



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

“Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata*
sobre *Escherichia coli* cepa 25922 comparado con norfloxacino, in vitro”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MEDICO
CIRUJANO

AUTORA:

MARÍA LAURA FIGUEROLA VÁSQUEZ

ASESORES:

DR. MARCO ANTONIO ALFARO ANGULO

MG. JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ SOSAYA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

TRUJILLO - PERÚ

2018

Dedicatoria

En primer lugar, a Dios por ser el fundamento de vida, por brindarme amor, salud y fortaleza para lograr mis metas trazadas.

A mis padres, por enseñarme que todas las cosas se deben valorar, cultivar y perseverar para alcanzar los objetivos de la vida.

A mi asesor Dr. Marco Antonio Alfaro Angulo por su gran apoyo y motivación para la culminación de esta investigación, transmitiéndome sus conocimientos obtenidos.

Agradecimiento

Le agradezco a Dios por acompañarme y guiarme en mis anhelos, por ser mi fortaleza en los momentos débiles y por regalarme una vida llena de oportunidades y bendiciones.

Le doy gracias a mis padres por su apoyo incondicional, por las enseñanzas que me han inculcado, y por ser un gran ejemplo de vida a seguir.

A mi Universidad César Vallejo por ofrecerme día a día grandes conocimientos, a través de mis educadores para ser una gran profesional.

Presentación

Señores Miembros del Jurado,

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo para obtener el título profesional de médico cirujano, presento ante ustedes la Tesis titulada “Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* sobre *Escherichia coli* cepa 25922 comparado con norfloxacino, estudio in vitro” cuya finalidad es aportar conocimientos básicos de los efectos del aceite esencial de la menta sobre *E. coli*, para poder seguir realizando investigaciones cada vez más perfeccionadas, inclusive llegando a verificar el efecto de la planta en humanos. El presente trabajo está organizado en los siguientes capítulos:

El capítulo I, trata la realidad problemática, los trabajos previos a nivel internacional, nacional y local; las teorías relacionadas al tema, la formulación del problema, su justificación, hipótesis y objetivos.

El capítulo II, aborda la parte metodológica, donde se detalla el diseño de investigación, las variables, su operacionalización, población, técnicas métodos de análisis y aspectos éticos.

Finalmente se ofrecen las referencias y los anexos relacionados al tema de investigación.

Segura de cumplir con los requisitos de aprobación, confío en que ustedes sabrán valorar el esfuerzo desplegado en su elaboración. En espera de su justo criterio al emitir su dictamen correspondiente al contenido de este trabajo, expreso por adelantado mi más sincera gratitud.

María Laura Figuerola Vásquez

Índice

PÁGINA DEL JURADO.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento	iii
Declaratoria de autenticidad	iv
Presentación.....	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Realidad problemática:.....	1
1.2. Trabajos previos:.....	2
1.3. Teorías relacionadas al tema	5
1.4. Formulación de problema:	7
1.5. Justificación al estudio:	7
1.6. Hipótesis:.....	7
1.7. Objetivos:	7
1.7.1. Objetivo general:	7
1.7.2. Objetivos específicos:	8
II. MÉTODO	8
2.1. Diseño de investigación:	8
2.2. Variables y operacionalización:.....	8
2.3. Población y muestra.....	10
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	10
2.5. Métodos de análisis de datos.....	11
2.6. Aspectos éticos:	11
III. RESULTADOS.....	12
IV. DISCUSIÓN	14
V. CONCLUSIONES	16
VI. RECOMENDACIONES	17
VII. REFERENCIAS:.....	18
ANEXO 1	23
ANEXO 2	24

ANEXO 3;Error! Marcador no definido.5

RESUMEN

El objetivo de la investigación es determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* sobre *Escherichia coli* cepa 25922 comparado con norfloxacino, in vitro, se realizó estudio experimental; la población consistió en cultivo de *Escherichia coli*. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mentha spicata* frente al agente seleccionado se determinó mediante el método de expansión de Kirby Bauer modificada. Los resultados obtenidos en esta investigación fueron que el aceite esencial a una concentración de 75% tiene efecto antibacteriano contra *Escherichia coli*. Se concluyó que ambos grupos de tratamientos estudiados presentan efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922, siendo mayor el efecto antibacteriano del norfloxacino.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, *Escherichia coli*, *Mentha spicata*, Norfloxacino.

ABSTRACT

The objective of the research is to determine the antibacterial effect of the essential oil of *Mentha spicata* on *Escherichia coli* strain 25922 compared to norfloxacin, in vitro, an experimental study was conducted; the population consisted of the cultivation of *Escherichia coli*. The antimicrobial activity of the *Mentha spicata* essential oil against the selected agent was determined by the modified Kirby Bauer expansion method. The results in this investigation were: the essential oil at a concentration of 75% has an antibacterial effect against *Escherichia coli*. It was concluded that both groups of treatments studied the antibacterial effect on *Escherichia coli* strain ATCC 25922, the antibacterial effect of norfloxacin being greater.

