



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

### ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MENTH ESSENTIAL OIL (*Mentha piperita* L.) IN VITRO FRONT *Escherichia coli* ENTEROPATHOGEN (EPEC)

Jhonny Zuni Mamani<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional del Altiplano, Escuela Profesional de Biología, Av. Sesquicentenario N° 1154, Ciudad Universitaria, Puno Perú, [Jhoel\\_franco\\_20@hotmail.com](mailto:Jhoel_franco_20@hotmail.com)

#### 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, 5%. Para la comparación inhibitoria se empleó el método de difusión en placa a concentraciones de 5µl, 10µl, 15µl, 20µl, 25µl, y 30µl de aceite esencial, teniendo como control positivo el antibiótico Tetraciclina (30µg). 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 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 concentraciones se obtuvo diferencia estadística altamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

**Palabras clave:** Aceite esencial, actividad antibacteriana, *Escherichia coli* (EPEC), Menta

#### ABSTRACT

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 of August to December of 2016, whose objectives were to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oil and to 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 the plate dilution method at doses of 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2.5, 5%. For the inhibitory comparison, the plate diffusion method was used at concentrations of 5µl, 10µl, 15µl, 20µl, 25µl, and 30µl of essential oil, with the antibiotic Tetracycline (30µg) as positive control. Descriptive statistics, analysis of variance and Tukey's multiple rank test were applied. The minimum inhibitory concentration (MIC) of mint essential oil (*Mentha piperita* L.) versus EPEC, "in vitro" was 2.5%. It was further determined that the effect of the percentage 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, where For the source of variation of concentrations was obtained statistically significant difference ( $p < 0.0001$ ).

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

\*Corresponding autor: [Jhoel\\_franco\\_20@hotmail.com](mailto:Jhoel_franco_20@hotmail.com)





## 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 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). 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, (Pastor, 1991).

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).

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.

Evaluaron la actividad antibacteriana en los extractos de agua de hoja y aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, los resultados presentaron actividad antibacteriana sobre las especies estudiadas, Inhibiendo con una zona de 12.00 mm y 9.00 mm de aceite esencial y el extracto acuoso (Hayyan, 2014). Así mismo En la Investigación, determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mentha piperita*, frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, y la levadura *Candida albicans*. En la investigación los microorganismos evaluados resultaron ser susceptibles, excepto para *Pseudomonas aeruginosa* MU 187 (Ceylan *et al.*, 2014).

Se estudió la actividad antibacteriana del jugo y aceite esencial de menta (*Mentha piperita*), frente a 100 aislamientos de 11 diferentes especies de bacilos, *E. 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), por otro lado 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, reportaron que la decocción de las hojas posee un efecto vermífugo. (De la Paz *et al.*, 2006).

En la investigación evaluaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia tripilla* sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Listeria monocitogenes* y





*Pseudomonas aeruginosa*. En la investigación los microorganismos evaluados resultaron ser susceptibles excepto para *Salmonella sp* y *Pseudomonas aeruginosa*, al aceite esencial *Escherichia coli* fue inhibida con una zona de 13.00 mm a una concentración de 30 µl/ml (Sánchez *et al.*, 2002).

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);

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 (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, 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. (Fisher & Phillips 2008). Reportan que la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas puede estar relacionada con la membrana externa que posee este tipo de bacterias, ya que la hidrofobicidad de la membrana la hace impermeable (Smith-Palmer *et al.*, 1998, Kalemba & Kunicka 2003 & Fisher & Phillips, 2008), Sin embargo, 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. (Fisher & Phillips, 2008),

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 y Phillips, 2008; Solórzano - Santos & Miranda – Novales, 2011). 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. Por lo considerado se plantearon los siguientes objetivos. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de menta frente a *E. coli* enteropatógena (EPEC) y comparar el efecto inhibitorio respecto a la Tetraciclina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

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 menta (*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. 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.





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). La muestra biológica estuvo constituida por la cepa de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que fue proporcionado por el Instituto Nacional de Salud Lima (INS). Planta de Menta en buen estado de desarrollo, sin signos de enfermedades y daño físico. Material vegetal que se encuentre en mal estado decrecimiento o desarrollo y que presente signos visibles de daño.

#### *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).

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.

