE TESIS : 
 Mg. Ciria Ivonne Trigos Rondón

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

DEDICATORIA

A Dios por brindarme en mi vida
esperanza, por sus bendiciones y por ser
guía de mis pasos, por darme la
oportunidad de seguir aprendiendo cada
día más en mi vida.

Le dedico este trabajo a mis queridos
padres, Eusebio y Julia Marina (+) por ser
los formadores de mis valores morales y
espirituales, por su ayuda incondicional,
su apoyo motivación para seguir adelante
y cumplir con mis objetivos.

A toda mi familia quienes me apoyaron
todo iniciativa de estudio y comprensión.

JHONNY ZUNI

AGRADECIMIENTO

- A mi alma mater Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas, por darme la oportunidad de estudiar una profesión, que en sus aulas adquiriré conocimientos y experiencias inolvidables.
- Con gratitud a la Mg. Ciria Ivonne Trigos Rondon. Directora de la tesis, por la confianza y apoyo depositado en mi persona para la realización del presente trabajo, así por la paciencia, dedicación, sugerencias, constante seguimiento y culminación del trabajo de investigación.
- A los miembros del jurado: M. Sc. Eva Laura Chauca, Mg. Dante Mamani Sairitupac por haber contribuido en el enriquecimiento y sugerencia al trabajo de tesis.
- Con gratitud al Mg. Dante Mamani Sairitupac, por sus consejos, sugerencias y apoyo del trabajo de investigación.
- Al Blgo. Ronnie Gavilan Chavez, por su apoyo, amistad y colaboración incondicional.
- Al técnico del laboratorio Hugo Vargas Mamani encargado del Laboratorio de Taller de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Ciencias Agrarias, por el apoyo en la extracción de aceite esencial.
- Al técnico Melitón Condori del laboratorio de Microbiología de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Biología, por su colaboración incondicional en mi trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Objetivo General	12
1.2. Objetivos Específicos.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1. Antecedentes	13
2.2. Marco Teórico.....	17
2.2.1. Plantas Medicinales.....	17
2.2.2. Aceites esenciales.....	18
2.2.3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.....	19
2.2.4. Menta (<i>Mentha piperita</i> L.).....	22
2.2.5. <i>Escherichia coli enteropatogena</i> (EPEC)	27
2.3 Marco Conceptual.....	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Área de estudio.....	35
3.2. Tipo de estudio.....	35
3.3. Población y muestra.....	35
3.4. Diseño de investigación	36
3.5. Metodología:	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de menta frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	45
4.2. Para la comparación del efecto inhibitorio del aceite esencial de menta y el antibiótico tetraciclina.....	49
V. CONCLUSIONES	54
VI. RECOMENDACIONES	55
VII. REFERENCIAS	56
VIII. ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de patogénesis de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	30
Figura 2. Inhibición porcentual (%) por acción antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de menta frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	50
Figura 3. Halos de Inhibición (mm) por acción antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de la menta (<i>Mentha piperita</i> L.) frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	67
Figura 4. Tallo de Menta (<i>Mentha piperita</i> L.).	69
Figura 5. Secado y pesado de las hojas y tallos de menta (<i>Mentha piperita</i> L.).	69
Figura 6. Extracción del aceite esencial de menta por arrastre a vapor de agua.	70
Figura 7. Reactivación de la cepa de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC) en medio de cultivo Agar Mac Conkey.	70
Figura 8. Colonias de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC) sin tratamiento con el aceite esencial de menta.	71
Figura 9. Prueba de efecto inhibitorio por difusión en placa.	71
Figura 10. Efecto inhibitorio del aceite esencial sobre <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) en medio Müller Hinton.	71
Figura 11. Aceite esencial de menta (<i>Mentha piperita</i> L.)	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Diseño del experimento, concentraciones y número de repeticiones.	36
Tabla 2.	Comparación del aceite esencial de menta con el antibiótico tetraciclina.	36
Tabla 3.	Tabla estandarizada de medida de halos de inhibición (mm).	43
Tabla 4.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) por acción antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de menta frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	45
Tabla 5.	Inhibición (%) antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de la menta (<i>Mentha piperita</i> L.) frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	49
Tabla 6.	Análisis de varianza para inhibición (%) antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de la menta (<i>Mentha piperita</i> L.) frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	50
Tabla 7.	Prueba de rango múltiple de Tukey para Inhibición (%) antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial de la menta (<i>Mentha piperita</i> L.) frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	51
Tabla 8.	Formación de halos de inhibición.	66
Tabla 9.	Inhibición porcentual del aceite esencial respecto al de Tetraciclina.	66
Tabla 10.	Halos de Inhibición (mm) antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de la menta frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	67
Tabla 11.	Análisis de varianza para halos de Inhibición (mm) antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de menta frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	68
Tabla 12.	Prueba de rango múltiple de Tukey para halos de Inhibición (mm) antibacteriana “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de menta frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	68

ABREVIATURAS

EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
°C	grado centígrado
μl	microlitro
A/E	Adherencia, esfacelamiento
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American typed culture collections
BFP	Bundle Forming Pilus
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EDAs	Enfermedades diarreicas agudas
INS	Instituto Nacional de Salud
kDa	kilodalton
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
TIA	Tasa de incidencia acumulada
Tir	Translocated intimin receptor
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

El estudio Actividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, durante los meses de agosto a diciembre del 2016, cuyos objetivos fueron determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial y comparar el efecto inhibitorio respecto a la Tetraciclina. La extracción del aceite esencial se realizó por el método de arrastre a vapor de agua. La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó por el método de dilución en placa a dosis de 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2.5 y 5 % respectivamente. Para la comparación inhibitoria se empleó el método de difusión en placa a dosis de 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl y 30 µl de aceite esencial, teniendo como control positivo el antibiótico Tetraciclina 30 µg. Se aplicó estadística descriptiva, análisis de varianza y prueba de rango múltiple de Tukey. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a EPEC, “*in vitro*” fué 2.5 %. Se determinó además que el efecto de la inhibición comparativo porcentual del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena respecto al control positivo (Tetraciclina) fue de 54,20 % a una dosis aplicable de 30 µl por disco de sensibilidad de aceite esencial, en donde para la fuente de variación de dosis se obtuvo diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.0001$).

Palabras clave

Aceite esencial, Menta, actividad antibacteriana, *Escherichia coli* (EPEC) susceptibilidad

ABSTRACT

SUMMARY

The study “*in vitro*” antibacterial activity of peppermint essential oil (*Mentha piperita* L.) against Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) was carried out in the Laboratory of Microbiology of the Faculty of Biological Sciences of the National University of the High Plateau of Puno, during the Months from August to December 2016, whose objectives were to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil and compare the inhibitory effect with respect to Tetracycline. The extraction of the essential oil was carried out by the method of drag to steam of water. The minimum inhibitory concentration (MIC) evaluation was performed by plate dilution method at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2.5 and 5 %. For the inhibitory comparison, the plate diffusion method was used at concentrations of 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, and 30 µl of essential oil, with the antibiotic Tetracycline as a positive control. Descriptive statistics, analysis of variance and Tukey's multiple rank test were applied. The minimum inhibitory concentration (MIC) of peppermint oil (*Mentha piperita* L.) versus EPEC “*in vitro*” was 2.5 %. It was further determined that the effect of percent inhibition of essential oil of mint against enteropathogenic *Escherichia coli* relative to the positive control (Tetracycline) was 54.20 % at an applicable dose of 30 µl per essential oil sensitivity disc, wherein for The source of variation of concentrations was obtained statistically significant difference ($p < 0.0001$).

Keywords

Essential oil, Peppermint, antibacterial activity, *Escherichia coli* (EPEC), susceptibilit

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas (EDA) son comunes en todo el mundo, provocadas por muchos microorganismos siendo las más frecuentes por enterobacterias como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) causante de enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos. Afecta a los niños en los primeros años de vida. Las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años, ocasionando la muerte de 760 000 niños (OMS, 2013). En el Perú, las EDA siguen siendo un importante problema de salud pública, especialmente en la niñez. En el primer trimestre del 2014 se notificaron 293 550 episodios de diarrea aguda en todas las edades, con una tasa de incidencia acumulada (TIA) de 9,5 por mil habitantes. La Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (ENDES 2014) muestra que la prevalencia de diarrea entre niñas y niños menores de cinco años alcanzó 12,1 %, En la Región de Puno para el año 2016 hasta el mes de junio se reportaron un total de 174,343 casos de diarreas en niños menores de 5 años (DIRESA, 2016).

Aproximadamente, el 60 % de la población mundial utiliza plantas y productos derivados de ellas en su medicación, los cuales son considerados como una de las “medicinas” de gran importancia por su efectividad terapéutica (Araujo, 2008). La medicina tradicional, en los últimos años ha cobrado importancia como una terapia alternativa al uso de medicamentos sintéticos producidos en la industria farmacéutica, los cuales producen toxicidad, recurrencia o causan resistencia (Wen *et al.*, 2011). La flora peruana es muy rica en especies a las que la medicina tradicional atribuye propiedades terapéuticas (Benavides, 2010). La riqueza, uso y origen de plantas medicinales expendidas constituyen un aporte importante para el conocimiento local y regional de estos recursos, tal es así que por ejemplo en mercados como los de la ciudad del Cusco, las plantas, las infusiones o “mates calientes” abarcaron el 69 % de tratamiento de afecciones, entre las que se incluyen: las inflamaciones renales y hepáticas, dolencias gastrointestinales y afecciones broncopulmonares (Huamantupa *et al.*, 2011). En Puno las plantas medicinales como la menta (*Mentha piperita* L.) se vienen utilizando ancestralmente, es consumida por muchos pobladores del área rural en forma de infusión para aliviar dolores estomacales, también tiene eficacia contra la flatulencia y el mal de altura.

La presente investigación tiene importancia científica y social ya que aportará al conocimiento, la menta como planta medicinal con propiedades antibacterianas, las cuales podrían ser alternativas de prevención y tratamiento de la patología más frecuente como las enfermedades diarreicas. La menta, es usado para combatir enfermedades digestivas, flatulencias, entre otras, de origen infeccioso, podría ayudar a prevenir y tratar las enfermedades de importancia gastrointestinal, por sus propiedades antibacterianas, con pocos o ningún efecto colateral indeseable, permitiendo que las poblaciones de bajo recursos económicos puedan acceder a un medicamento natural y de menor costo, de esa manera, la presente investigación brindará una alternativa de tratamiento en el control de microorganismos relacionados con las enfermedades diarreicas. Por lo considerado se plantearon los siguientes objetivos.

1.1. Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de la menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) “*in vitro*” del aceite esencial de menta (*Mentha. piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).
- Comparar el efecto inhibitorio “*in vitro*” del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) con el antibiótico Tetraciclina frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Se estudió la actividad antimicrobiana de 17 terpenoides, de menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum sp.*) salvia (*Salvia fructicosa*), frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, demostrando que los terpenoides poseían actividad antibacteriana, concluyendo que *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, fueron más sensibles en comparación a *Staphylococcus aureus* (Maguna *et al.*, 2006), así también estudiaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de la mandarina (*Citrus reticulata*) variedad Dancy, sobre *Bacillus subtilis*, *S. aureus* ATCC259923, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC27853, y *Escherichia coli* ATCC25922, a concentraciones de 1; 10, 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 y 100 %. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* a toda las concentraciones excepto al 1%. La CMI de la mandarina para *Bacillus subtilis* fue de 19 % y 17 % para *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Martínez *et al.*, 2003).

Realizaron el análisis y la identificación de los aceites esenciales hidrodestilados de menta (*Mentha spicata* y *Mentha pulagium*) por medio de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Evaluaron además su actividad antibacteriana frente a algunas bacterias patógenas, del aceite esencial de *Mentha spicata* separaron 57 compuestos, el principal fue la carvona (59,40%), y de *Mentha pulegium*, separaron 43 compuestos, siendo pulegona (38,81%), además, presentaron actividad antibacteriana apreciable, excepto para *Streptococcus pyogenes* (Habiba *et al.*, 2011), por otro lado estudiaron la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha longifolia*. *Ssp longifolia*, la (CIM) frente a *Salmonella typhi murium* LT2, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Microoccus luteus* NCIMB8166 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, el análisis químico del aceite esencial mostró la presencia de 34 compuestos. Los más importantes fueron: mentol (32,51%), mentona (20,71%), pulegona (17,76%), y La CIM reportada osciló desde 0,19 hasta 1,56mg/ml, la *M. longifolia* presentó un efecto antibacteriano alto. Esta susceptibilidad fue acentuada en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, el daño menor fue en *S. aureus* y *Micrococcus luteus* (Hajlaoui *et al.*, 2010).

Se estudió la actividad antibacteriana de las diferentes formas de menta (*Mentha piperita*) es decir, acuosas, infusión, decocción, jugo y aceite esencial frente a 100 aislamientos de 11 diferentes especies de bacilos, *Escherichia coli* (30), *Klebsiella pneumoniae* (25), *P. aeruginosa* (15), *Salmonella typhi* (5), *S. paratyphi A* (1), *S. paratyphi B* (1), *Proteus mirabilis* (10), *Proteus vulgaris* (2), *Shigella dysenteriae* (5), *Yersinia enterocolitica* (1), y *Enterobacter aerogenes* (5). El aceite esencial y jugo presentaron actividad antimicrobiana de 11,78 mm y 10,41 mm de zona de inhibición respectivamente (Sabahat *et al.*, 2006), así también determinaron la actividad anti *Trypanosoma cruzi* “*in vitro*” de los aceites esenciales de *Mentha X piperita L* (Menta), *Rosmarinus officinalis L* (Romero), *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto), *Artemisia absinthium L* (Ajeno), *Melissa officinalis L* (Toronjil), *Minthostachys setosa Brig* (Muña), *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Aloysia triphylla* (Cedrón) y *Mentha spicata L* (Hierba Buena), los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) y *Aloysia triphylla* (Cedrón) inhibieron el crecimiento de la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi* (Rojas *et al.*, 2010).