Key words: Antibacterial effect, *Escherichia coli*, *Mentha spicata*, Norfloxacin.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad problemática:

Cada año miles de individuos se ven afectados por diferentes cepas patógenas de *Escherichia coli*, este es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. En estos últimos años, se evidenció un incremento de brotes por *E. Coli* productora de toxina shiga y se registraron múltiples casos de diarreas sanguinolentas, provocando síndrome hemolítico urémico en un grupo determinado. (1)

Para las enfermedades originadas por esta bacteria existen opciones de tratamiento como el farmacológico, mediante el uso de fluoroquinolonas, dentro de este grupo el norfloxacino, cuya acción es bactericida. (2) Por otro lado, el uso de medicina alternativa para atacar a cepas de *Escherichia coli* se utiliza la *Mentha spicata* (Hierbabuena), por su efecto comprobado en diversos estudios (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). La *Mentha spicata*, es una hierba aromática que florece en verano, oriunda de Europa central, que posee diversas propiedades medicinales constatadas como antiespasmódico, carminativo, antiséptico, antiinflamatorio, entre otras (10, 11, 12, 13, 14, 15). Los componentes químicos del aceite y de las hojas de la planta varían según las variedades, zona geográfica y condiciones del procesamiento. Estos aceites son mezclas complejas de componentes químicos con características aromáticas, con actividad antimicrobiana, teniendo la capacidad de colapsar la membrana celular de bacterias. Por ello, los aceites esenciales han sido estudiados por su actividad biocida sobre diversos microorganismos patógenos entre ellos la *Escherichia coli*., como a continuación se menciona.

En nuestro país mediante un estudio realizado en Puno, confirmaron los resultados obtenidos por investigaciones realizadas en diversos países, corroborando que el aceite esencial de *Mentha spicata* tiene efecto antibacteriano en cepas de *E. coli enteropatógena* a una concentración mínima inhibitoria de 2.5%. (16)

En Pakistan se realizó un estudio experimental sobre el efecto antibacteriano de *Mentha spicata* en cepas de *Escherichia coli*, esta investigación sugirió emplear esta planta para tratar diversas infecciones causadas por microbios, debido a que presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas. (3)

En Marruecos determinaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tres plantas, una de ellas fue *Mentha spicata*, contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en esta investigación, se pudo determinar que las plantas contienen flavonoides, fenoles de taninos, terfenoles, carbohidratos, flobotanina, alcaloides, antioxidantes y actividad antimicrobiana, no solo de manera individual sino mezclados permitiendo una posible sinergia. (4)

1.2. Trabajos previos:

Qadir M, et al. (Pakistan, 2017) investigaron los contenidos fenólicos, flavonoides y las actividades antioxidantes y antimicrobianas de *Mentha spicata*, entre otras. Realizándolo mediante un estudio experimental. La población estuvo basada en cultivo de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pasteurella multocida*. Los extractos de estas hierbas se analizaron para determinar la actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas seleccionadas por el método de difusión de disco. Se concluyó que los extractos de las plantas son una fuente potente de antioxidantes, tienen actividad antimicrobiana y algunas actividades antifúngicas contra microbios patógenos. (3)

Ismaili R. et al. (Marruecos, 2014) evaluaron la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris* y *Citrus limonum* sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En un estudio experimental, la muestra fue basada en los cultivos de estas bacterias. El análisis de su composición química fue determinado por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Los halos de inhibición obtenidos frente a *Escherichia coli* de la *Mentha spicata* fue de 22.50 mm, *Thymus vulgaris* 18 mm y *Citrus limonum* 20 mm. Concluyeron que los tres aceites esenciales estudiados tienen una notable actividad antibacteriana ante *S. aureus* y *E. coli*, y no solo de manera individual sino mezclados permitiendo una posible sinergia. (4)

Shahbazi Y. (Irán, 2015) estudió la actividad del aceite esencial de *Mentha spicata* contra bacterias patógenas comunes transmitidas por los alimentos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157: H7, en un estudio experimental. Se utilizaron *Mentha spicata* y las 6 bacterias patógenas descritas. La actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó mediante el método de micro dilución en caldo y el ensayo de difusión en disco de agar.

Concluyó que el aceite esencial de *Mentha spicata* posee una notable actividad antibacteriana frente a todos los microorganismos estudiados. (5)

Zaidi, S. (India, 2015) determinó el efecto de los aceites esenciales de *Mentha spicata* y *Mentha piperita* frente a diversos agentes bacterianos, utilizando un diseño experimental. La muestra la conformaron cultivos de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* El efecto antibacteriano se investigó utilizando el método bioautográfico de cromatografía en capa fina. El aceite esencial de *Mentha spicata* demostró zonas de inhibición del crecimiento bien definidas contra *E. coli* con un halo de inhibición de 14 mm. Concluyó que los aceites esenciales de las especies de la planta poseen actividad antimicrobiana contra varios agentes estudiados y por lo tanto pueden ser una buena fuente de agente antimicrobiano natural. (6)

Bensabah F. et al. (Marruecos, 2013) analizaron la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Mentha Spicata* y *Lippia Citriodora* irrigada por aguas residuales mediante un estudio experimental. Para evaluar su actividad antibacteriana fue probada contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus aureus* ATCC 29213 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. El método de difusión en disco de agar se empleó para la determinación de las actividades antibacterianas de aceites esenciales. Se evidenció que el aceite esencial de *Mentha Spicata* inhibe el crecimiento de tres especies con una inhibición máxima sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con un halo de inhibición de 19 seguido de *E. coli* con un halo de inhibición de 13.66. Concluyeron que los aceites esenciales de *Mentha Spicata* tienen propiedades antibacterianas contra las tres especies de bacterias estudiadas. (7)

