



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE
ESENCIAL DE HOJAS DE *Mentha Spicata* (MENTA)
FRENTE A *Staphylococcus aureus***

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORA

Bach. ZELADA BECERRA, JESSICA JANETH

ASESOR

Mgtr. LEAL VERA, CÉSAR ALFREDO

TRUJILLO – PERÚ

2019

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

Presidente

Mgtr. Nilda María Arteaga Revilla

Miembro

Mgtr. Luisa Olivia Amaya Lau

Miembro

Mgtr. César Alfredo Leal Vera

Docente Tutor Investigador

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso:

Por tu amor y tu bondad que no tienen fin, que me permites sonreír ante todos mis logros que son resultados de tu ayuda y que me has ayudado mejorar como ser humano, y crecer de diversas maneras.

A mis padres:

Por confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio; gracias por cada consejo y por cada una de tus palabras que me guiaron durante mi vida.

A la Universidad ULADECH quien nos abrió sus puertas para ser mejores personas y formarnos como profesionales.

A mis amigas

Janet y Judith por el apoyo incondicional que me brindaron.

DEDICATORIA

A mis Padres que me apoyaron en toda mi carrera profesional de manera incondicional, y todo el tiempo que estuvieron ahí para brindarme su apoyo.

A mis maestros:

Quienes nunca desistieron al enseñarme, y brindarme sus conocimientos para mejorar personalmente y profesionalmente gracias por su paciencia.

A mis tíos:

Quienes me brindaron todo el apoyo incondicional para culminar con éxito esta etapa

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, de tipo experimental, nivel explicativo y enfoque cuantitativo; se realizó con el objetivo de demostrar el efecto antibacteriano in vitro que posee el aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Se trabajó con 28 placas con cultivos de la cepas divididas en 4 grupos: grupo control negativo (dimetilsulfóxido al 10%), grupo estándar farmacológico (Ciprofloxacino 5µg/disco) y 2 grupos experimentales a concentraciones de 45% y 75% de A.E. de hojas de *M. spicata*. El volumen que se administró fue de 25 µl de aceite esencial. El efecto antibacteriano se evaluó mediante el método de Kirby Bauer. Las medidas de los halos de inhibición para el aceite esencial al 45% fue 17.06 ± 0.25 mm; al 75% fue de 23.90 ± 0.31 mm; para el control estándar (ciprofloxacino) fue de 22.06 ± 0.39 mm, diferenciándose entre ellos significativamente según la prueba ANOVA ($P < 0.05$). Según la prueba de T-Student al comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *M. spicata* al 45% con Ciprofloxacino si presentó diferencia significativa; en tanto que el efecto antibacteriano del aceite esencial al 75% comparado con Ciprofloxacino no difiere significativamente. Se concluye que el aceite esencial de las hojas de *Mentha spicata* si tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Presentando el aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* al 75% similar efecto que ciprofloxacino.

Palabras clave: Efecto antibacteriano. Halos de inhibición. *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The present work of investigation, of experimental type, explanatory level and quantitative approach; was carried out with the aim of demonstrating the in vitro antibacterial effect of the essential oil of *Mentha spicata* leaves (Menta) against strains of *Staphylococcus aureus*. We worked with 28 plates with cultures of the strains divided into 4 groups: negative control group (10% dimethylsulfoxide), standard pharmacological group (Ciprofloxacin 5µg / disc) and 2 experimental groups at concentrations of 45% and 75% of A.E. of leaves of *M. spicata*. The volume that was administered was 25 µl of essential oil. The antibacterial effect was evaluated by the Kirby Bauer method. The measurements of the inhibition zones for the 45% essential oil was 17.06 ± 0.25 mm; at 75% it was 23.90 ± 0.31 mm; for the standard control (ciprofloxacin) was 22.06 ± 0.39 mm, differing significantly from each other according to the ANOVA test ($P < 0.05$). According to the T-Student test when comparing the antibacterial effect of the essential oil of leaves of *M. spicata* to 45% with Ciprofloxacin if it presented a significant difference; while the antibacterial effect of 75% essential oil compared to Ciprofloxacin does not differ significantly. It is concluded that the essential oil from the leaves of *Mentha spicata* has an antibacterial effect in vitro against strains of *Staphylococcus aureus*. Presenting the essential oil of leaves of *Mentha spicata* 75% similar effect that ciprofloxacin.