En el instituto de investigación para la industria alimentaria (Cuba). Respecto a la composición y propiedades antibacteriana de *Lippia alba*, determinaron la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre *Escherichia coli*, el aceite esencial estaba compuesto mayormente por carbona 40%, limoneno 5,76%, b-guaieno 9,84%, piperitenona 8,26%, b-elemento 3,02%, b-bourboneno 3,01%, linalol 1,34%, borneol 1,31%, b-cariofileno 1,21%, carvacrol 1,02%. El aceite presentó actividad antibacteriana, sobre gérmenes Gram positivos, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 0,3 mg/ml y 2,5 mg/ml; *Escherichia coli* fue inhibida a una CMI de 2,5 mg/ml (Pino *et al.*, 1997).

En una investigación sobre aceites esenciales y sus propiedades antimicrobianas, realizada en el colegio de Farmacia y Bioquímica La Paz Bolivia, reportaron concentraciones inhibitorias de diferentes aceites esenciales para el hongo *Neurospora crassa*: lima (*Citrus limetta*) 0,5mg/ml para *Staphylococcus aureus*: romero (*Rosmarinus officinalis*) 1mg/ml además, los aceites de perejil (*Petroselinum sativum*), Khoa (*Satureja boliviana*), molle (*Schinus molle*), naranja (*Citrus aurantium*), toronja (*Citrus paradissi*) y mandarina (*Citrus mobilis*), inhibieron el crecimiento tanto de hongos a 0,5 mg/ml como

de bacterias a 1mg/ml los aceites de perejil y molle a 3,7 mg/ml y khoa a 7,5 mg/ml inhibieron el crecimiento de *Shigella flexneri* (Flores *et al.*, 1999).

Estudiaron la concentración mínima inhibitoria “*in vitro*” del extracto de paraíso (*Melia azedarach*) y aceites esenciales de canela (*Cinnamomun zeylanicum*), menta (*Mentha piperita*) y lavanda (*Lavandula officinalis*), frente a *Paenibacillus larvae* demostrando que el aceite esencial de canela exhibió mayor actividad antimicrobiana con un valor de CIM entre 25 y 50 µg/mL, mientras que el extracto de paraíso tuvo la menor actividad antimicrobiana con una CIM de 5.000 µg/mL. Los aceites de menta y lavanda presentaron valores intermedios de 650 y 400 µg/mL, respectivamente de (CMI) (Liesel *et al.*, 2008).

En el Instituto Superior de Medicina Militar (Cuba), estudiaron la actividad de una decocción de *mentha piperita* Linn sobre la lombriz terrestre del género rojo California empleando diferentes dosis que fueron: 0,475; 0,950 y 1,900g/dl. Utilizaron un grupo de control negativo (agua destilada) y un grupo control positivo (solución de piperazina al 2,0 %), teniendo como resultado que la decocción de las hojas de *Mentha piperita* L. posee un efecto vermífugo en dependencia de la dosis. Concluyendo que la dosis máxima resulto ser más potente que la droga de referencia empleada (De la Paz *et al.*, 2006).

En la Investigación, determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mentha piperita*, de las partes aéreas de la planta en donde lo recolectaron de la provincia de Usak, Turquía, que lo realizaron frente a bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomona fluorescens*, y la levadura *Candida albicans*. Los aceites esenciales de *Mentha piperita* tuvieron actividad antimicrobiana contra las bacterias ensayadas, excepto para *Pseudomonas aeruginosa* MU 187, la actividad más alta en bacterias Gram negativas se determinó a las concentraciones de 25 µg/ml (Ceylan *et al.*, 2014).

Se evaluó la actividad antibacteriana en los extractos de agua de hoja y aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a bacterias patógenas como *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, la actividad antibacteriana de la menta se evaluó mediante el método de difusión de pozos de agar mediante la medición del diámetro de la zonas de inhibición del crecimiento y su

posterior concentración, los resultados demostraron que los extractos y aceite de menta presentaron actividad sobre las especies estudiadas, Inhibiendo con una zona de 12.00 mm y 9.00 mm de aceite esencial y el extracto acuoso de hojas respectivamente a una concentración máxima de 100 μ l (Hayyan, 2014).

En la investigación sobre la composición y la actividad antimicrobiana estudiaron en la Universidad Estadual de Campinas (Brasil), los aceites esenciales de *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Oreganum vulgare*, *Aloysia triphylla*, *Ocimum gratissimum* y *O. basilicum*. Se evaluó la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram + y Gram - y la levadura *Candida albicans* se identificó a partir de menta que el aceite esencial está compuesto mayormente por linalool 51.0 %, carvona 23.42 %, 3-octanol 10.1 %, 4-terpinol 8.0 %, α -terpineol 1.31 %, La mayoría de los aceites estudiados fue eficaces contra *Enterococcus faecium* y *Salmonella*, *Aloysia triphylla* y *O. basilicum* presentaron una inhibición moderada contra *Staphylococcus aureus*, mientras que solo *Aloysia triphylla* y *Mentha piperita* fueron capaces de controlar la levadura *Candida albicans* (Sartoratto *et al.*, 2004).

En la investigación evaluaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Listeria monocitogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar, utilizando volúmenes de aceite a; 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 30 μ l y 45 μ l. el aceite esencial presentó actividad antibacteriana, excepto para *Salmonella sp* y *Pseudomonas aeruginosa*, los valores de los halos de inhibición resultó ser mucho mayor para Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, y *Bacillus cereus*, en tanto para Gram negativos *Escherichia coli* fue inhibida con una zona media de 13.00 mm a una concentración de 30 μ l/ml (Sánchez *et al.*, 2002).

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Plantas Medicinales

Fitoterapia.

La fitoterapia es la terapia basada en plantas, alimentos y elementos nutritivos. Se encuentra entre las más antiguas y quizá sea una de las más fáciles de comprender de todas las terapias disponibles. Los antiguos tratantes y recolectores de hierbas, cuya cultura dependía de la flora del lugar, son conocidos ahora como terapeutas herbales o fitoterapeutas (Francisco, 2008). Las plantas medicinales han acompañado la evolución del hombre, y forman parte del curar ancestral. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que más del 80% de todos los habitantes de la tierra confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud, que algunas plantas eran buenas para comer y alimentarse y otras se caracterizaban por tener propiedades curativas. Con toda certeza, la búsqueda de algún remedio fue la génesis del uso de las plantas para su propio beneficio ya fuera fruto del deseo de sanar o por cuestión mágico-religiosa (Francisco, 2008).

En los últimos años un 80% de la población mundial ha recurrido a las plantas medicinales para tratar diversas enfermedades o afecciones, porque son accesibles y más barato que los productos farmacéuticos (UICN *et al.*, 1993), el empleo de plantas medicinales como tratamiento de diversos males, se registra desde tiempos muy remotos, basándose en creencias populares y conocimientos tradicionales, transmitidos de generación en generación (Pastor, 1991).

Las plantas medicinales en el mundo de hoy

Hoy en día muchas propiedades terapéuticas de diversas plantas han sido demostradas científicamente, en base a la extracción de sus principios activos (Castro, 2005), en respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, por ello se ha recurrido a la fotoquímica y fitofarmacéutica, logrando encontrar nuevas moléculas (Ávila *et al.*, 2006). Así, se acepta que a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, las plantas son una valiosa fuente de sustancias activas con propiedades antibacterianas (Nascimento *et al.*, 2000), apoyados en que estas producen más de 100.000 metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden ser antibacterianos (Domingo & Lopez, 2003).

Principio activo de las plantas medicinales

Refiere que el valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química principio activo que produce un efecto fisiológico. Mucho de los principios activos son sumamente complejos, desconociéndose aun su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, saponinas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarina, flavonoides y resinas (Thompson, 1981).

2.2.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. (Kuklinski, 2003), son mezclas de sustancias volátiles con propiedades aromáticas, extraídos de plantas, en su mayoría por destilación (Duraffourd, 1983), son llamados así los constituyentes odoríferos o esencias de una planta (Herbotecnia, 2005), obtenido a partir de una materia prima, por arrastre de vapor, procedimientos mecánicos o por destilación en seco (Bruneton, 2001).

Pueden agruparse en cinco clases dependiendo de su estructura química: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, lactonas y óxidos (Van Ginkel, 2003), tiene una textura aceitosa y un aroma muy profundo. Se encuentra en muchas especies de las familias de las Umbelíferas (apio, comino, perejil, anís), Rutáceae (limón, naranja, lima, mandarina), Lamiaceae (lavanda, romero, timol, orégano, muña), Myrtáceae (eucalipto, clavo), Piperaceae (pimiento, matico), entre otras (Lock de Ugaz, 1994).

Características

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperaturas ambiente aunque algunos solidifican a bajas temperaturas como, por ejemplo, la esencia de anís. La mayoría son prácticamente transparentes, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos) con excepciones como la esencia de manzanilla, que contiene camazuleno de un tierno color azul. Algunos aceites esenciales son inflamables, generalmente son menos densos que el agua aunque también hay excepciones como las esencias de clavo y de canela que son más densas. Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque algunos de sus componentes se solubilizan, como por ejemplo los fenoles),

son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter, etílico, etc.), la solubilidad en alcohol es variable siendo solubles en el alcohol de alta graduación (Kuklinski, 2003).

Localización del aceite esencial en las plantas

Se producen y se almacenan en células glandulares que tapizan el interior de las hojas y tallos; en pelos glandulares de las plantas o en otras células especializadas (Bonner y Galton, 1980). Los aceites esenciales proceden de las flores, frutos, raíces, semillas y corteza de los vegetales (Van Ginkel, 2003) y pueden estar ubicados en diferentes partes de la planta; por ejemplo, en las coníferas está en todo el tejido; en la rosa solo en el pétalo; en el comino en las semillas; en el clavo de olor en el brote o yema; en la lima en los frutos, en la menta en las ramas y hojas (Lock de Ugaz, 1994), así también en el eucalipto, laurel y boldo en las hojas, en la manzanilla en las flores (Kuklinski, 2003).

Composición química

Los constituyentes principales de los aceites esenciales son hidrocarburos alcoholes fenoles aldehídos cetonas, etc. (Golsmith, 1967).

Influencia de los factores externos en la producción de aceites esenciales

Diversas investigaciones estudiaron el tipo de influencia de los factores externos y su relación con los aceites esenciales, concluyendo que la luz, el suelo, el clima, la velocidad del viento, etc. Determinan su producción (Thompson, 1981).

Funciones del aceite esencial en las plantas

Los aceites esenciales pueden desempeñar diferentes papeles, por su aroma intervienen en la polinización, ejerciendo un efecto de atracción sobre insectos, actúan como defensas frente al ataque de parásitos (Kuklinski, 2003).

2.2.3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los aceites esenciales compuestos extraídos de varios tipos de plantas y usados para preservar alimentos y bebidas, tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. En su estudio Walton y Col. demostró que el extracto destilado del ajo tiene efectos bactericidas y bacteriostáticos (Agapito, 2003), se conoce de la actividad antimicrobiana de varias especies vegetales en forma de extractos o hierbas

aromáticas en los alimentos, inhiben la formación vegetativa de esporas, detienen el crecimiento de elementos patógenos y levaduras (Agapito, 2003).

Se ha reportado que los flavolignanós (silibina, silicristina, silidianina y silimarina) poseen actividad antibacteriana y potencian la acción de sustancias antimicrobianas (Kurkin *et al.*, 2001; Guz *et al.*, 2001), y también en un análisis de las fracciones de cloroformo y de metanol de la planta, se determinó mayor acción frente a bacterias Gram positivas y que el extracto metanólico inhibía a *Pseudomona aeruginosa* (Basu *et al.*, 2005); en otro ensayo, se estableció que el ácido lantánico tiene actividad contra *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Saleh *et al.*, 1999).

Mecanismo de acción del aceite esencial sobre los microorganismos

Este mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y aún no ha sido del todo entendido y explicado. El modo de acción de los aceites esenciales también dependerá del tipo de microorganismos y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos (Cano, 2007); así mismo establecieron “*in vitro*”, la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antimicótica de los aceites esenciales de *Aglaia odoratissima*. Las investigaciones plantean que los aceites esenciales interferirían la fase del metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción (Kakrani & Col. 1982).

Propiedades antimicrobianas y mecanismos de acción de aceites esenciales

Dado que el efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente su actividad antimicrobiana pueden ser evaluada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración mínima requerida del aceite esencial que tenga la capacidad de frenar el crecimiento del microorganismo propiedades bacteriostáticas o fungistáticas (Smith Palmer, *et al.*, 1998), o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99.9 % de la población del microorganismo propiedades bactericida y fungicida (Burt, 2004).

En este sentido, se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de tres características; su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que se debe atacar (Fisher & Phillips, 2008; Solórzano - Santos & Miranda – Novales, 2011).

El modo de acción de los aceites esenciales en cuestión a su carácter (hidrófilo o hidrófobo) se debe a que tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplasmática lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo. Respecto a sus componentes, ellos también pueden actuar como agentes que interfieren con la translocación de protones y la fosforilación del ATP (Smith – Palmer *et al.*, 1998; Kalemba & Kunicka 2003; Holley & Patel, 2005; Fisher & Phillips, 2008; Solorzano- Santos & Miranda- Novales 2011).

Mencionan que los componentes fenólicos son los principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales (Delaquis *et al.*, 2002 & Holley & Patel 2005); en el mismo sentido, en una investigación realizada por (Fisher & Phillips 2008), ellos reportaron que el carvacrol aumenta la fluidez de la membrana y causa fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de membrana y la inhibición de la síntesis del ATP. Por otra parte, la citronela interfiere con los procesos de fotosíntesis, lo que sugeriría que los aceites esenciales no solo pueden estar actuando en la pared celular, sino que además pueden tener un efecto mayor sobre los sistemas metabólicos. Del mismo modo (Fisher & Phillips, 2008), refieren que el mentol tiene un efecto “antiplasmid” (secuencia extracromosómica de ADN que no puede ser compartida entre los patógenos) lo que hace interrumpir la eficiencia de la célula.