Moosavy M. et al. (Irán, 2013) evaluaron la eficacia antimicrobiana de nisina y el aceite esencial de *Mentha spicata* por separado y en combinación, contra *Escherichia coli* O157: H7 a diferentes temperaturas (4, 9 y 14 ° C), pH (5, 6 y 7) y concentraciones de NaCl (0, 1, 2 y 4%). Investigación realizada mediante estudio experimental, cuya muestra fueron *Mentha spicata*, nisina y *Escherichia coli* O157. El método utilizado para los componentes químicos del aceite esencial fue por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de nisina y aceite esencial se evaluaron

mediante el método de microdilución de caldo. Para combinaciones de antimicrobianos se utilizó el ensayo de diferencias en la población, para determinar sus efectos. Se concluyó, que la susceptibilidad de *E. coli* O157: H7 a nisina y al aceite esencial mejoraba al aumentar la temperatura de incubación, el pH y la concentración de NaCl, demostrando que una combinación de nisina y aceite esencial de *Mentha spicata* podría ser una fuente potencial de conservante para el control de *E. coli* O157: H7 en la industria alimentaria. (8)

Roldán L. et al. (Colombia, 2010) investigaron la actividad antibacteriana y los componentes de aceites adquiridos de plantas sembradas en los Andes Colombianos entre ellas *Mentha spicata* y un aceite esencial comercial de *Origanum vulgare subsp. Hirtum*, utilizando un diseño experimental. La población estuvo constituida por las 6 plantas. La composición de los aceites fue establecida por cromatografía de gases espectrofotometría de masas y el efecto antimicrobiano contra agentes patógenos como *Escherichia coli*, fue determinada por la concentración mínima bactericida mediante el método de dilución en agar. La *Mentha spicata* presentó una concentración mínima inhibitoria de 5 mg/ml sobre *Escherichia coli*, siendo mayor en *Salmonella enteritidis* y *salmonela typhimurium* con un 40 mg/ml. Este estudio concluyó que el efecto antibacteriano de los aceites esenciales no solo depende de sus componentes químicos, sino también del agente por sí mismo. (9)

Snoussi, M. et al. (Suiza, 2015) investigaron la composición química, actividades antioxidantes y antibacterianas del aceite esencial de *Mentha spicata* sobre el *Plancton* y *Biofilm Culturas de Vibrio spp*, utilizando un diseño experimental. La población analizada fue la *Mentha spicata*. Los componentes del aceite esencial fueron determinados por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas. La actividad antimicrobiana fue evaluada por disco ensayos de difusión y microdilución. Esta investigación concluyó que el aceite estudiado exhibió una alta potencia antioxidante. (17)

1.3. Teorías relacionadas al tema

La *E. coli* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa de la familia *Enterobacteriaceae* que se localiza habitualmente en la flora intestinal. No acostumbra generar algún problema, más bien es útil para el adecuado funcionamiento del proceso digestivo. La mayoría de cepas, son organismos inofensivos cuando están en su medio natural. No obstante, algunos tipos debido al cambio de material genético han obtenido la capacidad de producir infecciones y ocasionar diferentes tipos de diarreas, llegando a considerarse patógenos gastrointestinales peligrosos para las personas incluso para algunos animales. (1, 18, 19)

Existen seis tipos de *E. coli* según los mecanismos de patogenicidad, *E. Coli Shigatoxigénica* o *verotoxigénica*, *enterohemorrágica*, *enterotoxigénica*, *enteroinvasiva*, *enteropatógena*, *enteroagregativa* y de adherencia difusa. La *E. coli Shigatoxigénica* produce manifestaciones clínicas como diarrea leve hasta diarrea sanguinolenta severa. Un 10% de los pacientes principalmente jóvenes y ancianos pueden llegar a sufrir de síndrome urémico hemolítico. La *E. coli enterohemorrágica* se asocia principalmente a diarrea sanguinolenta y al síndrome urémico hemolítico. Este tipo de *E. Coli patógena* y la *enteropatógena* producen lesiones destructoras. *E. coli enterotoxigénica* se caracteriza por provocar diarrea acuosa en menores y en viajeros, se adhiere al intestino delgado y luego produce toxinas termoestables. La *E. coli enteroinvasiva* se introduce y se dispersa entre las células del intestino, erradicando y ocasionando una diarrea sanguinolenta. Por otro lado, la *E. coli enteropatógena* produce una diarrea acuosa y en raras ocasiones sanguinolenta. La *E. coli enteroagregativa* genera diarreas líquidas y persistentes en niños de corta edad. (18, 19, 20)

En cuanto al tratamiento farmacológico, dentro de las fluoroquinolonas, está el norfloxacin, antibiótico sintético del grupo de las quinolonas de amplio espectro, es un agente bactericida por su efecto inhibitor del ADN girasa provocando la muerte celular de la bacteria; actúa contra la mayoría de bacterias aerobias Gram negativas incluyendo las *Enterobacteriaceae* y *Pseudomona aeruginosa*, está indicado principalmente en infecciones del tracto genitourinario y gastrointestinal. (2, 21, 22)

En medicina alternativa para combatir la bacteria en estudio se cuenta con la *Mentha spicata*, perteneciente a la familia de las lamináceas, de crecimiento rápido, posee rizomas y excede los 75 cm de altura. Esta hierba es originaria de Asia, Europa y África, es una especie oriunda de climas templados, aunque también la podemos encontrar en lugares húmedos y fríos; florecen en meses de verano, en todo tipo de suelos, pero opta por aquellos que son arcillosos, húmedos, fértiles, levemente ácidos y adecuadamente drenados. (23, 24, 25)