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

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). Se separaron manualmente las hojas de los tallos de la planta, y se cargó en un hidroddestilador, de manera que forme un lecho fijo compacto colocándose en total 2500g 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, atrápanola 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 terminó 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.

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 Jayllhuaya (Puno), así mismo se usaron discos de sensibilidad para antibiograma TET 30 µg Tetraciclina (marca LyD Insumed, lote TET1618, vence diciembre 2018). Se usaron los siguientes: Matraz, tubos de ensayo, probetas, frascos ámbar con tapa estéril, pipeta y placas Petri de vidrio pírex.





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

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*

El inóculo bacteriano debe contener una cantidad normatizada de unidades formadoras de colonias (UFC), para minimizar la variación de la población bacteriana, esta cantidad es de  $1 \times 10^8$  UFC/ml la que se determina mediante el estándar de Mc Farland (INS, 2002). 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  $B_2$  a 99,5 ml de  $H_2S_4$ . 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*

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). Según especificación para su respectiva hidratación, se preparó 3.4g 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 se inoculo con la suspensión de  $1 \times 10^8$  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, 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.

### *Método de difusión con discos*

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). Se sumergieron los discos de papel filtro con diferentes volúmenes de aceite esencial sin diluir 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 25  $\mu$ l y 30  $\mu$ l, el mismo que es equivalente a (30  $\mu$ 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  $1 \times 10^8$  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  $\mu$ l respectivamente del aceite esencial de menta, como control positivo se utilizaron discos de tetraciclina (30  $\mu$ g). Posteriormente se incubó las placas en posición invertida a 37°C durante 24 a 48 horas, para su posterior lectura e interpretación.

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.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

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

	Dosis de aceite esencial (%)	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena					(CMI)
		R1	R2	R3	R4	R5	
	0.01	+	+	+	+	+	
	0.05	+	+	+	+	+	
	0.1	+	+	+	+	+	
	0.2	+	+	+	+	+	
	0.4	+	+	+	+	+	
	0.5	+	+	+	+	+	
	1	+	+	+	+	+	
	2.5	-	-	-	-	-	2.5%
	5	-	-	-	-	-	
Muestra los resultados del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	10	-	-	-	-	-	resultados del <i>Escherichia coli</i> (EPEC) frente a las
	20	-	-	-	-	-	
	30	-	-	-	-	-	

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 1).

**Tabla 2.** 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 2).

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

**Tabla 3.** 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
Concen tración	6	17794.800	2965.800	101.114	< 0.0001**
Error	42	1231.912	29.331		
Total	48	19026.712			

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 3).

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 4.** 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 µl con 54.20%; el tercer grupo está formado por las concentraciones de 25 hasta 15 µl con un efecto intermedio y similar entre sí; mientras que el menor efecto inhibitorio se determinó para 5 µl de aceite esencial de menta con 39.54% de inhibición (Tabla 4). Smith-Palmer *et al.*, 1998; Kalemba y Kunica 2003; Holley y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008; Solorsano-Santos y 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) y Holley y 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 positivos 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 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.

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*, *Pseudomonas 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 tripillia* (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.

## 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 µl 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 µg. Existe efecto antibacteriano del aceite esencial de menta en cepa de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), a un ( $p < 0.0001$ ), y un  $p = 0.05$ , siendo esto estadística altamente significativa.

## LITERATURA CITADA

- 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.
- 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.
- Castro V. (2005). Inhibición del Crecimiento *in Vitro* de *Streptococcus mutans* por Papaína Sanitrend (Tesis de Pregrado) Santiago, Chile: Universidad de Chile.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- Hayyan, I, Al-Taweil, (2014). Antimicrobial Effect of Mint Essential Oils on Some Pathogenic Bacteria. Vol. 2, pp: 90-93.
- 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.
- 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.
- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10 (10): 813-829 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.
- Pastor G. (1991). Estudio Morfohistológico y Microhistoquímico de *Desmodium. Vargas sanumsch* (Tesis de Pregrado). Trujillo, Perú: Universidad Nacional del Centro Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Picazo, Juan J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 54 pp.
- Sabahat S. Naim A, Taiiq P., (2006). Actividad Antibacteriana *in vitro* de la Menta. Pak. J. Bot, 38(3). 869-872, 2006 Pakistán.
- 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*.





- 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.
- 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.
- 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.