Por otro lado, en las bacterias Gram negativas se ha observado mayor susceptibilidad a los aceites esenciales a diferencia de las Gram positivos y aunque aún no se sabe exactamente la razón por la cual se da este hecho (Smith-Palmer *et al.*, 1998, Kalemba & Kunicka 2003 & Fisher & Phillips, 2008), reportan que la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas puede estar relacionada con la membrana externa que poseen este tipo de bacterias, ya que la hidrofobicidad de la membrana la hace impermeable. Sin embargo, (Fisher & Phillips, 2008), mencionan que solo hay un retardo del efecto por lo que sugieren que para alcanzar el mismo efecto letal en ambos tipos de bacterias, se requeriría de un mayor periodo de tiempo de exposición a los aceites esenciales en los sistemas modelos. No obstante, esta sensibilidad de los

diferentes tipos de bacterias solo se ha observado al utilizar aceites esenciales en forma “*in vitro*” pero no en alimentos.

Principales moléculas con acción bactericida

Pulegona: $C_{10}H_{16}O$ cetona terpenica cíclica se encuentra en algunas Lamiaceas, se sintetiza a partir de la 3-metil-ciclohexanona. Líquido oleoso, miscible en etanol, éter y cloroformo, de olor parecido a la menta (Badui, 1998).

Carvacrol: $C_{10}H_{14}O$ derivado fenólico, monoterpénico que se encuentra en varios aceites esenciales, como el orégano, tomillo, etc. Es un líquido incoloro amarillo. Tiene propiedades antifúngica, como antimicrobiano. Esta molécula se une a los grupos amino e hidroxiloamino de las proteínas de la membrana bacteriana, alterando su permeabilidad (Badui, 1998; AAF, 2002).

Linalol: $C_{10}H_{18}O$ alcohol acíclico, se sintetiza a partir del mircenol o del dehidrolinalol, insoluble en agua, soluble en etanol al 60%, de olor floral refrescante (Badui, 1998).

2.2.4. Menta (*Mentha piperita* L.)

Ubicación Taxonómica

Según el Sistema de Clasificación Filogenético de Adolph Engler (Solano, 2016).

Reino	: Vegetal
Sub reino	: Phanerogamae
División	: Angiospermae
Clase	: Dicotyledoneae
Sub Clase	: Methachlamydeae
Orden	: solanales
Familia	: Menthaceae (Lamiaceae)
Genero	: <i>Mentha</i>
Especie	: <i>piperita</i>
Nombre científico	: <i>Mentha piperita</i> L.
Nombre común	: Menta

Descripción Botánica

Es una especie herbácea, vivaz con tallos rectos, cuadrangulares muy ramificados, que puede alcanzar una altura de 80cm que nace de un rizoma subterráneo del que brota un extenso sistema radicular. Hojas opuestas pecioladas, lanceoladas o agudas, con bordes aserrados, color verde oscuro en la cara superior y más claro en la inferior (Muñoz, 1996).

Hábitat de la menta

Es comúnmente conocida como *black mint* en Inglaterra, *peppermint* en Estados Unidos y toronjil de menta y menta inglesa en Cuba. Se encuentra en forma silvestre en casi todo el centro y sur de Europa y África del Norte (Sánchez *et al.* 1996), es oriunda de Europa, pero se puede encontrar con facilidad a lo largo de todo el mundo, prefiriendo los climas templados a los calurosos o fríos. Es una planta que puede ser cultivada en huertos, jardines o campos, crece espontáneamente en tierras profundas, ricas en humus y con bastante humedad (Botánico-online, 2012).

Principios activos y propiedades

El aceite esencial de menta tiene como componente principal al mentol, en una proporción de 45 – 70 %, siendo el elemento que le da su olor tan característico y le confiere además sus propiedades farmacológicas. Estudios etnobotánicos reconocen su efecto como astringente, carminativo, antiséptico, estimulante, anodino, espasmolítico, vermífugo, antiviral, antifúngico, antibacteriano y antiinflamatorio (De la Paz, 2006; Tonguino, 2011).

Composición química

Las hojas contienen de 10 a 12 % de elementos minerales, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos. Contiene de 0.5 % a 1 % de aceite esencial. Según el análisis realizado en la Comunidad de Tranca (Ayacucho) reporta 2.5 % de aceite esencial (Percy, 2007), el contenido de aceites esenciales, oscila entre 1.3 y 2.1 %. La menta negra (*Mentha piperita* var. Micham) cultivada en el Departamento de Ayacucho tiene alto contenido de aceite esencial, está por encima de los estándares europeos (Percy, 2007).

El aceite esencial de la menta, es un líquido incoloro con olor fuerte y sabor picante que se halla localizado en glándulas pequeñas situadas en la superficie superior e inferior de las hojas; los tallos contienen en mínima proporción aceite.

El principal componente de la esencia es el mentol, que se halla en la proporción de 45 a 70 % (Percy, 2007).

Partes medicinales: El aceite extraído de las partes aéreas de la planta, las hojas secas, las puntas de las ramas florecientes, la planta fresca floreciente, y la planta entera, constituyen las partes medicinales de la Menta (Victoria *et al.*, 2002).

Hoja tallo: Los tallos están usualmente ramificados y tienen un color violeta. Las hojas presentan forma rectangular-ovoide y son serradas (Victoria *et al.*, 2002).

Tolerancia: Es una especie que se desarrolla bien en zonas de clima templado, con elevada luminosidad, son tolerantes a heladas (Percy, 2007).

Suelo: Se desarrolla en gran variedad de suelos, pero son favorables los ligeros, arenos – arcillosos, francos, que sean fértiles, profundos y bien drenados. Si el suelo es arcilloso, el crecimiento de la planta resulta defectuoso y su rendimiento disminuye; son desfavorables los terrenos en los que se estanca el agua. Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 3,800 msnm es una planta que requiere elevada luminosidad, los suelos humosos (negros) son los más recomendables por contener bastante materia orgánica (Percy, 2007).

Compuestos activos

La química del aceite de menta es compleja. Más de 100 compuestos han sido encontrados en el aceite y la concentración relativa de cada uno depende grandemente de la localización geográfica (La Valle, 2001), los extractos de la menta deben protegerse de la luz (Heck *et al.*, 2000), y la planta puede contener entre un 0.1 % y un 1% de aceite volátil el cual está compuesto principalmente de mentol, mentona, metilacetato (La Valle, 2001).

Aplicaciones de aceites esenciales

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy variadas es ampliamente utilizado en perfumería, como saborizantes de alimentos y en medicina. Ejemplo: los aceites

esenciales de anís, menta y canela son carminativos y soporíferas; el de clavo de olor es analgésico (Cano, 2007).

Componentes de las hojas

Aceite volátil, entre los principales compuestos pueden citarse: mentol (35-45 %), mentona (15-20 %), acetato de mentil (3-5 %), isomentona (2-3 %) neomentol (2.5-3.5 %) mentofurano 2-7 %); también pueden hallarse llimonen, pulegona, el alfa y beta – pinene, y el trans – sabinene hidratado, además contiene jasmona, taninos y principio amargo (La Valle, 2001).

Ácido caféico, incluyendo entre otros el ácido rosmárico.

Flavonoides, apigenina, diosmetina y glicosidos de luteolina, flavonoide metoxilado lipofílico libre, además de xantomicrool y gardenia D, entre otros.

Farmacología

El aceite de menta es un carminativo aromático que reduce la presión intracolónica y alivia la flatulencia (Heck *et al.*, 2000).

Es un agente antibacterial, insecticida, colerético y secretolítico, además tiene un efecto refrescante en la piel. Es capaz de bloquear el estímulo excitatorio del calcio debido a su característica antiespasmódica propia de los bloqueadores de canales de calcio que presenta el mentol, por lo que presenta una actividad antiespasmódica a nivel del músculo liso del tracto gastrointestinal (Heck *et al.*, 2000).

Algunos reportes han sugerido la utilidad del aceite de menta, bajo una forma dosificada con cubierta entérica, en el síndrome del colon irritable, por medio de una acción meramente local sobre el tracto gastrointestinal (Heck *et al.*, 2000), produce efecto relajante sobre los músculos de las vísceras y es por esta razón que se inyecta el aceite a una solución diluida del mismo para reducir el espasmo colónico que se presenta durante la endoscopia, es antifatulenta y estimula la producción de bilis y la secreción de jugos digestivos, lo que la convierte en un buen remedio para los cólicos intestinales y de la digestión difícil y flatulenta; el aceite volátil que contiene actúa como anestésico suave del estómago lo que ayuda a combatir las náuseas y vómitos (Victoria *et al.*, 2002), el aceite de menta ha sido utilizado, junto con otros aceites volátiles en preparaciones para desórdenes respiratorios (Heck *et al.*, 2000).

Usos e indicaciones.

Son varios los usos del aceite de menta que ya han sido aprobados, algunos de ellos son:

- Enfermedades del hígado y la vesícula biliar.
- Problemas dispépticos.
- Resfriado común.
- Tos y bronquitis.
- Inflamación de la boca y la faringe.

Escherichia coli

Escherichia coli fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich y los primeros reportes sobre la capacidad de cepas de *Escherichia coli* para causar diarrea severa en niños, aparecieron en la literatura médica a mediados del año 1940 como resultado de un llamativo brote epidemiológico de gastroenteritis infantil aguda (Fernández, 2003).

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del hombre, se excreta diariamente con las heces entre $10^8 - 10^9$ UFC/g de heces y por sus características es uno de los indicadores de contaminación fecal recientemente más utilizados (Harrison, 1998); el huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establece una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida (Winfield, 2003 & Kaper, 2004), *Escherichia coli* ocupa una posición única entre los bacilos entericos oportunistas ya que ciertas cepas son capaces de causar enfermedad intestinal primaria así como infección extraintestinal. Además *Escherichia coli* ha sido objeto de más investigaciones experimentales que ningún otro microorganismo, especialmente en el campo de la biología molecular (Arias *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha precisado seis grupos patógenos de *E. coli* que ocasionan diarrea en sujetos sanos los cuales son: *Escherichia coli* enterotoxigenica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC) (Kaper, 2004), cada una de ellos tiene codificado a nivel cromosomal y plasmidico diferentes grupos de genes que participan directamente en la virulencia (Nataro *et al.*, 1998).

2.2.5. *Escherichia coli* **Enteropatógena (EPEC)**

Clasificación taxonómica (Brooks *et al.*, 1999).

Reyno	: Procariotae
División	: Gracilicutes
Clase	: Escotobacterias
Orden	: Eubacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genero	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>coli</i>
Nombre científico	: <i>Escherichia coli</i>
serotipo	: Enteropatógena (EPEC)

Características de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC por sus siglas en inglés) fue la primera en describirse y es uno de los microorganismos más estudiados, las cepas EPEC infectan poblaciones humanas en todo el mundo y permanecen como uno de las causas primarias de diarrea infantil en países en desarrollo (Danika *et al.*, 1999), estos agentes etiológicos asociados a enfermedades diarreicas a nivel mundial han mostrado que la importancia relativa de patógenos entéricos varía ampliamente por estación, residencia urbana o rural, clase socioeconómica y localización geográfica y particularmente con la edad del huésped (Farreras, 1995); afecta principalmente a niños menores de seis meses, hasta los dos años, la enfermedad es rara en adultos, presumiblemente porque desarrollan una inmunidad protectora (Murray *et al.*, 2002); pero también puede aislarse en adultos enfermos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes (Rodríguez, 2002).

Se caracteriza por sus patrones distintos de adherencia a las células epiteliales, las cepas EPEC se unen a las células huésped en un patrón denominado adherencia local, en el cual se forman microcolonias sobre las superficies de las células (Koneman *et al.*, 1992); una de las principales características de la infección es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir en diversos grados de intensidad. Además, es común en los niños infectados presenten vómitos y fiebre (Cravioto, 1988 & Nataro, 1998).

Epidemiología

Escherichia coli enteropatógena son productoras de diarreas que causan frecuentes infecciones en los primeros años de vida con mayor incidencia en el Perú y el mundo, es transmitida por vía fecal oral y el vehículo más frecuente de infección es la ingestión de alimentos contaminados (Arias *et al.*, 2004), la infección es más probable en lugares donde las prácticas de manipulación de alimentos y de eliminación de residuos no son óptimas, lo que sugiere que hasta un inóculo menor de estos gérmenes produce la enfermedad (Kelley, 1991); en el Perú *Escherichia coli* enteropatógena ocupa el segundo lugar como bacteria patógena productora de diarrea aguda en niños menores de cinco años (Nieves *et al.*, 2000), se ha notificado en algunos países latinoamericanos que la infección por EPEC supera a la provocada por *Campylobacter spp.* Y rotavirus en la población infantil (Cravioto, 1988 & Nataro, 1998).

Manifestaciones clínicas

Los pacientes afectados de diarrea infecciosa aguda debutan de forma característica con náuseas, vómitos, fiebre, dolor abdominal que es leve, difuso y cólico, debido al elevado volumen de líquido secretado que estimula el peristaltismo y ocasiona diarrea acuosa (Kelley, 1991 & Margall, 1997). A diferencia de los otros grupos de *Escherichia coli* las enteropatógenas (EPEC) causan con frecuencia una diarrea prolongada (Rodríguez, 2002), así también la diarrea acuosa puede ocurrir en diversos grados de severidad en el cuadro clínico, su periodo de incubación varía entre las 3 y 24 horas después que el individuo ingiere un inóculo grande de bacterias $10^9 - 10^{10}$ UFC (Blattner *et al.*, 1997).

Una vez que la bacteria alcanza la mucosa intestinal, comienza a desencadenarse un mecanismo de patogenicidad complejo, que tiene como resultado la producción de diarrea. Los niños menores de dos años son la población infantil con mayor susceptibilidad a la infección, y de ellos, la mayor prevalencia se ha observado en lactantes hasta de seis meses (Kaper, 2004 & Nataro, 1998 & Donnenberg, 1997).