Keywords: Antibacterial effect. Halos of inhibition. *Staphylococcus aureus*

Índice

AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I.INTRODUCCIÓN	1
II.REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1.Antecedentes	7
2.1.Bases Teóricas	10
III.HIPÓTESIS	22
IV.METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	23
4.1.Diseño de la Investigación	23
4.2. Población y Muestra	26
4.3.Definición y operacionalización de las variables	27
4.4.Técnicas e Instrumentos	28
4.5.Plan de Análisis	33
4.6.Matriz de Consistencia	34
4.7.Principios Éticos	35
V.RESULTADOS	36
5.1.Análisis de Resultados	38
VI.CONCLUSIONES	42
ASPECTOS COMPLEMENTARIOS	43
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01: Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta) a concentraciones de 45% y 75 % frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Tabla 02: Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta) a concentración de 45%, 75% y ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	37

I. INTRODUCCIÓN

La naturaleza a través de las plantas brinda diversos beneficios, con ellas se ha podido curar muchas enfermedades de las que sufre el hombre; por ello podemos concluir que la medicina alternativa siempre ha estado presente desde muchos siglos atrás. Estas majestuosas plantas tienen esencias curativas que pueden reducir los efectos secundarios e incrementar la efectividad de muchos tratamientos; por ello los estudios científicos de estas magníficas plantas han abierto nuevas expectativas en el sector farmacéutico y la cosmética ⁽¹⁾.

La etnobotánica es la disciplina que investiga el aprovechamiento de las plantas por parte de los habitantes, constituyendo una herramienta importante en la búsqueda de estrategias que conlleven a un manejo sustentable de los recursos naturales y la necesidad de encontrar alternativas a los problemas de salud local y no perder el conocimiento tradicional de las plantas ⁽²⁾.

Existen alrededor de 250 000 clases de plantas medicinales, de las que sólo conocemos en parte el 10%, lo que explica lo mucho que nos falta por investigar y obtener futuros medicamentos con gran potencial. Se considera al Perú como el país con mayor variedad biológica y con diferentes ecosistemas. Sin embargo, su inclusión en la actividad comercial mundial de los productos naturales es de 0.02%. En nuestro país se utilizan 1400 especies con propiedades medicinales de uso

popular, no obstante un pequeño porcentaje de éstas y sus derivados se transan comercialmente en el sector nacional e internacional ⁽³⁾.

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia Gram positiva es la principal causa de la infecciones del sistema circulatorio, intoxicaciones ocasionadas por alimentos, infecciones de piel, tejido blando y del tracto genitourinario. En la década de los 80, se ha incrementado el número de bacteriemias producidas por este patógeno, tanto adquiridas en la comunidad como hospitalarias; esta patogenia surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped ^(4, 5).

Staphylococcus aureus es un patógenos que mayormente causa las infecciones intrahospitalarias y en la sociedad, que pueden ser infecciones agudas como foliculitis, forunculitis o graves que involucran a los órganos internos como el corazón, los pulmones, etc., siendo la población más afectada los grupos vulnerables ⁽⁶⁾.

Unos de los problemas de las comunidades son las afecciones en relación con las infecciones, pero esta situación ha ido mejorando con la elaboración de los antibacterianos. Estos han colaborado salvaguardando la salud y han contribuido con la medicina y las intervenciones quirúrgicas aumentando las probabilidades de supervivencia frente a esta patología. No obstante, desde hace pocos años, una

amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se podría definir como la capacidad de un microbio para soportar los efectos de los antibacterianos destinados a inhibirlos ⁽⁷⁾.

La penicilina fue uno de los primeros tratamientos que erradicó las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. No obstante en 1946 en Inglaterra se realizó la primera separación del estafilococos donde se presentó un 60% de resistencia a la penicilina, luego se incluyó una nueva droga denominada meticilina, después de un año se detectó la primera cepa de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente (SAMR); luego de tres años se manifestó el primer brote intrahospitalario causado por SAMR; desde ese caso se han notificado que este patógeno es meticilinoresistentes en todo el mundo ⁽⁸⁾.