Las partes utilizadas de la *Mentha Spicata* son hojas y tallos, los principios activos de su aceite son linalol, acetato de linalilo, pulegona y piperitona. En cuanto a su composición química, está compuesta principalmente por mentol, proteínas, yodo, vitaminas; contiene flavonoides como luteolina, eriocitrina y hesperidina; y las formas de uso recomendadas son decocción, infusión, esencia, baños e inhalaciones. (14, 23, 24, 25) Farmacológicamente, la planta posee enzimas (peroxidasa, polifenol oxidasa, calatasa) que le brindan la capacidad de degradar la pared bacteriana, en cuanto a los componentes de sus hojas se encuentran los terpenos, que son los encargados de romper la membrana celular por medio de los compuestos lipofílicos (23, 24, 25, 26). Entre las propiedades principales de *Mentha spicata*, se utilizan como antiespasmódico, carminativo, antiemético, analgésico, antivirales, antiséptico, antihelmíntico, para favorecer la digestión gástrica, evitar cefalea, cólicos, aliviar irritaciones en la garganta, las flatulencias, entre otras. (14, 23, 24, 25, 26)

El aceite esencial de *Mentha spicata* es eficaz contra *Penicillium digitatum*, debido a que posee componentes como los terpenoides, que permiten aumentar la permeabilidad y debilitar la pared celular (23, 27), asociándose pérdida de iones y disminución en el potencial de membrana. (23, 28) En nuestro país, se ha evidenciado que esta planta tiene moderada actividad anti *Trypanosoma cruzi* en comparación de los aceites esenciales de *Cimbopogon citratus* (hierba luisa) y *Aloysia triphylla* (cedrón) que inhibieron el crecimiento de la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, cuyo componente principal de ambas plantas es el citral, sustancia reconocida por sus propiedades antibacterianas (29).

Asimismo, en una investigación se confirmó que la *Mentha spicata* tiene compuestos antimicrobianos contra mohos en los alimentos, dado que el aceite esencial atraviesa la pared celular y membrana citoplasmática de los mohos, modificando la estructura de los polisacáridos, fosfolípidos y ácidos grasos, deteriorando de esta manera las capas de

proteínas y lípidos (12). Posteriormente en España, realizaron una investigación comparando el efecto inhibitorio de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato y *Mentha spicata* sobre *Enterobacter cloacae*, se evidenció que el citrato fue más eficiente que la *mentha*, gracias a la liberación de los iones plata, puesto que estos son los encargados de las propiedades biológicas de este metal (30).

1.4. Formulación de problema:

¿Qué efecto antibacteriano tiene el aceite esencial de *Mentha spicata* sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 comparado con norfloxacino, en un estudio in vitro?

1.5. Justificación al estudio:

Determinadas cepas de *E. coli* son un problema de salud actual, debido a que producen una toxina que puede causar daños graves incluso la muerte. Por ello, el presente trabajo tiene como finalidad aportar conocimientos de los efectos del aceite esencial de *Mentha spicata* sobre *E. coli*, para motivar a realizar investigaciones posteriores, debido a que la mayoría de estudios realizados son de otros países y de ser factible, en un futuro llegar a verificar el efecto de la planta en humanos ya que sería muy fácil de industrializarla y comercializarla a un bajo precio.

1.6. Hipótesis:

H1: El aceite esencial de la hoja de *Mentha spicata* tiene mayor efecto antibacteriano que el norfloxacino sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922, estudio in vitro.

H0: El aceite esencial de la hoja de *Mentha spicata* tiene menor efecto antibacteriano que el norfloxacino sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922, estudio in vitro.

1.7. Objetivos:

1.7.1. Objetivo general:

- Evaluar si el aceite esencial de *Mentha spicata* tiene mayor efecto antibacteriano que el norfloxacino sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922, in vitro.

1.7.2. Objetivos específicos:

- Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.
- Determinar el efecto antibacteriano del norfloxacinó sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.

II. MÉTODO

2.1. Diseño de investigación:

Experimental únicamente con post prueba y grupo control.

RG1 X1 O1

RG2 X2 O2

RG3 X3 O3

Dónde:

RG: Grupos de estudio

G1: Aceite esencial de la hoja de *Mentha Spicata* al 75%

G2: Tratamiento con gold estándar: Norfloxacinó

G3: Control negativo: Agua destilada

O: Las observaciones del diámetro del halo de inhibición.

2.2. Variables y operacionalización:

Variable independiente: Tratamiento antibacteriano sobre *E. coli*.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano.

Operacionalización de variables:

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Efecto antibacteriano	Es el efecto capaz de evitar el crecimiento de bacterias incluso de provocar su lisis. (1)	Se consideró efecto bacteriano en <i>E. coli</i> si es capaz de inhibir un halo de inhibición.	Efecto antibacteriano Sin efecto antibacteriano	Cualitativa nominal
Tratamiento antibacteriano sobre <i>E. coli</i>	<i>Mentha spicata</i> es una hierba aromática perteneciente a la familia de las lamináceas, es de crecimiento rápido, posee rizomas y excede los 75 cm de altura. (24) Norfloxacino es un antibiótico sintético del grupo de las quinolonas de amplio espectro, es un agente bactericida por su efecto inhibidor del ADN girasa provocando la muerte celular de la bacteria. (22)	Concentración de <i>Mentha spicata</i> al 75%. Concentración de 10 ug/ ml de Norfloxacino. Agua destilada	<i>Mentha spicata</i> Norfloxacino Agua destilada	Cualitativa nominal

2.3. Población y muestra

La población estuvo constituida por 21 placas Petri cultivadas con cepas de *Escherichia Coli* ATCC 25922 en el Laboratorio clínico San José. La muestra fue a conveniencia.

Se usaron 21 placas Petri y se realizó 21 observaciones, el tratamiento se administró al azar al igual que el control negativo (agua destilada) (Anexo 1)

La unidad de análisis fue el halo de inhibición de *Escherichia Coli* cepa ATCC 25922

Criterios de selección:

Criterios de inclusión:

- Cepa cultivada de 18 -24 horas.
- Placas Petri con cultivos viables.