Fisiopatología

La infección por EPEC se caracteriza histopatológicamente por una alteración que la bacteria produce a nivel intestinal conocida como la lesión A/E (adherencia y

esfacelamiento). La lesión es un proceso multiestado que degenera las microvellosidades del enterocito mediante la reorganización de algunas proteínas importantes que se encuentran en el citoesqueleto celular (Vidal *et al.*, 2003), seguida de una secreción activa de proteínas por el sistema de secreción bacteriano de tipo III hacia la célula epitelial anfitriona. Una proteína, el receptor de la intimina translocada (TIR), se inserta en la membrana epitelial (este proceso esta mediado por otras dos proteínas secretadas) y actúa como receptor de una adhesina bacteriana de la membrana externa, la INTIMINA. La diarrea acuosa típica de esta entidad se debe a la absorción inadecuada derivada de la destrucción de las microvellosidades (Murray *et al.*, 2002).

Modelo de patogénesis

Gracias a investigaciones recientes, la interacción entre el microorganismo y las células del huésped ha podido dividirse en tres estadios importantes, a) adherencia inicial, b) transducción de señales y c) anclaje íntimo (Donnenberg *et al.*, 1997), la adherencia inicial (Fig. 1A) está mediada por moléculas de tipo fimbrial conocidas como el pili BFP (pili formador de penachos, por sus siglas en Inglés). El BFP permite que las bacterias interactúen de manera tridimensional y se dispongan en forma de microcolonias a nivel intestinal, promoviendo con esto la adherencia inicial sobre la superficie de la célula (Donnenberg, 1997 & Frankel, 1998 & Giron, 1991), una vez que la bacteria está adherida al enterocito induce una serie de señales intracelulares que son promovidas por un grupo de proteínas secretadas mediante el aparato de secreción tipo III y son traslocadas hacia el enterocito (Fig. 1B). Estas proteínas están codificadas genéticamente en el locus del esfacelamiento del enterocito (LEE), una isla de patogenicidad importante de EPEC. La isla de patogenicidad LEE tiene tres dominios principales que incluyen, a) el sistema de secreción tipo III, b) las proteínas de secreción conocidas colectivamente con el nombre de Esps, y c) la adhesina bacteriana intimina y su receptor en la célula llamado Tir, por ser trasladado por la misma bacteria hacia la célula intestinal (Celli, 2000 & De Vinney, 1999 & Kenny, 1995).

Mediante el aparato de secreción tipo III la bacteria secreta proteínas al medio: EspA, EspB, EspD, y Tir. De éstas, la proteína EspA forma un apéndice filamentosos que va a permitir el contacto con la célula epitelial mediante la cual son traslocadas hacia la

membrana de la célula epitelial la proteína EspB y EspD (para terminar de formar el traslocon o para formar una abertura en la membrana). Una vez que está formado el traslocon la proteína Tir (Receptor Translocador de Intimina) es enviada hacia el interior de la célula y se inserta en la membrana en donde sirve como receptor para la proteína bacteriana intimina. (Celli & Finlay, 2000, De Vinney, 1999 & Kenny *et al.*, 1997), los efectos inmediatos que se inducen durante la transducción de señales durante la patogénesis de EPEC incluyen cambios a nivel intracelular que repercuten con la actividad fisiológica normal de la célula intestinal, tal es el caso del aumento en la secreción de electrólitos al espacio extracelular, permeabilidad de las uniones estrechas intracelulares y remodelación de la región apical del enterocito, se cree que estos cambios son los responsables de la diarrea acuosa. (Celli, 2000 & De Vinney, 1999), paralelo a la transducción de señales, la bacteria se adhiere estrechamente a la célula mediante la participación coordinada de la proteína intimina (94 kDa) y su receptor en la célula de nombre Tir (Fig. 1C), que como ya se mencionó anteriormente, la propia bacteria secreta y envía hacia la membrana del enterocito. Esta interacción de intimina con Tir es esencial para la formación del pedestal y la lesión intestinal (Celli, 2000 & Donnenberg, 1997).

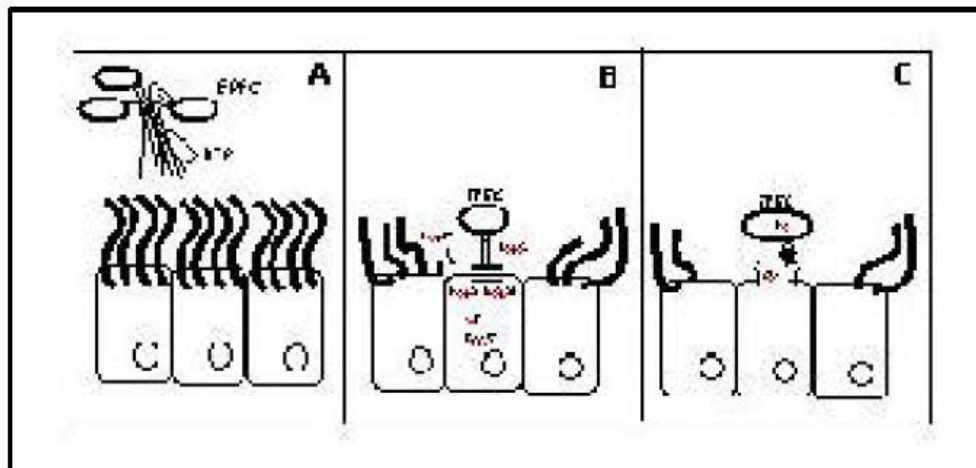


Figura 1. Modelo de patogénesis de *Escherichia coli* enteropatógena EPEC.

Figura 1. Modelo de patogénesis de EPEC. (A) Adherencia inicial, las bacterias se unen mediante el BFP en forma tridimensional y mediante esta interacción alcanzan la célula epitelial, (B) Transducción de señales, la bacteria secreta al medio extracelular al menos seis proteínas mediante el sistema de secreción tipo III comenzando la remodelación del enterocito. Estas proteínas forman un traslocon en

el que participan EspA, EspB y EspD, el aparato de traslocación permite la liberación al interior de la célula intestinal de las proteínas Tir y EspF, (C) Adherencia íntima, este evento está mediado por la proteína Tir que se inserta en la membrana de la célula y sirve como receptor para la proteína íntima que une la bacteria a la célula formando el pedestal característico de la lesión A/E (Donnenberg, & Finlay, 1997).

Otros factores de virulencia

Toxinas.- recientemente se ha descrito una proteína involucrada en la enterotoxigenidad provocada por la EPEC llamada EspC proteína C secretada por EPEC; EspC pertenece a la familia de proteínas transportadores e interviene en el incremento en la corriente de corto circuito y diferencia de potencial, que involucra la salida masiva de iones hacia el espacio extracelular y correlaciona con la diarrea acuosa que se observa. Investigaciones posteriores, incluyendo con microscopía electrónica, revelaron que las cepas EPEC se encontraban adheridas a la membrana del enterocito de manera íntima con destrucción histopatológica importante de las vellosidades intestinales (Margall *et al.*, 1997).

Diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena

Como cualquier *E. coli* la bacteria se aísla de muestras de heces en medios selectivos y diferenciales para enterobacterias, como el agar Mac Conkey o el agar de eosina y azul de metileno. Sin embargo, cuando se sospecha de un brote epidémico es necesario diferenciar los aislamientos de EPEC de las *E. coli* de flora normal, ya que son indistinguibles desde un punto de vista bioquímico y para ello se requieren pruebas adicionales distintas de las habituales realizadas en el laboratorio clínico (Nataro, 1988 & Rodríguez, 2002), para la identificación de EPEC se han utilizado diversos esquemas, entre los que se incluyen: La serotipificación, el ensayo de adherencia en células Hep-2, la prueba de FAS y técnicas de biología molecular (Vidal, 2003). Las técnicas convencionales continúan siendo herramientas insustituibles (Sánchez, 2004).

Serotipificación

El aislamiento de la bacteria, se realiza a partir de materia fecal o hisopo rectal, la misma que se siembra con la punta del hisopo en la parte superior de una placa de

agar Mac-Conkey u otro medio selectivo y con una asa redonda de nicrom, se continua el aislamiento, sembrando por estría cruzada; después se incuba a 37 °C durante 18 a 24 horas. Posteriormente se seleccionaran de 5 a 10 colonias típicas de *Escherichia coli* lactosa positivas para la identificación bioquímica y posterior serotipificación (Rodríguez, 2002).

Transmisión y reservorio

Al igual que sucede con otros microorganismos importantes, la transmisión se lleva a cabo por la vía fecal-oral; en países en vías de desarrollo, la principal vía de transmisión es el agua contaminada. Se ha demostrado que en los países industrializados, la transmisión por alimentos es la principal causa de la enfermedad; aunque la transmisión no parece estar involucrada con algún tipo específico de alimento. Se piensa además que el aire (formación de aerosoles) podría ser una forma de diseminación de la bacteria sobre todo en lugares donde niños infectados conviven con niños asintomáticos (Nataro *et al.*, 1998), los reservorios incluyen principalmente a niños con sintomatología y asintomáticos, adultos que en ocasiones son portadores asintomáticos y personas que manejan infantes. En algunos pacientes con infección por EPEC se ha logrado aislar de las heces a la bacteria hasta dos semanas después de clarificada la enfermedad, por lo que es necesario el control de las excretas de estos pacientes por un tiempo prolongado (Nataro *et al.*, 1998), algunos animales como perros, monos, cerdos y conejos son huéspedes de microorganismos muy semejantes a EPEC que les provocan diarreas secretorias, aunque los serotipos asociados a la enfermedad humana no han podido aislarse en estas especies (Carvalho *et al.*, 2003 & Nataro *et al.*, 1998).

2.3 Marco Conceptual.

Aceite esencial: son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable (Kuklinski, 2003).

Antibiótico: agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos (INS, 2002).

Bactericida: es cuando el antimicrobiano destruye al germen, son bactericidas típicos las betalactamasas y los aminoglucósidos (Guerrero, 2001).

Bacteriostático: Es cuando un antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano sin matar a la bacteria (Sherris, 2002).

Cepa: cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento (INS, 2002).

Colonia: crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente (INS, 2002).

Concentración mínima inhibitoria (CMI): corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación (INS, 2002).

Diarrea: es una alteración de las heces en cuanto a volumen, fluidez o frecuencia en relación anormal a la fisiológica, lo cual conlleva una baja absorción de líquidos y nutrientes, pudiendo estar acompañada de dolor, fiebre, náuseas, vómitos, debilidad (Theresa, 2011).

Enterotoxina: es una sustancia dañina producida por ciertas bacterias y que es especialmente peligrosa para partes del tracto gastrointestinal (Guerrero, 2001).

Escala de Mc. Farland: estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5 (INS, 2002).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC):** es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vías de desarrollo, e interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica (Vidal, 2007).

Patógeno: especie bacteriana capaz de ocasionar dichas enfermedades al presentarse circunstancias favorables para el organismo (Sherris, 2002)

Plásmido: son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico (Guerrero, 2001).

Principio activo: los principios activos son la sustancia a la cual se debe el efecto farmacológico de un medicamento, y su uso se remonta a la prehistoria, en un principio eran hiervas y sustancias naturales (Bruneton, 2001).

Resistente: organismo que no se inhiben por las concentraciones clínicamente posibles de un agente antimicrobiano (Sherris, 2002).

Sensible (S): categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones (INS, 2002).

Virulencia: Grado de patogenicidad o capacidad para producir enfermedad de un microorganismo (Forbes *et al.*, 2004).

Patogenicidad: es la capacidad de las bacterias para producir daño o enfermedad (Castro, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El estudio se realizó en la ciudad de Puno, ubicado en coordenadas UTM: 0393076 y 8242866, a una altitud de 3838 msnm, la recolección de plantas de mentha (*Mentha piperita* L.) se efectuó en el Centro Poblado de Jayllihuaya Puno, ubicado a 15°5' 3.5'' latitud Sur y 69° 58' 4.5'' longitud Oeste a 3882 msnm, La obtención del aceite esencial de (*Mentha piperita* L.) se realizó en la Facultad de Ciencias Agrarias Anexo 1. La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno.

3.2. Tipo de estudio

El trabajo de investigación es de tipo experimental.

3.3. Población y muestra

Población microbiológica

La población estuvo conformada por un microorganismo tipificado: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) el mismo que se ensayó frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita* L. (menta).

Muestra microbiológica

La muestra biológica estuvo constituida por la cepa de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que fue proporcionado por el Instituto Nacional de Salud Lima (INS) Anexo 2.

Criterios de inclusión:

- Planta de Menta en buen estado de desarrollo, sin signos de enfermedades y daño físico.

Criterios de exclusión:

- Material vegetal que se encuentre en mal estado decrecimiento o desarrollo y que presente signos visibles de daño.

3.4. Diseño de investigación

La distribución de unidades experimentales para el estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.), frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). La prueba control consiste en que el tratamiento no presenta ninguna concentración o dosis de aceite esencial de menta, la disposición de unidades experimentales fue de la siguiente manera:

Tabla 1. Diseño del experimento, concentraciones y número de repeticiones.

Repet.	Control	Aceite esencial de menta (<i>Mentha piperita</i> L.)									Total
	negativo	0.01 %	0.05 %	0.1 %	0.2 %	0.4 %	0.5 %	1 %	2.5 %	5 %	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	50

En total de unidades experimentales para la determinación de CMI fue de 50, conformado por 10 tratamientos o concentraciones y 5 repeticiones por cada tratamiento a utilizarse.

Tabla 2. Comparación del aceite esencial de menta con el antibiótico Tetraciclina.