Una de las alternativas para aliviar muchas enfermedades es la aplicación de plantas medicinales una de ellas puede ser *Mentha Spicata* o conocida comúnmente como Menta, que fue exportada al Perú por los conquistadores españoles y su distribución del cultivo es en las tres regiones del país. Químicamente consta de alcoholes, ácidos orgánicos y aceites esenciales. El aceite esencial de las hojas contiene L-carvona (50-70%), L-limoneno(13-20%), falandreno, alfa y beta-pineno(2-5%), d-pineno, acetato de dihidrocarveol y cineol(2-4%) ⁽⁹⁾.

Los aceites esenciales tienen actividad inhibitoria contra algunos organismos, debido a sus diferentes grupos de compuestos químicos. La actividad antimicrobiana

no tiene un mecanismo específico; pero se precisa ciertos lugares de acción en la célula en donde pueden ocurrir los siguientes efectos: daños a la membrana citosol, daño a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y la eliminación de la energía erradicando así a los microorganismos ⁽¹⁰⁾.

Desde muchos años las esencias han sido empleadas por sus propiedades antisépticas. Su acción antiséptica es general y se manifiesta tanto en presencia de sus vapores, como por contacto directo o de forma muy diluida; el poder antiséptico de los aceites esenciales resulta de mucha importancia porque se asocia a una inocuidad respecto a los tejidos sanos, es evidente que las propiedades terapéuticas de los aceites esenciales sería muy útil para prevenir las infecciones causadas por bacteria en el transcurso de la vida del ser humano ⁽¹¹⁾.

Los aceites esenciales tienen una capacidad de inhibición de los agentes que deterioran las células; lo que impiden los procesos de descomposición, a esto se complementa su poder cicatrizante ya que estimulan la regeneración celular y refuerzan las defensas orgánicas previniendo la infección bacteriana; cabe agregar que todos estos beneficios podrían contribuir a la disminución de la tasa de prevalencias y mortalidad de infecciones causada *Staphylococcus aureus* que son adquiridas en mayor porcentaje en los hospitales que en la comunidad ⁽¹¹⁾.

La utilización de los aceites esenciales podría ser útil en la práctica de nebulizaciones (aerosol) en las habitaciones de los enfermos y en los lugares públicos como podría

ser residencias, hospitales o escuelas como acción terapéutica y preventiva, esto podría ayudar disminuir los costos de los tratamientos, tiempo de estancia hospitalaria asociadas a complicaciones por las infecciones y lograr que los pacientes se reintegren a su vida cotidiana ⁽¹¹⁾.

La presente investigación busca aportar nuevos conocimientos sobre la eficacia de la medicina natural en prevención de infecciones producidas por *staphylococcus aureus*, utilizando el aceite esencial de *Mentha spicata* como una alternativa para el complemento de los tratamientos con antibióticos, cicatrizantes y como un antiséptico tópico lo cual disminuiría los riesgos de adquirir una infección intrahospitalaria; por lo tanto se disminuirá los costos del tratamiento y el tiempo de estancia hospitalaria, siendo un gran beneficio para la población peruana principalmente con bajos recursos económicos, Por lo consiguiente planteamos el siguiente enunciado:

¿El aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) tendrá efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*?

Objetivo General:

- Demostrar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) frente a *Staphylococcus aureus*.

Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) en concentraciones de 45% y 75 % frente a *Staphylococcus*.
- Comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) a concentraciones de 45%, 75% y ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Según Snoussi, et al. en el año 2015 Túnez (África), realizó la siguiente investigación sobre las actividades antibacterianas del aceite esencial aislado de las partes aéreas de *Mentha spicata* L. (menta verde). Los principales componentes eran carvona ($40,8\% \pm 1,23\%$) y limoneno ($20,8\% \pm 1,12\%$). Se evaluó por fusión en disco y los ensayos de microdilución. Todos los microorganismos se ven fuertemente afectados, lo que indica un potencial antimicrobiano apreciable del aceite ⁽¹²⁾.