Criterios de exclusión:

- Cepa o muestra contaminada.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

La técnica fue la observación directa de los cultivos en las placas Petri.

El instrumento que se usó fue elaborado por la autora, constó de una ficha de recolección, en la cual se registraron los resultados de la observación de las placas, las concentraciones y halos de inhibición del aceite esencial de *Mentha spicata* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a las 24 y 48 horas. (Anexo 2).

La producción del aceite fue a partir de 10 kilos de hojas secas, compradas en el Vivero de la municipalidad de Trujillo, cultivadas en invernadero, ya que brindan semillas y plantas certificadas siguiendo un proceso de producción integral y riguroso, constituido por etapas productivas específicas, sujeto a normas técnicas oficiales que regulan, entre otros aspectos, la evaluación, aislamiento y manejo agronómico, con el fin de asegurar la calidad sanitaria y genética de las plantas, dándole la capacidad de poder ser utilizadas en la realización de estudios. Estas plantas fueron sometidas a destilación, por el método de arrastre por vapor de agua. El destilado se separó teniendo en cuenta las propiedades y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de decantación de vidrio, seguidamente

se deshidrató la turbiedad del agua en el aceite esencial con sulfato de sodio anhidro, luego se filtró. Posteriormente, el aceite obtenido se guardó en recipientes herméticos a 4°C (31).

Se utilizó cepa de *Escherichia Coli ATCC 25922* adquiridas del Instituto nacional de salud, luego se estableció la sensibilidad o resistencia bacteriana de acuerdo al halo de inhibición conforme al Instituto de normas clínicas y de Laboratorio. (31), inoculándolo de manera uniforme en la placa Petri agar Mueller Hinton –sangre, las placas se incubaron en micro anaerobiosis a 37 grados centígrados. (32)

Para determinar el efecto antibacteriano de la *Mentha spicata* se aplicó el método de expansión de Kirby Bauer modificada (32) empleando discos de papel filtro, los cuales estuvieron impregnados con el aceite esencial de la *Mentha spicata* al 75% para evaluar su efecto; estas se pusieron sobre las siembras de *E. coli* en las placas Petri cultivadas y se interpretaron los resultados en 24 y 48 hrs por reconocimiento visual de cada placa, calculando posteriormente los halos de inhibición (Anexo 3). Se empleó como control positivo círculos de Norfloxacin 10 ug/ ml patentado por SAVANT pharma S.A., marca ACTOBIAN autorizado por la legislación del Ministerio de Salud, a través de la dirección general de medicamentos insumos y drogas (22) y como control negativo círculos con agua destilada.

Validez y confiabilidad del instrumento no aplica.

2.5. Métodos de análisis de datos

Se utilizó la prueba T de student para contrastar hipótesis sobre medias en poblaciones con distribución normal, permitiendo comparar el diámetro medio de *Mentha spicata* y norfloxacin, luego se realizó el análisis de varianza (ANOVA) permitiendo determinar si los tratamientos utilizados muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren.

2.6. Aspectos éticos:

Para la realización del estudio se respetaron las medidas de bioseguridad brindadas por el Ministerio de Salud (34) y por el laboratorio clínico San José.

III. RESULTADOS

Tabla N° 1. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.

<i>Mentha spicata</i>	N°	Promedio de halo inhibitorio
Concentración al 75%	10	8.9

El aceite esencial de *Mentha spicata* al 75% tiene un promedio de halo de inhibición de 8.9 mm sobre *Escherichia coli*.

Tabla N° 2. Efecto del Norfloxacino sobre cepas de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.

Tratamiento farmacológico	N°	Promedio de halo inhibitorio
Norfloxacino	10	25.3

El norfloxacino tiene un halo de inhibición con mayor promedio sobre *Escherichia coli*.

Tabla N° 3a. Análisis de varianza para inhibición antibacteriana del aceite esencial de la de *Mentha spicata* y Norfloxacino sobre cepas de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3717.88	4	929.5	223.1	1.0
Dentro de grupos	187.5	45	4.2		
Total	3905.38	49			

El análisis de varianza para el efecto inhibitorio porcentual, se observa en este estudio el valor de p es mayor de 0.05, por ende existe diferencia significativa entre las concentraciones de *Escherichia coli* ATCC 25922 y norfloxacino. Para determinar el mejor efecto se realizó las comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla N° 3b. Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* y Norfloxacino sobre cepas de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.

Tratamiento	N°	Promedio de halo de inhibición	Significancia bilateral
<i>Mentha spicata</i> al 75%	10	8.9	1.0
Norfloxacino	10	25.3	1.0
Agua destilada	10	0	1.0

El norfloxacino presenta efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* con un halo de inhibición promedio de 25.3 mm, mientras que el aceite esencial de *Mentha spicata* a una concentración del 75% presenta menor efecto antibacteriano con un halo de inhibición de 8.9 mm y el agua destilada no tiene efecto antibacteriano.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio basado en el cual se comparó el efecto antibacteriano de *Mentha spicata* y norfloxacino sobre cepas de *Escherichia coli*, nos muestra que la *Mentha spicata* tiene menor efecto antibacteriano que el tratamiento farmacológico. Estos resultados son semejantes a los reportados por diversos estudios como el realizado por Qadir M, et al., en el 2017, quienes utilizaron la *Mentha spicata* al 50% sobre *Escherichia coli* y la Rifampicina como antibiótico, obteniendo mayor efecto antibacteriano en el tratamiento farmacológico (3).

Zuni en el 2017, demostró que la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Mentha* frente a *Escherichia coli enteropatogena* es del 2.5%, mientras que el antibiótico elegido en este caso la tetraciclina de 30 µg presentó un 54.20 % de actividad antibacteriana.