Repet.	Control	Concentraciones de aceite esencial de menta (<i>Mentha piperita</i> L.)							total
	positivo	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl	30 µl		
1	Tetraciclina 30 µg	1	1	1	1	1	1	1	7
2	1	1	1	1	1	1	1	1	7
3	1	1	1	1	1	1	1	1	7
4	1	1	1	1	1	1	1	1	7
5	1	1	1	1	1	1	1	1	7
6	1	1	1	1	1	1	1	1	7
7	1	1	1	1	1	1	1	1	7
Total	7	7	7	7	7	7	7	7	49

La densidad del aceite (0.9347 g/ml)

30µl el mismo que equivale a 28.02mg de acuerdo a la densidad del aceite esencial.

En total de unidades experimentales fue de 49, conformada por 7 repeticiones y 7 tratamientos por cada concentración a utilizarse, además se utilizó un control positivo (antibiótico Tetraciclina); y un control negativo (agua destilada estéril).

3.5. Metodología

Para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) “in vitro” del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), se realizó lo siguiente.

Método de campo

Recolección del material vegetal

Primeramente hay que tener en cuenta que dependiendo de la planta que interesa recolectar debemos distinguir donde se encuentre los principios activos más intensos y en qué momento de recolección del día. La hora indicada para la recolección de las especies vegetales es realizarla por la mañana (Sisa, 2004).

Procedimiento:

Se colectó 41 kg de planta entera, se cortaron los tallos con tijeras de podar, se seleccionaron y separaron las impurezas (ramas secas, tallos secos o dañados, tierra, otras plantas, etc.), inmediatamente se almacenaron en bolsas de papel kraft previamente etiquetados, con la finalidad de evitar su deterioro o maltrato de la planta durante su traslado. Posteriormente fueron trasladadas al laboratorio Taller de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano.

Secado del material vegetal

Fundamento.- es la eliminación del agua de los tejidos y células de la planta, para evitar la alteración de los componentes de la planta por la humedad persistente. Las hojas deben ser secadas con el tallo sin desprenderlas (Tadeo, 2004).

Procedimiento.- se hizo en un ambiente protegido de la luz solar, ventilada y sin superponer los tallos para su desecación óptima por el lapso de 15 días que se obtuvo un secado adecuado de la materia vegetal.

Método de laboratorio

Extracción del aceite esencial por destilación de arrastre a vapor de agua

Fundamento.- consiste en calentar la planta hasta que sus componentes más volátiles pasen a la fase de vapor y a continuación se enfría el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación el aceite esencial (Tadeo, 2004).

Procedimiento: Se separaron manualmente las hojas de los tallos de la planta, y se cargó en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho fijo compacto colocándose en total 2500 g se esperó el tiempo requerido para que el vapor del agua por presión suba y entre en contacto con la célula de las hojas, rompiendo y liberando la esencia contenida en dichas hojas, atrapándola en las gotitas de agua del vapor; este vapor se condensa y vuelve a ser líquido por medio de la entrada de agua fría, este líquido pasa a la pera de decantación donde se separa el aceite esencial del agua. El aceite esencial contiene el principio activo de la menta que está constituido por las sustancias químicas que tiene actividad antibacteriana que se probó en esta investigación. El aceite por diferencia de densidades flota en la superficie del balón, el proceso termino cuando el volumen del aceite esencial acumulado en la bureta no varía con el tiempo, a continuación el aceite fue retirado de la bureta y fue almacenado en frascos ámbar con tapas estériles, todo el proceso de extracción se realizó en un periodo de 3 horas y 30 minutos. Se obtuvo 11 ml de aceite esencial de la menta de 2500 g los frascos se colocaron en refrigeración hasta su posterior utilización en los análisis.

Materiales

Material biológico.

Se utilizó Cepa de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), fue proveniente del Instituto Nacional de Salud (INS) Lima, las plantas de menta (*Mentha piperita* L.) fueron recolectados del centro Poblado de Jayllyhuaya (Puno), así mismo se usaron discos de sensibilidad para antibiograma TET 30 µg Tetraciclina (marca LyD Insumed, lote TET1618, vence diciembre 2018).

Material de vidrio.

Se usaron los siguientes: Matraz, tubos de ensayo, probetas, frascos ámbar con tapa estéril, pipeta y placas Petri de vidrio pírex.

Equipos y materiales.

Se utilizaron los siguientes: refrigeradora (modelo CA29, marca Coldex, número de serie 0101036696), Incubadora (modelo TZ4ST, marca Autonics, número de serie ID-110507), Estufa de esterilización (modelo, ED 23, marca BINDER), Autoclave (marca: BIONET, número de serie: AV-201207) contador de colonias (marca: Quimis, número de serie: 045, procedencia: Brasil), Cámara Biológica de Clase I (modelo: JSCB-1200SB, marca: BIOHAZARD SAFETY CABINET, número de serie: 071025-04, procedencia: Corea), Destilador por arrastre a vapor (destilador de aceites esenciales, número de serie: 22.25.9441.04), Pipetas calibradas, mechero Bunsen, balanza (modelo: balanza tipo reloj con platillo, número de serie: 22.22.9442.04) y asa de Kholle.

Medios de cultivo.

Se usaron los siguientes medios: Agar Müller Hinton (procedencia: Germania lote: vence: 11/03/2021). Agar Mac Conkey (marca: lote: 0000240299, vence: 08-2019).

Material fungible.

Agua destilada (lote: R1060546, vence: 06-2020), alcohol (alcohol medicinal 70° laboratorio Alkofarma lote: 122245, vence: diciembre 2020), suero fisiológico (vence: 08-2019), bolsas de papel, tijeras podadoras, guante de goma (guantes de latex), algodón (hidrófilo, lote: 105065, vence: 05-2020), lápiz de cera, papel Kraft, punteras de plástico, pabilo, hisopos (marca: ALFYMEDIX, lote: AM1015HE, vence: 2018), Barbijo (marca: N95, lote: A12263).

Preparación del estándar Mc Farland.

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

Procedimiento.- para estandarizar la densidad óptica del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mac Farland). Para prepararlo se procedió de la siguiente manera: se agregó 0.5 ml de $BaCl_2$ a 99,5 ml de H_2SO_4 . Luego se verifico la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro; la absorbancia a 625 nm fue de 0,03 – 0,10 para el estándar 0.5 de Mac Farland. Se distribuyeron de 2 – 4 ml de la solución en tubos similares a los que se

usan para preparar los inóculos y se mantuvieron guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Antes de su uso y para lograr una turbidez homogénea, se agito vigorosamente cada estándar. .

Preparación del medio de cultivo agar Müller Hinton

Fundamento.- el agar Müller-Hinton se considera el mejor medio para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproductibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina, es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas y finalmente existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio (INS, 2002).

Procedimiento.- según especificación para su respectiva hidratación, se preparó 3.4 g de agar Müller Hinton con 100 ml de agua destilada. Luego se esterilizó el medio de cultivo en autoclave, a 120 °C por 30 minutos, transcurrido ese tiempo y antes que el medio de cultivo se enfríe completamente, se hizo el plaqueo vertiendo aproximadamente 20 ml de medio en cada placa estéril, luego se esperó su solidificación y se verifico el pH (7,2 – 7,4); empleando tiras reactivas. Para evitar la acumulación de humedad en la tapa de las placas, se incubaron durante 10 a 30 minutos a 35 °C y se conservaron a temperatura baja hasta su utilización.

Preparación del medio agar Müller Hinton mas aceite esencial de menta

El procedimiento de preparación fue similar al anterior. Al medio autoclavado para cada tratamiento se adiciono el aceite esencial de menta, en los matraces correspondientes, luego de agregar el aceite de menta se homogenizo el medio y se plaqueo.

Preparación del inóculo de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Las cepas *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), fueron obtenidas del Instituto Nacional de Salud de Lima, (INS) las cuales fueron inoculadas en medio de cultivo Mac Conkey, con 24 a 48 horas de ser cultivados, a partir del cual se seleccionaron y recogieron con asa de Kolle, 4 a 5 colonias, bien aisladas y con similar morfología, teniendo el cuidado de no recoger medio de cultivo. Con estas colonias se preparó una suspensión en 4 a 5 ml en solución salina. Luego la suspensión bacteriana fue incubada a 35 °C hasta alcanzar o exceder la turbidez estándar durante (2 horas) finalmente se realizó el ajuste a la turbidez del inóculo por comparación visual, agregando solución salina, hasta una

turbidez equivalente al tubo 0,5 del estándar de Mc. Farland, para ello, se observaron los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste (INS, 2002).

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena se realizó lo siguiente:

Método: dilución en placa

Fundamento.- la técnica de dilución en agar según Kirby-Bauer, se utilizó para medir cuantitativamente la actividad “*in vitro*” de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano, estos métodos se basan en la preparación de una serie de placas con caldos o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico o aceite esencial en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 horas a 37 °C y se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (INLASA, 2003).

Procedimiento. Para determinar la concentración mínima inhibitoria se inoculo con la suspensión de 1×10^8 UFC de la cepa de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en estudio de acuerdo al estándar de Mc Farland, en las placas contenidas con agar Müller - Hinton mas aceite esencial de menta, preparados en diferentes concentraciones o dosis de aceite de menta sin diluir 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2.5 y 5 % respectivamente, simultáneamente se colocó una placa control sin ninguna concentración de aceite sin tratamiento (control de crecimiento). Se procedió a la incubación por 24 horas, después de la incubación las placas se examinaron en busca del desarrollo para demostrar a que concentración mínima inhibitoria (CMI) la bacteria mostraba sensibilidad.

Definiciones Operacionales

Variable independiente.

- Concentración del aceite esencial de *Mentha piperita* L. (menta).

Variable dependiente.

- Actividad antibacteriana del aceite esencial frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Para determinar la comparación del efecto inhibitorio “*in vitro*” del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena en comparación al antibiótico Tetraciclina se realizó los siguientes procedimientos:

Método: difusión con discos.

Fundamento.- el antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Picazo, 2000).

Procedimiento

Se sumergieron los discos de papel filtro con diferentes volúmenes de aceite esencial sin diluir 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l y 30 μ l, el mismo que es equivalente a (30 μ l = 28.02 mg) de acuerdo a la densidad ($D = 0.9347$ g/ml) del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.), se sumergió un hisopo estéril en la suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC/ml (turbidez estándar de 0.5 de Mc Farlan), se inoculó la superficie en cada placa de Agar Müller Hinton, se dispersó en la superficie del medio con el hisopo en diferentes direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo, luego con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos de papel filtro sobre la superficie del Agar con cada una de las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ l respectivamente del aceite esencial de menta, como control positivo se utilizaron discos de tetraciclina (30 μ g) y como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Posteriormente se incubó las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 a 48 horas, para su posterior lectura e interpretación.

Lectura de las placas e interpretación de resultados

Después del tiempo de la incubación se examinaron cada placa y se procedió a medir con una regla milimetrada, los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

Tabla 3. Tabla estandarizada de medida de halos de inhibición (mm).

Se muestra medidas establecidas de halos de inhibición en (mm), con la concentración correspondiente y en comparación a diferentes antibióticos de uso comercial: R; resistente, I; intermedio, S; sensible.

Antibacteriano	Concentración del Disco	Diámetro en (mm)		
		R	I	S
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Cefotaxima	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Amikacina	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Ceftriaxona	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15

Fuente: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana (2002)

MÉTODO ESTADÍSTICO

Para la comparación del efecto inhibitorio “*in vitro*” del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.), y el antibiótico Tetraciclina frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), al obtener los resultados, se evaluó las diferencias estadísticas entre las concentraciones de aceite esencial de la menta y el control de los bioensayos (control positivo), para lo cual se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un diseño completamente al azar (DCA). Para determinar la existencia de diferencias entre las concentraciones respecto a la inhibición producida en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), por el efecto del aceite esencial, asimismo se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para realizar la prueba de comparación de medias entre los tratamientos, el análisis de varianza se realizó utilizando el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta (halo de inhibición en mm)

μ = Promedio general

τ_i = Efecto de la i-ésima concentración de aceite esencial de Menta

ε_{ij} = Efecto del error experimental

Las pruebas estadísticas se evaluarán:

Si el resultado es $p < 0,05$ las pruebas son significativas

Si el resultado es $p > 0,05$ las pruebas no son significativas

Prueba de rango múltiple de Tukey.

Tukey (1953) propuso un procedimiento para evaluar la hipótesis nula con α siendo exactamente el nivel global de significancia, cuando las muestras tienen tamaños iguales, y en el máximo α , cuando las muestras tienen tamaños diferentes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) “*in vitro*” del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Para definir los rangos de concentración de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.). Las concentraciones empleadas fueron: 10 %, 20 % y 30 % determinándose que la concentración mínima inhibitoria, se encontraba por debajo de los porcentajes referidos, se establecieron nuevas concentraciones de evaluación a rangos de 0.01 % a 5 % de aceite esencial.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) por acción antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Concentración de aceite esencial (%)	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena					Concentración mínima inhibitoria (CMI)
	R1	R2	R3	R4	R5	
0.01	+	+	+	+	+	
0.05	+	+	+	+	+	
0.1	+	+	+	+	+	
0.2	+	+	+	+	+	
0.4	+	+	+	+	+	
0.5	+	+	+	+	+	
1	+	+	+	+	+	
2.5	-	-	-	-	-	2.5%
5	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	-	

Leyenda: (+) Con crecimiento; (-) sin crecimiento

Muestra los resultados del crecimiento de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) frente a las diferentes concentraciones de aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) estableciéndose que la concentración mínima inhibitoria en todos los bioensayos fue de 2.5 % evidenciando por la ausencia de crecimiento bacteriano. Los resultados de 5 repeticiones se observa que en el rango de concentración del aceite de 0.01 hasta 1 % presentó crecimiento de la bacteria patógena (+), mientras que en el rango de 2.5 % hasta 30 % se evidencia la inhibición del crecimiento de la misma (Tabla 4).

El aceite esencial de menta a concentraciones mayores es una sustancia inhibitoria frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), el cual se ha demostrado en la presente investigación, estableciendo que a una concentración de 2.5 % es la más efectiva, en tanto que en la concentración de 0.01 % es insuficiente, debido a que prácticamente no ejerció ningún efecto inhibitorio sobre EPEC.