Shahbazi, en el año 2015 (Irán), Se investigó la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* contra bacterias patógenas. Se evaluó mediante el método de microdilución en caldo y el ensayo de difusión en disco de agar. El aceite esencial mostró un nivel moderado de actividad antibacteriana contra todos los microorganismos de prueba. Los resultados del aceite esencial de *M. spicata* (zona de inhibición = 22 mm y MIC y MBC = 2.5 $\mu\text{L} / \text{mL}$). Según nuestros resultados, el aceite esencial de la planta de *M. spicata* tiene el potencial de ser aplicado como agente antibacteriano ⁽¹³⁾.

Según Fitsiou et al., en el año 2016 (Grecia), analizó la composición de las preparaciones volátiles de los aceites esenciales de las plantas griegas *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* y *Fortunella margarita*. Nos indica que principales componentes en las fracciones de aceites esenciales, fueron carvona

(85,4%) en menta verde, chavicol de metilo (74,9%) en la albahaca dulce, transanetol (88,1%) en el anís, y limoneno (93,8%) en kumquat ⁽¹³⁾. Se estudió su efecto antimicrobiano, antioxidante y actividades anti proliferativas; sólo los aceites esenciales de menta verde y la albahaca dulce demostraron citotoxicidad contra las bacterias ⁽¹⁴⁾.

El estudio de Shahbazi, Shavisi, en el año 2016 (Irán), realizaron la evaluación de las interacciones de los aceites esenciales de *Ziziphora clinopodioides* y *Mentha spicata* con quitosano y ciprofloxacino contra patógenos comunes relacionados con los alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*). Los componentes más abundantes del aceite esencial de *M. spicata* fueron la carvona (78.76%), el limoneno (11.50%) y el β -bourbonene (11.23%). Los resultados del presente estudio, el aceite esencial de *Z. clinopodioides* en combinación con el aceite esencial de *M. spicata* y el quitosano podrían considerarse potenciales antimicrobianos fuertes potenciales en los productos alimenticios ⁽¹⁵⁾.

Golestan, Seyedyousefi, Kaboosi, Safari, en el año 2016 (Irán), investigaron sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Mentha spicata* y *Mentha aquatica* (EO) se probó contra *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis* y *Clostridium perfringens* utilizando técnicas de difusión en disco y en agar. Los resultados mostraron que *M. spicata* EO tuvo la actividad de inhibición más alta contra los microorganismos estudiados ⁽¹⁶⁾.

Bayan, Küsek, en el año 2018 (Turquia), investigaron sobre la composición química y la actividad antifúngica y antibacteriana del aceite volátil de *Mentha spicata*. *M. spicata* mostró que el componente principal era carvona (56,94%), seguido de limoneno (11,63%), hidrato de sabino (7,04%) y cariofileno (4,06%). El aceite volátil exhibió una actividad notable contra las cepas bacterianas seleccionadas de *Xanthomonas* spp. ⁽¹⁷⁾.

Karaca, Demirci, en el año 2018 (Boston), se realizó la siguiente investigación sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* y *Mentha spicata* que se utilizan para el tratamiento de la sinusitis. Los principales componentes de los aceites de *L. stoechas* y *M. spicata* se determinaron como alcanfor (46.7%) y carvona (60.6%), respectivamente. Los patógenos seleccionados *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* usando difusión de agar in vitro, microdilución y métodos de difusión de vapor. Como resultado, fueron relativamente suaves antibacterianos (CIM in vitro 310-1250 µg / ml) en acción⁽¹⁸⁾.

Horváth, Koščová, en el año 2018 (Slovakia), Se comprobó los efectos antibacterianos de los aceites esenciales de Especie de *Mentha* con mentol contra diferentes cepas de *S. aureus*. Se utilizaron dos métodos in vitro; el ensayo cualitativo de difusión de disco y la concentración inhibitoria mínima cuantitativos (MIC). Los aceites se disolvieron en DMSO. En base a los resultados determinados

mediante la prueba de difusión en disco de agar, el más alto antibacteriano propiedades se observaron en el aceite de menta verde contra *S. aureus*, donde la zona de inhibición variado en un rango de 35.67 ± 6.81 mm. Las concentraciones más bajas de aceites esenciales que poseía efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *S. aureus* variaron entre 0.125% y 0.25%.⁽¹⁹⁾.