Otro estudio que corrobora los datos obtenidos, es el realizado por Bensabah F. et al, en Marruecos (7), evidenciaron que el aceite esencial de *Mentha Spicata* inhibe el crecimiento de tres especies; siendo la inhibición máxima sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con un halo de inhibición de 19 mm, seguido de *E. coli* y *Ps. aeruginosa* ATCC 27853.

Zaidi, S. (6) realizó una investigación en la India, determinando que la planta posee actividad antimicrobiana contra varios agentes bacterianos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* y además en aislados de hongos; mostrando una actividad máxima contra *S. aureus* 1, produciendo un halo de inhibición 21 ± 0.09 mm. Además, demostró zonas de inhibición del crecimiento bien definidas contra *Acinetobacter spp* con un halo de inhibición de 18 mm. Asimismo, formó un halo de inhibición de 14 mm sobre *E. coli*, y en *Candida albicans* un halo de inhibición menor de 11.8 mm.

Roldán L. et al., en Colombia del 2010 (9) presentan en su investigación datos semejantes a los obtenidos, ya que confirma que el aceite esencial de esta planta posee efecto antibacteriano con una concentración mínima inhibitoria de 5 mg/ml sobre *Escherichia coli*, y 40 mg/ml sobre *Salmonella enteritidis* y *salmonela typhimuriumos*, por otro lado revelaron la presencia de 16 a 28 compuestos químicos en el aceite, correspondiendo principalmente a monoterpenos fenólicos, oxigenados e hidrocarburos.

Dentro de las investigaciones que obtuvieron resultados opuestos las de este estudio, tenemos al realizado por Beaño en el 2014, (35) la *Mentha spicata* a una concentración de 10 mg/ml no tiene actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* frente al control positivo utilizado en este caso azitromicina 30 ug.

Ismaili R. et al., 2014 (4) alcanzaron valores superiores en cuanto a los halos de inhibición frente a *Escherichia coli*, siendo 22.50 mm el de la *Mentha spicata*, 18 mm el de *Thymus vulgaris* y 20 mm el de *Citrus limonum*, probablemente estos halos correspondan a que la planta utilizada en este trabajo fue a concentraciones de 100%.

Otros autores, no solo demostraron el efecto de la planta contra *E. coli* sino ampliaron sus investigaciones usando otros microorganismos, como es el caso de Shahbazi Y., en el 2015 (5) demostró que la *Mentha spicata* formó halos de inhibición contra el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, y *Salmonella typhimurium*, confirmando que el aceite esencial presenta un nivel moderado de actividad antibacteriana contra todos los microorganismos de prueba.

Moosavy M. et al., en Irán en el 2013 (8) evaluaron la eficacia antimicrobiana de nisina y el aceite esencial de *Mentha spicata* contra *Escherichia coli*, encontrando actividad antibacteriana en la planta con un halo de inhibición de 40 µl / ml a concentraciones de 10 y 20 µl / ml.

Estas diferencias se pueden justificar a que en los últimos estudios mencionados la obtención de la planta estuvo sujeta a factores como variedad de la especie, medio ecológico y zonas geográficas oriundas de crecimiento, lo que sustenta el rendimiento y los valores de halo de inhibición discordantes a los alcanzados en esta investigación, puesto que la obtención de la planta en este estudio, fue a través del Vivero de la municipalidad de Trujillo cultivadas en invernadero, no cumpliendo totalmente los requisitos para una buena recolección de muestra; como ser cosechadas en lugares húmedos y fríos, en meses de verano y en suelos arcillosos, fértiles, levemente ácidos y adecuadamente drenados. (23,24,25)

Aun así, el aceite esencial de *Mentha spicata* como el norfloxacino presentan actividad antimicrobiana, encontrándose diferencia entre las concentraciones del aceite esencial de *Mentha spicata* y el fármaco.

V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de *Mentha spicata* posee menor efecto antibacteriano que el norfloxacino sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.
2. El aceite esencial de *Mentha spicata* a una concentración del 75% tiene efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* con un halo de inhibición promedio de 8.9 mm.
3. El norfloxacino tiene efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 con un halo de inhibición promedio de 25.3 mm.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de investigación aplicándose las condiciones estrictas de obtención de la planta.
2. Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* a mayores concentraciones.
3. Realizar estudios sobre el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* frente a otros fármacos y a otros agentes patógenos frecuentes en nuestro medio.

VII. REFERENCIAS:

1. Brooks G. Carrol K. Buyel J. Morse S. Migtzner T., Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25° edición. Estados Unidos: McGraw-Hill-Lange; 2011. ISBN: 978-607-1513-70-0
2. Ficha técnica Norfloxacino. Ministerio de sanidad, política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Número de autorización de comercialización 56.901, 2009; 1-10.(Citado 4 de Mayo del 2018) Disponible en: <http://www.invent-farma.es/downloads/Norfloxacino.pdf>
3. Qadir M, Shahzadi S, Bashir A, Munir A, Shahzad S. Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs. International Journal of Analytical Chemistry. 2017; 17(33). ISSN 3475-738 . (Citado 24 de Abril del 2018) Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2017/3475738/>
4. Ismaili R, Lamiri A, Moustaid k. Study of Antibacterial Activity of Essential Oils of Three Aromatic and Medicinal Plants. International Journal of Engineering Research & Technology. 2014; 3 (8). (Citado de 24 Abril del 2018) ISSN 2278- 018 Disponible en: <http://www.ijert.org/view-pdf/10966/study-of-antibacterial-activity-of-essential-oils-of-three-aromatic-and-medicinal-plants>
5. Shahbazi Y. Activity of Mentha spicata Essential Oil against Common Food-Borne Pathogenic Bacteria. Journal of Pathogens. 2015; (5):1-5 (Citado -1de 24 Abril del 2018) ISSN 2076-0817 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26351584>
6. Zaidi S, Dahiya P. In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from Mentha spicata and Mentha piperita. International Food Research Journal. 2015; (6):1-4. (Citado de 24 Abril del 2018) ISSN 2231-7546 Disponible en: [http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20\(06\)%202015/\(37\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20(06)%202015/(37).pdf)
7. Bensabah F, Houda S, Souad A, Abdeslam L, Jamal N. Chemical Composition And Antibacterial Activity of Essential Oils of Two Aromatic Plants: Mentha Spicata and Lippia Citriodora Irrigated by Urban Wastewater. International Journal of Engineering