Estudios realizados por Liesel *et al.*, (2008), obtuvo que a una concentración mínima inhibitoria de 650 – 700 µg/ml la cepa de *Paenibacillus larvae*, es susceptible al aceite esencial de menta (*Mentha piperita*), así también el extracto de paraíso inhibió a una concentración de 5000 µg/ml, en tanto para los aceites de canela presento valores de 25 y 50 µg/ml en la misma cepa estudiada. Por su parte Maguna *et al.*, (2006), en estudios realizados de la actividad antimicrobiana de un grupo 17 terpenoides, de menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum sp.*), salvia (*Salvia fructizosa*), determinaron que 14 terpenoides poseen actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. En la investigación para el aceite esencial de menta se demostró a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2.5 % el cual es el tratamiento que resultó ser la óptima para producir la inhibición de *Escherichia coli* enteropatógena. Así mismo (Sartorato *et al.*, 2004, Demo *et al.*, 2005 & Duarte *et al.*, 2007) manifiestan que la diferencia se puede atribuir a variación en la composición química del aceite, la cual está influenciada por las condiciones del medio ambiente donde se cultiva la planta, por otra parte, difieren en algunos casos las metodologías utilizadas para determinar la actividad antibacteriana.

Los estudios de Martínez *et al.*, (2003), indican que la CMI del aceite esencial de la mandarina (*Citrus reticulata*), sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas presentaron actividad antibacteriana La CMI del aceite esencial de mandarina variedad Dancy para *Bacillus subtilis* fue de 19 %, para *S. aureus* y *L. monocytogenes* fue de 17 %. En tanto Flores *et al.*, (1999), señala que los aceites de perejil (*Petroselinum sativum*), Khoa (*Satureja boliviana*), molle (*Schinus molle*), naranja (*Citrus aurantium*), toronja (*Citrus paradissi*) y mandarina (*Citrus mobilis*), presentaron actividad antibacteriana, reportaron que los aceites de perejil y molle a 3,7 mg/ml y khoa a 7,5 mg/ml inhibió el crecimiento de *Shigella flexneri*.

En la investigación realizada por Hajlaoui *et al.*, (2010), reportan la composición y propiedades antibacterianas de aceite esencial de *Mentha longifolia*. *Ssp longifolia*, contra bacterias Gram positivos y Gram negativas señalan que el análisis químico del aceite esencial mostró la presencia de 34 compuestos. Los más importantes fueron: mentol (32,51 %), mentona (20,71 %), pulegona (17,76 %), 1,8 cineol (5,61 %), terpineol-4 (4,87 %) y piperitona (2,16 %). El aceite presentó actividad antibacteriana sobre los gérmenes con concentraciones mínimas inhibitorias que osciló desde 0.19 hasta 1.56 mg/ml, esta susceptibilidad es más acentuada en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* ATCC 35218 mientras el daño fue menor para *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*. Siendo los principales componentes del aceite, los cuales han sido reportados como sustancias con actividad antimicrobiana. En tanto Badui, (1998), manifiesta que la actividad individual de estos componentes son los responsables directos del efecto antimicrobiano.

Smith-Palmer *et al.*, 1998; Kalemba, Kunica 2003; Holle y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008; Solorsano-Santos & Miranda-Novales 2011 mencionan el modo de acción de los aceites esenciales en cuestión a su carácter hidrófilo o hidrófobo se debe a que tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplasmicas, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo.

En este sentido se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de tres características; su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que se debe atacar (Kalemba y Kunicka 2003; Lopez-Malo *et al.*, Fisher Phillips. Solorsano-Santos Miranda-Novales 2011).

Delaquis *et al.*, (2002), Holley & Patel (2005) mencionan que los componentes fenólicos son los principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales. En el mismo sentido, en una investigación realizada por Fisher y Phillips (2008), ellos reportan que el carvacrol aumenta la fluidez de la membrana y causa fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de membrana y la inhibición de la síntesis del ATP. Por otra parte, la citronela interfiere con los procesos de fotosíntesis, lo que sugeriría que los aceites esenciales no solo pueden estar actuando

en la pared celular, sino que además pueden tener un efecto mayor sobre los sistemas metabólicos.

Por otro lado, Cano (2007), señala que el mecanismo de acción de los aceites esenciales también dependerá del tipo de microorganismos y esta principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos. En las bacterias Gram negativas se ha observado mayor susceptibilidad a los aceites esenciales a diferencia de las Gram positivas y aunque aún no se sabe exactamente la razón por la cual se da este hecho. Por su parte Smith-Palmer *et al.*, (1998), Kalemba & Kunicka (2003) & Fisher, Phillips (2008), reportan que la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas puede está relacionada con la membrana externa que poseen este tipo de bacterias, ya que la hidrofobicidad de la membrana la hace impermeable. Sin embargo, Fisher & Phillips (2008), mencionan que solo hay un retardo del efecto por lo que sugieren que para alcanzar el mismo efecto letal en ambos tipos de bacterias, se requeriría de un mayor periodo de tiempo de exposición a los aceites esenciales en los sistemas modelos. No obstante, esta sensibilidad de los diferentes tipos de bacterias solo se ha observado al utilizar aceites esenciales en forma “*in vitro*” pero no en alimentos.

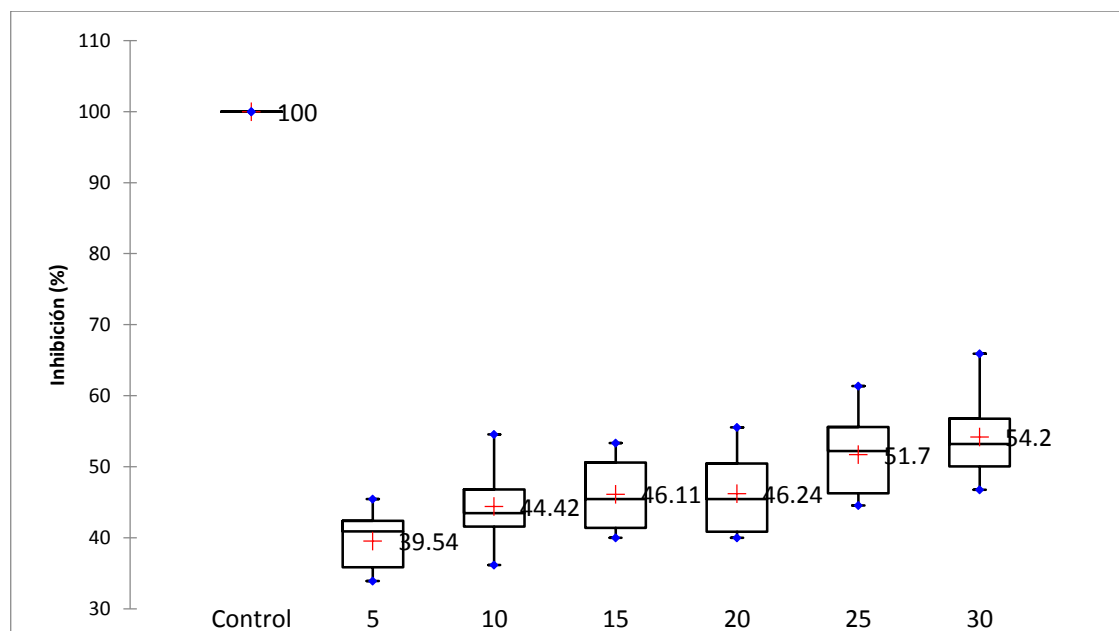
4.2. Para la comparación del efecto inhibitorio del aceite esencial de menta y el antibiótico tetraciclina.

Tabla 5. Inhibición (%) antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de la menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Dosis de aceite esencial de menta (µl)	Numero de repeticiones	(%) de Halos de inhibición (mm)			
		Mínimo	Máximo	Media	D.E.
5	7	33.91	45.45	39.54	4.32
10	7	36.17	54.55	44.42	5.95
15	7	40.00	53.33	46.11	5.48
20	7	40.00	55.56	46.24	6.26
25	7	44.57	61.36	51.70	6.34
30	7	46.74	65.91	54.20	6.46
Control tetraciclina 30 µg	7	100.00	100.00	100.00	0.00

La inhibición porcentual del aceite esencial de menta sobre *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), para el control positivo (tetraciclina) se tiene un valor mínimo de 100 % y máximo de 100, con media de 100 %; para la primera concentración de aceite esencial de 5 µl se obtuvo un mínimo de 33.91 % y máximo de 45.45 % con media de 39.54 %; con 10 µl de aceite se presentó un mínimo de 36.17 % y máximo de 54.55 % con media de 44.42 %; para 15 µl de aceite se tiene mínimo de 40 y máximo 53.33 % con promedio de 46.11 %; con 20 µl se obtuvo un mínimo de 40 y máximo de 55.56 % con media de 46.24 % de inhibición; para 25 µl se obtuvo mínimo de 44.57 y máximo 61.36 % con media de 51.7 %; para 30 µl se tiene mínimo de 46.74 y máximo de 65.91 % con media 54.20 %; la desviación estándar fue mínima de hasta 6.46 % de desviación (Tabla 5).

Figura 2. Inhibición porcentual (%) por acción antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).



El diagrama de cajas para los valores del porcentaje de inhibición por aplicación del aceite esencial de menta sobre *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), se evidencia que el control positivo (tetraciclina) presentó una media superior de efecto inhibitorio (100 %), mientras que en la parte baja se observa un incremento del diámetro de la inhibición al incrementar las concentraciones de aceite esencial de menta, así con 5 µl se tiene 39.54 % de inhibición y con 30 µl se obtuvo 54.2 % (Figura 3).

Para analizar estadísticamente las diferencias observadas se procedió con el análisis de varianza (ANOVA) respectivo:

Tabla 6. Análisis de varianza para inhibición (%) antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de la menta (*Mentha piperita L.*) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr > F
Concentración	6	17794.800	2965.800	101.114	< 0.0001**
Error	42	1231.912	29.331		
Total	48	19026.712			

Diferencia altamente significativa **

El análisis de varianza (ANOVA) para el efecto inhibitorio porcentual, se observa que para la fuente de variación de concentraciones se obtuvo diferencia estadística altamente

significativa ($p < 0.0001$), de lo cual se interpreta que por lo menos una concentración de las utilizadas muestra un efecto diferente respecto a su efecto inhibitorio (Tabla 6)

Una vez comprobada la existencia de diferencia significativa, se procede con la aplicación de la prueba de rango múltiple de Tukey para verificar diferencias específicas.

Tabla 7. Prueba de rango múltiple de Tukey para Inhibición (%) antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de la menta (*Mentha piperita L.*) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Categoría	Media	Grupos de Tukey		
Control	100.00	A		
30	54.20	B		
25	51.70	B	C	
20	46.23	B	C	D
15	46.11	B	C	D
10	44.42		C	D
5	39.54			D

Medias con letra diferente son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$)

En el resultado de la prueba de Tukey, el primer lugar lo ocupa el tratamiento control (tetraciclina) con la mayor inhibición porcentual estadísticamente superior al resto de tratamientos ($p < 0.05$); el segundo lugar lo ocupa la mayor concentración de aceite esencial de menta 30 μ l con 54.20 %; el tercer grupo está formado por las concentraciones de 25 hasta 15 μ l con un efecto intermedio y similar entre sí; mientras que el menor efecto inhibitorio se determinó para 5 μ l de aceite esencial de menta con 39.54 % de inhibición (Tabla 7).

De los resultados del experimento se determinó que la concentración de 30 μ l de aceite esencial de menta presentó el mayor efecto inhibitorio porcentual de todas las concentraciones utilizadas en el estudio, el menor efecto inhibitorio se obtuvo con 5 μ l de aceite esencial.

Estudios realizados por (Hayyan, 2014), obtuvieron que el aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* exhibió mayor actividad antibacteriana con 12.00 mm de zona de inhibición, de igual manera el extracto de agua de menta también poseía actividad antibacteriana con una zona de inhibición de 9.00 mm En esta misma vertiente, Sabahat *et al.*, (2006), con infusión y decocción y aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) frente a 100 aislamientos de diferentes especies de bacilos Gram negativos, reportaron que el aceite esencial de menta muestra mayor actividad antibacteriana con 11.78 mm de zona

de inhibición, en tanto el jugo de menta también posee actividad antibacteriana con 10.41mm zona de inhibición. Del mismo modo Ceylan *et al.*, (2014), señala que observó efecto inhibitorio del aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomona fluorescens* y la levadura *Candida albicans*, excepto para *Pseudomonas aeruginosa* MU 187, En la misma línea Sánchez *et al.*, (2002), obtuvo que la cepa de *Escherichia coli* fue inhibida con una zona de 13.00 mm al aceite esencial de *Aloysia tripilla* (Cedron). En tanto la investigación realizada por (De la Paz *et al.*, 2006), en el Instituto Superior de Medicina Militar (Cuba), de una decocción de *mentha piperita* Linn sobre la lombriz terrestre del género rojo California, reportaron que la decocción de las hojas de *Mentha piperita* L posee un efecto vermífugo. Nuestros resultados obtenidos son similares con los estudios de otros autores del estudio con el aceite esencial de menta.

En un estudio realizado por Sartoratto *et al.*, (2004), sobre la composición y actividad antibacteriana y antifúngica del aceite de las diferentes plantas aromáticas de *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Oreganun vulgaris*, *Aloysia tryphilla*, *Ocimum gratissimum* y *O. basilicum*, reportaron componenes mayoritarios linalool 51.0 %, carvona 23.42 %, 3-octanol 10.1 %, 4-terpinol 8.0 %, α -terpineol 1.31 %, señalan que dichos aceites mostraron efecto inhibitorio sobre *Enterococcus faecium* y *Salmonella*, en tanto *Aloysia tripilla* y *Mentha piperita* L. presentaron activad moderada contra *Candida albicans* a (0.80 mg/ml y 0.74 mg/ml, respectivamente). Así mismo Habiba *et al.*, (2011), realizaron el análisis y la identificación de los aceites esenciales de *Mentha spicata* y el principal componente de esta especie fue la carvona (59.40 %) en tanto para *Mentha pulegium* el mayor componente mayoritario fue la pulegona (38.81 %). además presentaron actividad antibacteriana apreciable. Otras de las moléculas presentes en la especie (menta) es el linalol que es una molécula de alcohol acíclico, según Brooks *et al.*, (1999), los alcoholes son tóxicos por desnaturalizar las proteínas de la pared celular de la bacteria. A estas dos moléculas se le atribuye el efecto antibacteriano en el aceite esencial de esta planta medicinal. En tanto estudios por Katzung, (1996), reportan otros compuestos que están presentes en las plantas aromáticas como el eugenol y el timol que son compuestos fenólicos a los que se les atribuye acción antibacteriana.