Reaño, en el año 2014 en la Universidad Nacional de Trujillo (Perú); Evaluó la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos de *Aloysia triphylla*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata*, *Portulaca oleracea* y *Taraxacum officinale*, sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*. Se utilizó el método de Kirby Bauer, se colocó 30 uL de la solución del extracto vegetal de cada una de las plantas en estudio a una concentración de 10mg/mL. Los resultados obtenidos se determinó que los extractos a la concentración de 10mg/mL, tuvieron actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ⁽²⁰⁾.

2.1. Bases Teóricas

Fitoterapia

Ciencia que se ocupa del tratamiento y la prevención de enfermedades humanas por medio de las plantas medicinales y los productos herbarios. Se estudia la capacidad de curación de las plantas o drogas vegetales, indicaciones, contraindicaciones, dosis y tratamiento oportuno de administración ⁽²¹⁾.

Plantas medicinales

Son todas las plantas que en uno o más de sus órganos abarcan sustancias que pueden ser empleadas con la finalidad terapéutica o que son precursores para la semi síntesis químico-farmacéutica ⁽²¹⁾.

Droga Vegetal

Es parte de la planta que se utiliza con fines terapéuticos, ya que contiene compuestos químicos capaces de ejercer una acción farmacológica. Por supuesto, esta definición no excluye que la droga puede ser compuesta de toda la planta; representa la parte de la planta (seca o fresca) que contiene el mayor número de principios activo ⁽²¹⁾.

Principio Activo

Toda sustancia o mezcla de sustancias de diferente origen: humano, animal, vegetal, mineral, microbiológico, químico o afines, a la cual contiene actividad farmacológica específica o que, sin poseerla la adquiera al ser administrada al organismo ⁽²¹⁾.

Aceite esencial

Son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por organismos vivos y aislados por medios físicos (presión y destilación) a partir de una planta aromática entera o parte de ella. Estas componentes le brindan el aroma de las plantas y tienen diversas funciones biológicas como ser mensajeros internos, como defensa contra los herbívoros y para la polinización ⁽²²⁾.

Mentha spicata L

Definición

La menta es una hierba perenne, rastrera, con las ramas angulosas, lampiñas o ligeramente pubescentes, hojas opuestas, oblongas, de superficie rugosa y margen aserrado, cortamente peciolada ⁽²³⁾.

Hábitat

Planta nativa del Viejo Mundo y especialmente de la zona mediterránea, ampliamente naturalizada en lugares soleados, requiere suelo medio profundo, húmifero, clima templado entre los 1500 - 2700 m.s.n.m ⁽²³⁾.

Descripción Botánica

Es una planta herbácea y vivaz, con estolones y tallos ramificados, cuadrangulares, pubescentes y erectos, que alcanzan hasta 70 cm de altura. Las hojas tienen la superficie rugosa, de color verde brillante, son sésiles, opuestas, ovado-lanceoladas, con el ápice acuminado y margen desigualmente dentado o aserrado, miden de 4 a 6 cm de largo y de 3 a 5 cm de ancho. Tallos purpúreos. Las inflorescencias tienen la forma de espigas terminales de color blanco-violáceas, cilíndricas y poco densas ⁽²³⁾.

Composición Química

Presenta un aceite esencial que contiene mentol (50-86%), mentona, felandreno y limoneno, carvona (67-80%), cineol, linalol, limoneno (13-20%), óxido de piperitona y óxido de piperitenona, acetato de metilo, pulegona (1,18%), monoterpenos (camfeno, alcanfor, carvacrol, carveol, dihidrocarvona),

sesquiterpenos (cariofileno, copaeno, franeseno), esteroides, azúcares reductores, aminas, flavonoides, leucoantocianidinas, quinonas, taninos, principios amargos.

Hojas: el análisis proximal de 100 g de hoja fresca contiene: agua (83 g), proteína (4,8 g), grasa (0,6 g), carbohidratos (10 g), fibra (2,0), ceniza (1,6 g), calcio (200 mg), fósforo (80 mg), hierro (15,6), caroteno (1620 µg), tiamina (0,05 mg), riboflavina (0,08 mg), niacina (0,4 mg) ⁽²³⁾.