Research & Technology. 2013; (12):1-5. (Citado de 24 Abril del 2018) ISSN: 2278-0181 Disponible en:

<http://scholar.um5.ac.ma/lapse/publications/chemical-composition-and-antibacterial-activity-essential-oils-two-aromatic>

8. Moosavy M, Shavisi N. Determination of Antimicrobial Effects of Nisin and Mentha spicata Essential Oil against Escherichia coli O157:H7 Under Various Conditions (pH, Temperature and NaCl Concentration). Department of Food Hygiene and Aquatic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, 2013; (2): 1-4 ISSN 2383-2886 (Citado de 24 Abril del 2018) Disponible en:
<http://journals.tbzmed.ac.ir/PHARM/Manuscript/PHARM-19-61.pdf>
9. Roldán L, Díaz G, Durringer J., Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. Revista Colombiana Ciencia Pecuaria, 2010, 23 (4): 1-5. (Citado de 24 Abril del 2018) ISSN 0120-0690. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902010000400006
10. Maravi G. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: Menta piperita, . Origanum vulgare y Cymbopogon citratus sobre Streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Cándida albicans ATCC 90028. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener, 2012. (Citado de 24 Abril del 2018). Disponible en:
<http://www.cop.org.pe/bib/tesis/GISELLA%20GIOVANNA%20MARAVI%20INGA.pdf>
11. Golestan L, Seyedyousefi L, Kaboosi H, Safari H. Effect of Mentha spicata L. and Mentha aquatica L. essential oils on the microbiological properties of fermented dairy product, kashk. International Journal of Food Science and Technology 2016, 51, 581–587. (Citado de 24 Abril del 2018) ISSN, 0950-5423. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.13014/abstract>
12. Cortés G., Ochoa C., Navarro A., Ávila R. Compuestos antimicrobianos de origen natural contra mohos de interés en los alimentos: Estado del arte. Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. México, 2015, 1(1): 1-8. (Citado 25 de Mayo del 2018) ISSN-2444-4936. Disponible en:

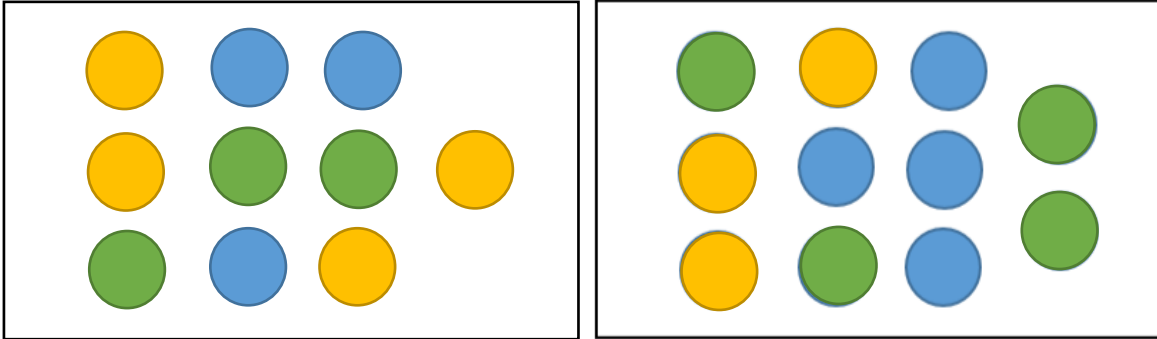
http://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales/vol1num1/Revista-Ciencias-Ambientales-8-22.pdf

13. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo. Anales de la Facultad de Medicina, Ecuador, 2016; 77(4): 2-5 (Citado de 18 Mayo del 2018). ISSN: 1025-5583 Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/379/37949317002.pdf>
14. Stashenko E. Aceites Esenciales, 1° edición. Colombia: Universidad Industrial de Santander; 2009. (Citado de 18 Mayo del 2018). ISBN: 978-958-44-5944-2. Disponible en: cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf.
15. Du Plooy, W., Regnier T, Combtinck S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. Postharvest Biology and Technology. Amsterdam, 2009, 1-6. (Citado 26 de Mayo del 2018) ISSN : 0925-5214 Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093231908>
16. Zuni J. Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). [Tesis para optar el título profesional de: Licenciado en biología]. Puno: Universidad del Altiplano, 2017. (Citado de 24 Abril del 2018). Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4194/Zuni_Mamani_Jhonny.pdf?sequence=1
17. Snoussi M., Noumi E., Trabelsi N., Flamini G., Papetti A., De Feo V. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, Suezia, 2015, (20): 1-10. (Citado de 18 Mayo del 2018) ISSN 1420-3049. Disponible en: <file:///D:/ACER/Escritorio/molecules-20-14402.pdf>
18. Ryan K. Ray. Sherris J. Ahmad N. Drew W. Plorde J., Sherris. *Microbiología Médica*. 5° edición. Estados Unidos: McGraw-Hill-Lange; 2011. ISBN 978-607-15-0554-5
19. Southwick S.F, *Enfermedades infecciosas*, 2° edición. México D.F.: McGraw-Hill-Lange; 2009. ISBN 13: 978-970-10-7023-9
20. Murray P. Rorenthal K. Pfaller M., *Microbiología médica*. 7ª edición. España: Elsevier-Saunders; 2014. ISBN 0-323-03303-2