Pérez-T, Iglesias (2003). Se conocen que el antibiótico comercial Tetraciclinas constituyen un conjunto de antibióticos naturales (Clortetraciclina, Oxitetraciclina,

Tetraciclina) o semisintéticos (Doxiciclina), fue derivados de diferentes especies de *Streptomyces*. Se caracterizan por compartir el mismo núcleo tetracíclico naftaleno, espectro antimicrobiano, mecanismo de acción y toxicidad. Las principales diferencias radican en su perfil farmacocinético. Son agentes bacteriostáticos con actividad sobre una gran variedad de microorganismos, por lo que se han convertido en antibióticos de uso habitual en los seres humanos.

Los aceites esenciales, compuestos extraídos de varios tipos de plantas, tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. En su estudio Walton y Col. demostró que el extracto destilado del ajo tiene efectos bactericidas y bacteriostáticos, (Cano, 2007), menciona que la acción de los aceites esenciales también dependerá del tipo de microorganismos y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos (Kakrani y Col. 1982), así mismo establecieron, “*in vitro*”, la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antimicótica. Las investigaciones plantean que los aceites esenciales interferirían la fase del metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción. En este sentido, se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que se debe atacar (Fisher y Phillips, 2008; Solórzano - Santos y Miranda – Novales, 2011).

V. CONCLUSIONES

- La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es del 2.5 % de aceite, que sería la menor concentración con la que ya se produce el efecto inhibitorio.
- La dosis de 30 μ l el mismo que equivale a 28.02 mg de acuerdo a la densidad del aceite esencial de menta presentó un 54.20 % de actividad antibacteriana respecto al antibiótico tetraciclina de 30 μ g.
- Existe efecto antibacteriano del aceite esencial de menta en cepa de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), a un ($p < 0.0001$), y un $\alpha = 0.05$, siendo esto estadística altamente significativa.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda determinar en el aceite esencial su composición química y el principio activo de la menta.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de menta a las concentraciones de 2.1 a 3 % para establecer el efecto antibacteriano frente a (EPEC).
- Realizar estudios sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a otros agentes patógenos como *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Staphylococcus aureus*.
- Se recomienda el uso del aceite esencial de menta en la concentración de 2.5 % para el tratamiento alternativo o complementario de la diarrea infantil.

VII. REFERENCIAS

- Agapito T, y Sung L., (2003). Fito Medicina 110 Plantas Medicinales. 1° edición. Lima: Editorial Isabel IRL.
- Araujo DJ, Salas AR. (2008). Actividad antimicrobiana de plantas. Científica; 6(2): 6-18.
- Arias B, y Cols., (2004). *Escherichia coli* enteroagrativa en niños con diarrea de un Hospital de Lima. Revista Peruana de Medicina Experimental y salud pública. Vol. 21(3). 176-178 pp.
- Asociación Argentina de Fitomedicina (2002). Farmacognosia. Aceites esenciales.
- Ávila, L.; Baquero, E.; Viña, A.; Murrillo, E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. Vitae. 3(1):55-60.
- Badui S. (1998). Diccionario de tecnología de los alimentos Editorial Addison. México D.F.
- Basu, S.; Ghosh, A.; Hazra, B. (2005). Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn, *Rubia cordifolia* Linn. And *Lantana camara* Linn: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. Phytotherapy Res. 19(1):888-894.
- Benavides V, D' Arrigo G, Pino J. (2010). Effects of aqueous extract of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) on the preimplantational mouse embryos. Rev Peru Biol. 17(3): 381-384.
- Blatter F, Burland, M. Riley, J. Collado-V., (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277: 1453-1462 pp.
- Bonner J, Galston A., (1980). Principios de Fisiología Vegetal. Novena edición. Editorial Aguilar. Madrid España.
- Brooks G, Butel J, Morse S., (1999). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Décima sexta edición. Editorial el Manual Moderno. México D.F. 900 pp.
- Bruneton J., (2001). Farmacognosia, Fotoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A. 500 pp.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International journal of food microbiology* 94(3): 223-253 pp.
- Cano C., (2007). Actividad antimicótica “*in vitro*” y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis para optar al grado de Magister. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima.
- Carvalho, VM., CL. Gyles, K Ziebell, M A. Ribeiro, JL Catao-Dias, and AF Pestana de Castro., (2003). Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical an atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. *J Clin Microbiol*; 41:1225-34.
- Castro A. María. (2014). *Bacteriología Médica basada en problemas* 2da Edición. México: Editorial el Manual Moderno. 344 paginas.
- Castro V. (2005). Inhibición del Crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus mutans* por Papaína Sanitrend (Tesis de Pregrado) Santiago, Chile: Universidad de Chile.
- Celli J. Deng W, Finlay BB. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol*: 2(1): 1-9 pp.
- Ceylan O, Ugur A, Sarac N, Sahin M, (2014). the antimicrobial and antibiofilm activities of *Mentha X piperita* L. essential oil Turkey, 23-27.pp
- Cravioto A. Vazques V., (1988). *Escherichia coli*. Pathogenic Mechanisms and enterohemorrhagic strains. *Bol Med hosp infant mex* 45(3): 196-197 pp.
- Danika L, y Cols. (1999). Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: Masters of host cell Cytoskeletal Exploration. *Emerging Infectious Diseases*, 5(2): 1-10 pp.
- De la Paz Naranjo J, Maceira M, Salvado A, Campos C, (2006). Actividad antiparasitaria de una decocción de *Mentha piperita* Linn. *Revista cubana* 35(3): 1-4 pp.
- De Vinney R, DG Knoechel, and BB Finlay., (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli* cellular harassment. *Curr Opin Microbiol*; 2:83-8.
- Delaquis, P., Stanich, K., Girard, B. y Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74 (1-2): 101-109.

- Domingo, D.; López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Rev Española Quimioterapia. 16(4):385-393.
- Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. (1997). Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. Trends Microbiol 5(3): 109-114 pp.
- Farreras R., (1995), Medicina Interna. Vol. II, 13 ed. España. Mosby/Doyma, 2276-2278 pp.
- Fernández R, y cols., (2003). *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. Revista Cubana Pedriátrica. Vol. 75(3)
- Finlay BB, I Rosenshine, MS Donnenberg, and JB Kaper., (1992). Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeL a cells. Infect Immun; 60:2541-3 pp.
- Fisher, K. y Philips C., (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. Food Science and Technology. 19(3): 156-164 pp.
- Flores E, Velasco P, Figueroa N, Jiménez A., (1999). Aceites esenciales con propiedades antimicrobianas, revista BIOFARBO – órgano oficial del colegio de Bioquímica y Farmacia de Bolivia, 28 pp.
- Forbes B. A, Sahm D.F. y Weissfeld A. (2004). Diagnostico Microbiológico 11 Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina. 1115 pp.
- Francisco J, Gans Ll. (2008). Fitoterapia. Rev. Xurdimento, 28-29 pp.
- Frankel G, AD Phillips, I Rosenshine, G Dougan, JB Kaper, and S Knutton; (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol Microbiol; 30:911-21 pp.
- Giron J, y Cols., (1993). Distribution Of The Bundle-Forming Pilus Structural Gene (bfpA) among Enteropathogenic *Escherichia coli*. The Journal of Infectious Diseases, 168:1037-1041pp.
- Goldsmith J, Thorpe's. (1967). Dictionary of applied Chemistry. 10° Edición. Londres: Editorial Sir Lan Heilbron; 658pp.
- Guerrero I., (2001). Changing resistancein enteric pathogens, Jacksonville Med; 2: 30 pp.
- Guz, N.; Stermitz, J.; Jhonson, T.; Beeson, S.; Willen, S.; Lewis, K. (2001). Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: structure-activity relationships. J. Med Chem. 44:261-268.

- Habiba B. Adel Nadjib, C Hani, B Farida S., (2011). Composición química y actividad antibacteriana de *Mentha L. pulegium* y *Mentha spicata L.* aceites esenciales. Der Pharmacia Lettre, 3(4) 267-275
- Hajlaoui Hafedh, Ben Abdallah Fethi, Snoussi Mejdí. (2010). Efecto de la *Mentha longifolia L. ssp longifolia* aceite esencial sobre la morfología de cuatro bacterias patógenas visualizado por microscopía de fuerza atómica. Borj-Cedria, BP273 -Soliman8020,Túnez
- Harrison L., (1998). Principios de Medicina Interna. Vol II, 14°ed. España Madrid. Mc Graw Hill Interamericana, 909-911 y 1070-1072 pp
- Hayyan, I, Al-Taweil, (2014). Antimicrobial Effect of Mint Essential Oils on Some Pathogenic Bacteria. Vol. 2, pp: 90-93.
- Heck A, De Witt, B, Likes, A. (2000). Potential Interaction between alternative therapeutics and warfarin. Am J Health-Syst Pharm. 57, pag. 1221-1227.
- Herbotecnia, (2005). Tecnologías de cultivo y poscosecha de plantas medicinales, aromáticas y tintóreas Argentina [http://www.herbotecnia.com ar/aut-muna0.html](http://www.herbotecnia.com.ar/aut-muna0.html)
- Holley, R.y Patel. D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. Food Microbiology. 22(4): 273-292 pp.
- Huamantupa I, Cuba M, Urrunaga R, Paz E, Ananya N, Callalli M, Pallquin, y Coasaca h. (2011). Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expandidas en los mercados de la ciudad del Cusco. Rev. Perú biol. 18(3): 283-291 pp.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar – ENDES 2014.
- Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA). 2003. Manual de procedimientos y control de calidad interno método de Bahuer Kirby. Ministerio de Salud y Deportes, La Paz, Bolivia.
- Instituto Nacional de Salud. (2002). Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antibacteriana por el método de disco difusión, serie de normas técnicas N° 30, 68 pag., Lima – Perú.
- Kakrani K, Nai V., (1982). Antibacterial and antifungal activity of volatile oil from the seeds of *Aglaia odoratissima*. Fitoterapia 53: 107-109 pp.

- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10 (10): 813-829 pp.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2): 123-140 pp.
- Kelley L., (1991). *Medicina interna*. Vol. II, 14 ed. USA. Ed. Médica Panamericana, 1656-1659 pp.
- Kenny B, and BB Finlay., (1995). Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92:7991-5 pp.
- Koneman E.; Stephen A.; Dowell; William, J.; Sommers H.; Winn, W. (1992). *Diagnostico Microbiologico*. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires Argentina. 1695 pag.
- Kuklinski G, (2003). *Farmacognosia*. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Edición Omega, S.A., Barcelona. 515 pp.
- Kurkin, V.; Volotsueva, A.; Avdeeva, E. (2001). Flavolignans of *Silybum marianum* Fruit. *Chem. Natural Compounds*. 37(4):315-317.
- La valle, J., (2001). *Natural Therapeutics Pocket Guide*. 1ra Edición. Lexi-Comp, linc. Ohio, USA.
- Liesel B, Principal J, Maggi M, Palacios S, Fritz R, y Eguaras M. (2008). Extracto de *Melia azedarach* y aceites esenciales de *Cinnamomun zeylanicum*, *Mentha piperita* y *Lavandula officinalis* como control de *Paenibacillus larvae*. *Zootecnia Trop*. 26(2): 151-156 pp.
- Luck de Ugaz, O. (1994). *Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales*. Segunda edición, fondo editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima Perú, 300pp.
- Maguna F, Romero A, Garro O, Okulik N., (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides, Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste UNNE. Sáenz Peña. Argentina.fmaguna@fai.unne.edu.ar
- Margall N, y cols., (1997). *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Española de Salud Pública*, 437-443 pp.
- Martínez J, Sulbaran B, Ojeda G., (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía* vol. 20 N°4 128 pp.

- Muñoz F., (1996). Plantas Medicinales y Aromáticas; estudio, *cultivo y procesado*. 2da Reimpresión. Editorial Mundi Prensa S.A, Madrid España. pp 15, 247, 267, 311, 312, 316, 320
- Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G., (2002). Microbiología Médica. Cuarta Edición. Editorial Edide. Barcelona España. 810 pp.
- Nascimento, G.; Locatelli, J.; Freitas, P.; Silva, G. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. Braz. J. Microbiol. 31:247-256.
- Nataro J, Kaper J., (1998). Diarrhogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev; 11(1):142-201 pp.
- Nieves F, y col., (2000). Tesis sobre incidencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en niños menores de 5 años con cuadro diarreico agudo, Hospital Nacional Docente Madre –niño San Bartolomé,
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Las enfermedades diarreicas. Nota descriptiva N° 330. Abril (acceso 10 enero 2016). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>
- Pastor G. (1991). Estudio Morfohistológico y Microhistoquímico de *Desmodium Vargasanum* (Tesis de Pregrado). Trujillo, Perú: Universidad Nacional del Centro Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Percy D, Arones C., (2007). Manual para la Producción de Plantas Aromáticas y Medicinales. Ministerio de la Mujer y Desarrollo Social.
- Picazo, Juan J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 54 pp.
- Pino J, Ortega A, Rosado A, Rodríguez M, Baluja J., (1997). Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) Brown, Instituto de Investigación para la Industria Alimentaria, revista cubana de farmacia 60 pp.
- Rodríguez G, y cols., (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública de México. 44(5): 464-475 pp.
- Rojas J, Solís H, Palacios O., (2010). Evaluación “*in vitro*” de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. An Fac Med. 71(3); 161-165 pp.