Propiedades Terapéuticas

Las hojas se usan para el tratamiento de enfermedades digestivas (diarrea, dispepsia, flatulencia, gastralgia, náusea, vómito) por sus propiedades tónicas y estimulantes estomacal, carminativa, antiespasmódica, antiparasitaria, antisépticas y antiinflamatorias sobre el sistema respiratorio, antisépticas sobre la piel y mucosas, antidismenorreica, antihipocondríaca y antihistamínica. También es usado en reumatismo y neuralgia ⁽²³⁾.

Toxicidad

La Comunidad Europea el extracto fluido de *Mentha spicata* L. se puede clasificar como no tóxico, ya que tiene una DL50 mayor que 2000 mg/kg . El aceite esencial de la menta puede producir nerviosismo e insomnio y también puede ocasionar dermatitis de contacto ⁽²³⁾.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo, anaerobio, inmóvil, no esporulante, con actividad catalasa y coagulasa, mayormente se dispone en racimos irregulares

semejantes a los de uvas. Es un microorganismo que vive en el medio ambiente y en el ser humano principalmente en la piel y las mucosas⁽²⁴⁾.

Genoma de la bacteria

La medida que puede tener el genoma del *staphylococcus aureus* cambia en relación a la cepa secuenciada que puede ser alrededor de entre 2,742 y 3,043 Mb. La comparación de ambos genomas secuenciados evidencian que el 50% de moléculas proteicas codificadas por el cromosoma de esta bacteria posee un alto parecido con el genoma de la bacteria *Bacillus subtilis*; lo que nos indica que ambas bacterias proceden de un mismo antepasado. El ADN que forman dicho núcleo o Core de esta bacteria contiene alrededor del 75 % del material genético y estos se vinculan con el metabolismo céntrico y diferentes actividades primordiales del *staphylococcus aureus* ⁽²⁵⁾.

La peculiaridad notable del genoma de esta bacteria es la existencia de una gran cantidad de componentes móviles como son los plásmidos, secuencias de inserción y los transposones; además contiene los agentes de virulencia y la resistencia a los diferentes antibióticos. El estudio de los plásmidos nos ha proporcionado aclarar los procesos genéticos bacterianos ⁽⁶⁾.

Etiopatogenia

Los datos estadísticos nos refiere que alrededor del 20 y 50 % de los habitantes son portadores de la bacteria de *staphylococcus aureus* y se encuentra en las fosas nasales y el otro 30% están en modo persistente en la piel y sistema gastrointestinal; en el momento que las barreras de defensivas no están ilesas; el

staphylococcus aureus puede ingresar a los órganos vitales y causar mucho daños irreparables en el ser humano. El contagio puede darse porque los mismos pacientes tienen contacto con sus fosas nasales; el contagio entre pacientes del hospital y también en la comunidad se da mediante la colonización de esta bacteria⁽⁶⁾.

Para una mejor resistencia y colonización en el huésped todo los agentes de virulencia deben poseer un sistema de comunicación entre células; el cual es denominado como quorum sensing (QS); el cual esta mediado por diminutas moléculas proteicas elaboradas por las bacterias nombradas como autoinductoras y también depende de los factores del ambiente que pueden activar una cantidad grande de genes que engloban los agentes de virulencia⁽⁶⁾.

Mecanismos de virulencia

Los Factores de virulencia

Moléculas de adhesión, son proteínas en su superficie que median la adherencia a los tejidos del hospedero y comienzan la colonización, produciendo una infección.

Tenemos:

Tenemos a la proteína de fibronectina (FnbpA y FnbpB), estas moléculas proteicas intervienen en el acoplamiento de la bacteria a la fibronectina y cooperan a la unión del *staphylococcus aureus* a los coágulos que se forman en la sangre y también es los biomateriales; de esta manera la bacteria puede adherirse con mayor firmeza a los trombos en condiciones casi o normales de la circulación sanguínea⁽²⁵⁾.

Consta de una molécula proteica denominada Cna su función es mediar la adherencia bacteriana al colágeno; dicha proteína es codificada por un gen nombrado como gen cna, que se encuentra dentro de una isla de patogenicidad. También se menciona investigaciones que manifiestan que esta molecula proteica Cna es idónea e imprescindible para lograr la unión de este microorganismo al fibrocartilago. Sin embargo el papel que realiza en las infecciones del sistema óseo no ha sido del todo explicado ⁽²⁵⁾.