21. Centro de atención farmacéutica. DIGEMID. Norfloxacin. Dirección general de medicamentos, insumos y drogas. MINSA, 2017. (Citado de 24 Abril del 2018)
Disponible en:
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Norfloxacin.pdf>
22. Ficha técnica aprobada. Características generales del norfloxacin, Perú, 2011. (Citado 19 de Noviembre del 2018) Disponible en:
<https://zonasegura.seace.gob.pe/documentos/documentos/FichaSubInv/1008999719rad0A54F.pdf>
23. Ávalos G, Pérez C. Serie Fisiología Vegetal. Reduca Biología, Madrid, 2009, 2(3): 119-145. (Citado 18 de Mayo del 2018) ISSN: 1989-3620. Disponible en:
http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
24. Lansdown, R. *Mentha spicata*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2014: 2-9. ISSN 2307-8235. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/164464/0>
25. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Hierbabuena - *Mentha spicata* L. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. México, 2009. ISBN: 9682973236 (Citado 4 de Mayo del 2018) Disponible en:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
26. World Health Organization. Monographs on Selected Medicinal Plants, Actualización 2015 (2): 199-205. Disponible en:
<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4927e/s4927e.pdf>
27. Tiwari, B., Valdramidis, V., O'Donnell, C., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(14): 2-8. (Citado 25 de Mayo del 2018) ISSN 0021-8561. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf900668n>
28. Muñoz E., Rivas K., Loarca G., Mendoza S., Reynoso R., Ramos M. Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. México, 2012, 3(3): 2-6. (Citado 25 de Mayo del 2018) ISSN 2007-0934. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000300006

29. Rojas J., Solís H., Palacios O. Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales. Anales de la Facultad de Medicina, Lima, 2010, 71 (3): 2-6. (Citado 25 de Mayo del 2018) ISSN 1025-5583. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832010000300004
30. Gutierrez D., López I., Morales P., Ramírez M. Comparación del efecto inhibitorio de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato y Mentha spicata sobre Enterobacter cloacae. Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina, España, 2017, 1: 1. (Citado 25 de Mayo del 2018) ISSN:2448-8380. Disponible en:
<file:///D:/ACER/Documents/82-176-1-SM.pdf>
31. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Supplement M02- A12 USA, 2015. (Citado de 24 Abril del 2018) ISBN 1-56238-835-5. Disponible en:
https://clsi.org/media/1925/m02ed13_sample.pdf
32. Mueller – Hinton Caldo. Laboratorios Britania S.A., Argentina, 2015. (Citado 4 de Mayo del 2018) Disponible en:
http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a284420749cd.pdf
33. Bernal M, Guzmán M. El antibiograma de discos. Técnica de kirby-bauer. Bogota. Instituto nacional de salud. 2012. (Citado de 10 de Noviembre del 2018) ISSN: 0120-4157. Disponible en:
<https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1891/1917>
34. Ministerio de salud pública y bienestar social. Documento técnico de gestión. Manual de bioseguridad. Lima, 2012. (Citado de 18 Mayo del 2018) Disponible en:
<http://www.hnseb.gob.pe/epi/descargas/2012/manuales/bioseguridad.pdf>
35. Beño C. Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanolicos de Aloysia triphylla, Rosmarinus officinalis, Mentha spicata y Portulaca oleracea. [Tesis para optar el título de: Biólogo - Microbiólogo]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, 2014. (Citado de 15 Noviembre del 2018). Disponible en:
<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4801/Rea%C3%B1o%20Ortega%2c%20Cinthia%20Karina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXO 1



7 Placas de *Mentha spicata*



7 Placas de norfloxacino



7 Placas de agua destilada



ANEXO 2

Ficha de recolección de halos de inhibición del aceite esencial

HALOS DE INHIBICIÓN (mm) DEL ACEITE ESENCIAL DE *MENTHA SPICATA*
FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922

Zona de inhibición (mm)			
N°	Aceite esencial de <i>Mentha spicata</i>	Norfloxacino	Control (Agua destilada)
	75%		
1	10	26	0
2	8	25	0
3	8	25	0
4	9	24	0
5	7	25	0
6	10	25	0
7	10	26	0
8	7	27	0
9	10	25	0
10	10	25	0

ANEXO 3

PROCEDIMIENTO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS (31)

1. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Mentha spicata* “Hierba buena”, en una cantidad de 10 Kg se llevaron al laboratorio clínico San José de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).

2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Mentha spicata* se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

- a) Preparación del inóculo: El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Escherichia coli*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aprox.)
- b) Siembra del microorganismo: Se sembró el microorganismo *Escherichia coli*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.
- c) Preparación de las concentraciones del aceite esencial: A partir del AE, se prepararon 2 concentraciones (100%, 75%) utilizando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para ello, se rotularon 2 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 2 concentraciones y se colocó 750 μ L de AE y 250 μ L de DMSO al tubo de 75%.
- d) Preparación de los discos de sensibilidad con aceite esencial: A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 μ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 μ L de AE al 75% en otro disco y 10 μ L de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.
- e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano: Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Escherichia coli*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Norfloxacin (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

- f) Lectura e interpretación: La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Mentha spicata* y para el Norfloxacino. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.