- Sabahat S. Naim A, Taiiq P., (2006). Actividad Antibacteriana “*in vitro*” de la Menta. Pak. J. Bot, 38(3). 869-872, 2006 Pakistán.
- Saleh, M.; Kamel, A.; Li, X.; Swaray, J. (1999). Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. Formerly International J. Pharmacognosy. 37(1):63-66.
- Sánchez C, Bedoya J, Acosta E. (2002). Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia tripilla* sobre *Cepas S. aureus* y *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Sánchez E, García D, Carballo C, Crespo M., (1996). Revista Cubana. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Plant. Med. 1(3):40-45 pp.
- Sanchez, S. y cols. (2004). Caracterización Geno-Fenotípica de aislados de *Escherichia coli* AEEC de pacientes pediátricos con Procesos Diarreicos infecciosos en la ciudad de a Paz: Rev. Soc.Bol. Ped. Vol. 43(3): 132-42
- Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. (2004). Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used In Brazil. 35; 275-280 pp.
- Sherris J. Ryan C. George R. (2002). Microbiología Médica. 2da ed. 793 pag.
- Sisa J., (2004). Recolección de plantas medicinales Ecoaldea. Medicina natural al alcance de todos. <http://www.ecoaldea.Com/plmd/recolección.htm>
- Smith – Palmer A., Stewart J. y Fyfe L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important Food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology. 26(2): 118-1222 pp.
- Solano, (2016), Taxonomía Vegetal. Botánica Sistemática. Universidad Nacional del Altiplano - Puno, Facultad de Ciencias Agrarias. 106 pp.
- Solórzano- santos, F. y Miranda-Novales, MG. (2011). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology. 23(0): 1-6 pp.
- Tadeo U., (2004). Métodos de Separación por Destilación Química Analítica e Instrumental. Universidad de Bogotá, Colombia.
- Theresa J. O., (2001). Frecuencia y patotipos de *Escherchia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea, Rev Peru Med Exp Salud Publica; 28(1): 13-20 pp.

- Thompson W, (1981). Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales 1° Edición, Barcelona: Editorial Blume.
- Tonguino M., (2011), Determinación de las condiciones óptimas para la deshidratación de dos plantas aromáticas: Menta (*Mentha piperita* L.) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) Tesis previa la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial. Ecuador: Universidad Técnica del Norte.
- UICN-OMS-WWF. (1993). Directrices sobre Conservación de plantas medicinales. Organización Mundial de la Salud (OMS) Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) and Worldlife Fund (WWF). Gland. 55 pp.
- Van Ginkel, A. (2003). Plantas medicinales y fitoterapia. Módulo 2. cultivo de plantas medicinales. Tecnología y producción. Apuntes del master y diplomatura de posgrado de la UAB.
- Victoria H, Ramírez Y col., (2002). Plantas Medicinales Volumen II. Centro Nacional de Medicamentos Costa Rica.
- Vidal G, Jorge E., (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Una causa frecuente de diarrea infantil. Salud en Tabasco. México Vol. 9: 188-193 pp.
- Vidal J, Canizález – R, Gutiérrez J, Navarro G., (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena, Department of Molecular Genetics and Biochemistry University of Pittsburgh, School of Medicine, Pittsburgh, EUA. Correo electrónico: jev20@pitt.edu.
- Wen L, Haddad M, Fernández I, (2011). Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3' – formil – 2',4',6' – Trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. Rev Soc Quím Perú; 77(3): 199-204.
- Winfield MD, (2003). Groisman EA. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 69(7):3687-3694 pp.

VIII. ANEXOS

Anexo 1.



Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Ciudad Universitaria, Av. Sesquicentenario N° 1150, Telf.: (051)599430 / IP. 10301 / (051) 366080

N° 001

CONSTANCIA

EL DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que el Sr. **JHONNY ZUNI MAMANI**, identificado con código N° 094543, egresado de la Escuela Profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA**, ha realizado la extracción de ACEITE ESENCIAL de la planta de Menta (*Mentha piperita L.*), asimismo utilizó el Destilador de Aceite del Taller de Frutas y Hortalizas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Se expide la presente constancia, a solicitud del interesado, para los fines que estime por conveniente.

Puno, 18 de abril de 2017.




Alejandro Coloma Paxi
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
UNA-PUNO

C.c.
Archivo.-
ACPI.

E-mail: direccion.epiai@unap.edu.pe

Anexo 2.**MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD***"Año de la consolidación del Mar de Grau"***CEPA : 2.840-14****A) Pruebas Bioquímicas:**

Mac. Conkey: Lactosa Positiva

TSI: A/A ++-

LIA: K/A +

Citrato Simmons: Negativo

Urea: Negativo

B) Pruebas Moleculares:

Gen eae : Positivo

RESULTADO : Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

Blgo. Ronnie Gavilan Chávez
Responsable del LRN de Enteropatógenos
LRNE/DEET/CNSP

RG/car

Tabla 8. Formación de halos de inhibición.

REPETICIONES	Diámetros de halos de inhibición (mm)						
	DOSIS DE ACEITE ESCENCIAL (μ l)						
	CONTROL	5	10	15	20	25	30
1	22	9	9.5	10	10.5	12	12.5
2	23	7.8	10	9.5	9.5	10.25	10.75
3	22.5	8	9	9	9	11.75	12.75
4	23.5	10	10.5	11.5	12.5	11.25	12.5
5	22.5	10	12	11.5	10	13.5	14.5
6	23.5	8.5	8.5	9.75	9.5	10.5	11.25
7	22.5	9.5	11	12	12.5	12.75	11.75
PROMEDIOS	22.79	8.97	10.07	10.46	10.50	11.71	12.29

Tabla 9. Inhibición porcentual del aceite esencial respecto al de Tetraciclina.

REPETICIONES	% de inhibición respecto a la tetraciclina (30 μ g)						
	DOSIS DE ACEITE ESCENCIAL (μ l)						
	CONTROL	5	10	15	20	25	30
1	100	40.91	43.18	45.45	47.73	54.55	56.82
2	100	33.91	43.48	41.30	41.30	44.57	46.74
3	100	35.56	40.00	40.00	40.00	52.22	56.67
4	100	42.55	44.68	48.94	53.19	47.87	53.19
5	100	45.45	54.55	52.27	45.45	61.36	65.91
6	100	36.17	36.17	41.49	40.43	44.68	47.87
7	100	42.22	48.89	53.33	55.56	56.67	52.22
PROMEDIOS	100	39.54	44.42	46.11	46.24	51.70	54.20

Tabla 10. Halos de Inhibición (mm) antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de la menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Dosis de aceite esencial de menta (µl)	Numero de repeticiones	Halos de inhibición (mm)			
		Mínimo	Máximo	Media	D.E.
5	7	7.80	10.00	8.97	0.91
10	7	8.50	12.00	10.07	1.21
15	7	9.00	12.00	10.46	1.18
20	7	9.00	12.50	10.50	1.44
25	7	10.25	13.50	11.71	1.17
30	7	10.75	14.50	12.29	1.22
Control tetraciclina 30 µg	7	22.00	23.50	22.79	0.57

Figura 3. Halos de Inhibición (mm) por acción antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de la menta (*Mentha piperita L.*) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

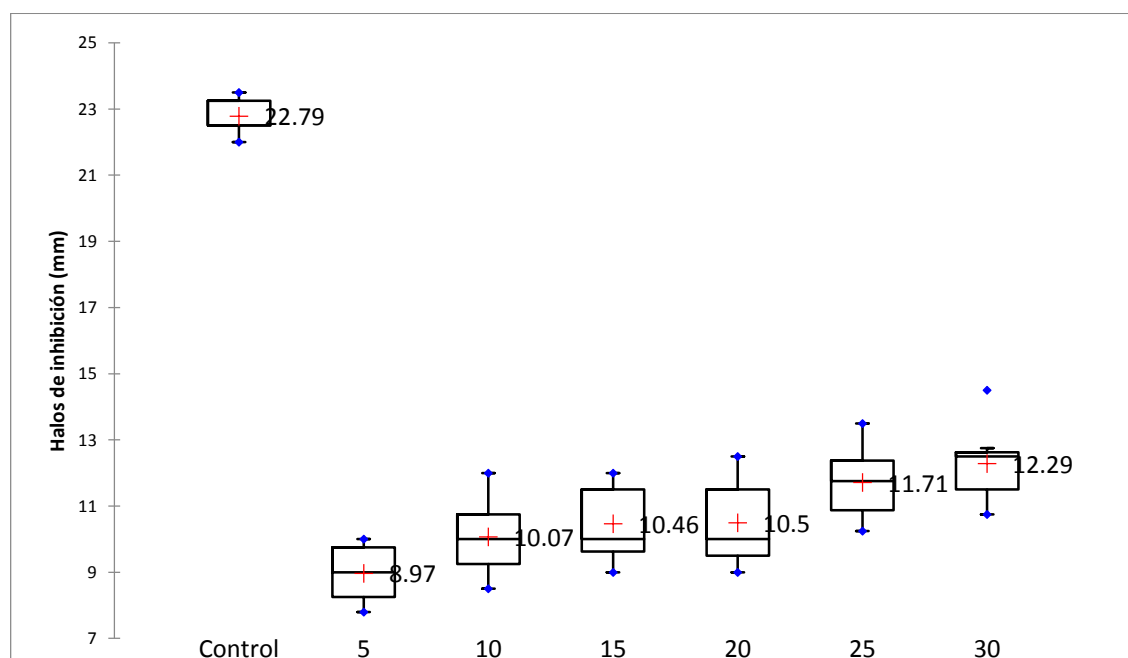


Tabla 11. Análisis de varianza para halos de Inhibición (mm) antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr > F
Concentraciones	6	930.165	155.027	121.731	< 0.0001**
Error	42	53.488	1.274		
Total	48	983.652			

Diferencia altamente significativa **

Tabla 12. Prueba de rango múltiple de Tukey para halos de Inhibición (mm) antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Categoría	Media	Grupos de Tukey			
Control	22.786	A			
30	12.286		B		
25	11.714		B	C	
20	10.500		B	C	D
15	10.464		B	C	D
10	10.071			C	D
5	8.971				D

Medias con letra diferente son estadísticamente diferentes entre si (p<0.05)



Figura 4. Tallo de Menta (*Mentha piperita* L.)



Figura 5. Secado y pesado de las hojas y tallos de menta (*Mentha piperita* L.)



Figura 6. Extracción del aceite esencial de menta por arrastre a vapor de agua.

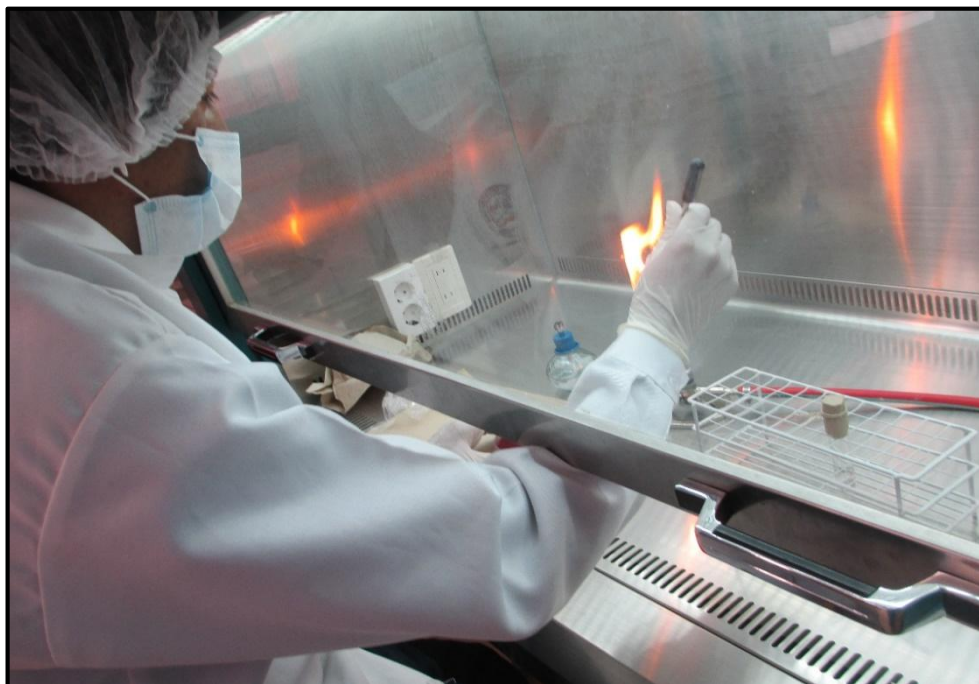


Figura 7. Reactivación de la cepa de *Escherichia coli* enteropatógena en medio de cultivo Agar Mac Conkey.

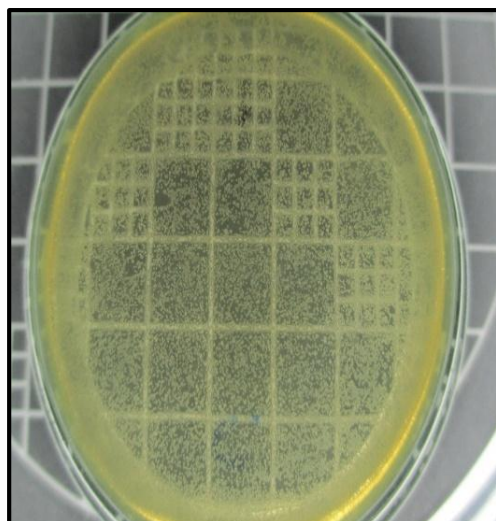


Figura 8. Colonias de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) sin tratamiento con el aceite esencial de menta.



Figura 10. Efecto inhibitorio del aceite esencial sobre *E. coli* enteropatógena (EPEC) en medio Müller Hinton.



Figura 9. Prueba de efecto inhibitorio por difusión en placa



Figura 11. Aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.)

- 1
- 2
- 3