También se menciona a la proteína A posee la disposición de unirse a la fracción constante de la inmunoglobulina G e impedir que se realice los mecanismo de la opsonización y la fagocitosis. No obstante, S aureus también posee la capacidad de adherirse a superficies de biomateriales y subsecuentemente formar un biofilm ⁽²⁵⁾.

El Biofilm se puede definir como una agrupación sésil originada de bacterias o microorganismos, estandarizadas por unidades celulares que están asociadas al medio en que se desarrollan o entre ellas; están unidas a una base de sustancias proteicas fuera de la célula, y muestran los fenotipos desordenados con relación a su crecimiento, su genética y la elaboración de proteínas ⁽²⁶⁾.

Estos biofilms poseen ADN extracelular (eADN), y se ha establecido que le brinda estabilidad estructural. Diferentes trabajos indican que los biofilms de S. aureus, una vez implantados, se mantienen firmes frente a los tratamientos antimicrobianos y a los mecanismos innatos del hospedero por eliminar al microorganismo. Es por

ello que se consideran los responsables de muchas infecciones recurrentes y resistentes a la respuesta inmune del hospedero ⁽²⁵⁾.

Enzimas extracelulares los *Staphylococcus aureus* son eficaces de elaborar y segregar un conjunto de enzimas que participan en el desarrollo de la infección. Aquellas enzimas son: la enzima catalasa es la que degrada al peróxido de hidrogeno cuidando a la bacteria de ser fagocitada; esta contiene dos formas denominadas coagulasa ligada y como coagulasa libre, ellas transforman el fibrinógeno en fibrina ayudando a la creación de abscesos y shock séptico ⁽²⁵⁾.

La determinación de la coagulasa libre es una prueba que hace único al *staphylococcus aureus*. La enzima hialuronidasa se encarga de hacer la degradación del ácido hialurónico posibilitando la dispersión de la infección y la enzima de penicilinas que también produce la bacteria de *staphylococcus aureus* inactiva a la penicilina destruyendo el anillo β -lactámico ⁽²⁵⁾.

Toxinas citolíticas son las que conforman los poros de β -barril en la membrana celular, produciendo la salida del contenido y finalmente la eliminación de la célula; estas toxinas citolíticas son la α -hemolisina, β -hemolisina, γ -hemolisina, leucocidina y la leucocidina PVL (Panton-ValenØ ne) ⁽²⁶⁾.

EL gen hla es que codifica a la toxina alfa y está se encuentra en el genoma en un alto porcentaje. También tiene la cualidad de construir grandes complejos de molécula proteica denominados poros celulares causando la lisis celular. La hemolisina beta posee actividad esfingomielinasa, mientras que, la hemolisina

gamma alcanza a destruir totalmente los hematíes de los mamíferos y presentan efecto frente a las células fagocíticas como son los neutrófilos y macrófagos .Por último el gen hld es el encargado de codificar a la toxina hemolisina delta se encuentra en un 97 % del cromosoma de las bacterias de *S. aureus* y posee la capacidad de lisar eritrocitos y tiene propiedades surfactante y formadora de poros⁽²⁵⁾.

El *S. aureus* tiene toxinas con actividad superantigénica y son de tres tipos llamadas toxinas pirógenas superantigénica, la presencia de estas son la razón de los síndromes toxigénicos; en segundo lugar tenemos a la toxina TSST-1 que es la causa de la aparición del síndrome del shock tóxico; y finalmente tenemos a las toxinas termoestables denominadas enterotoxinas que toleran la inactivación de las enzimas proteasas ⁽²⁵⁾.

Las toxinas exfoliativas son las responsables en el síndrome de la piel escaldada, su mecanismo se desconoce, pero se menciona que la bacteria las fabrica en el momento que ingresan al flujo sanguíneo y; mediante la difusión desde los capilares llegan a una área granulosa de la epidermis. Estas toxinas que ya se encuentran en la epidermis se fusionan al péptido de la desmoglobina -1 posiblemente actúa como proteasas destruyendo la cohesión intercelular ⁽²⁵⁾.

Inmunidad contra *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* es capaz de actuar en las 3 vías del sistema de complemento que son la clásica, alterna y finalmente la de lectina; por lo tanto se menciona que dicho sistema es ineficiente para eliminar dicha bacteria, siendo necesario la activación de los

neutrófilos; ellos distinguen a los ácidos teicoicos y el peptidoglicano de estas bacterias a través de los receptores tipo Toll-2. Se avisto que esta bacteria produce una transformación en los neutrófilos mientras se unen, modificando la expresión de las moléculas proteicas y originándose un estrés oxidativo para causar una degradación celular permitiendo su supervivencia intracelular ⁽⁶⁾.

Cuando se desarrolla una infección los neutrófilos actúan movilizandoo a los leucocitos al lugar de la infección, también el sistema de complemento tiene un rol muy importante en el sistema inmune innata del ser humano, involucrando todas sus funciones de esta inmunidad en contra del patógeno ⁽⁶⁾.

La bacterias Gram positivas como el *staphylococcus aureus* tienen en la superficie de la pared celular una moléculas proteicas que se encargan de inhibir los mecanismos de defensa del sistema de complemento como es la fagocitosis y la opsonización. La proteína A de la pared celular de la bacteria bloquea a los receptores de las inmunoglobulinas y la identificación del complemento mediante la adaptación en la porción de la Fracción constante de las inmunoglobulinas IgG. Estos factores promueven su supervivencia en el huésped y favorecen a su patogénesis, evitando ser destruido por las células de defensa del sistema inmunológico propio del individuo ⁽⁶⁾.

Infección bacteriana

El término infección es la presencia y proliferación de gérmenes en el cuerpo⁽²⁷⁾. Muchas de estas infecciones son causadas por la bacteria Gram positiva de *S. aureus* que se ocasionan por heridas cutáneas, quirúrgicas que benefician a la

inserción de la bacteria desde la epidermis hasta muchos de los tejidos y órganos principales, produciendo supuraciones y abscesos. Por su amplia variabilidad, puede ocasionar muchas afecciones graves, infecciones agudas de los tegumentos y pueden originar infecciones invasoras muy graves ⁽⁶⁾.

Etapas de la Infección por *Staphylococcus aureus*

Período de incubación: El período de incubación para las infecciones de *S. aureus* en personas es variante. La intoxicación estafilocócica alimentaria por lo general su período de incubación puede variar desde 30 minutos hasta ocho horas ⁽²⁶⁾.

Período de estado: Muchos casos clínicos se hacen evidentes en 4 a 10 días, la colonización asintomática es común y logra producir la enfermedad hasta varios meses posteriormente de la colonización ⁽²⁶⁾.

Período final o terminal: Esta enfermedad es auto limitante y la mayor cantidad de las personas se recuperan en 1 a 3 días, aunque a algunas les lleva más tiempo ⁽²⁶⁾.

Mecanismo de acción de *Mentha spicata* frente *Staphylococcus aureus*

Los aceite esencial tienen importante propiedades antimicrobianas que no atribuyen a un mecanismo específicos; sin embargo existente algunos sitios de acción en la célula en donde puede presentarse efectos como daños en la membrana citoplasmática y por con siguiente muerte celular ⁽²⁸⁾. Estudios realizados han demostrado que el aceite esencial *Mentha spicata* a la concentración de 10mg/mL, tuvieron actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ⁽²⁰⁾.

Los componentes de los aceites esenciales podrían ejercer actividad antibacteriana por interferir a nivel celular especialmente en la membrana causando salida excesiva de los constituyentes celulares ⁽²⁹⁾.

Destruyéndose el sistema de enzimas presentando daño mitocondrial y alteración de respiración bacteriana, cuando se trata de concentraciones bajas de los aceites esenciales; mientras que a altas concentraciones provocarían daños severos de los componentes estructurales de la célula bacteriana, como la pérdida de homeóstasis o inactivando o destruyendo el material genético, dando lugar a la muerte celular ⁽²⁹⁾.

Los terpenos tienen diferentes bioactividades, presentando actividad contra los microorganismos. El mecanismo de acción contra los mismos aún no está totalmente entendido, pero se cree que está relacionado con la rotura de la membrana por los componentes lipofílicos ⁽³⁰⁾.

Estudios nos explican que los componente fitoquímicos de la *Mentha spicata* como es 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 y también nos indican que el mentol presenta un efecto “antiplasmid” (secuencia extracromosómica de ADN que no puede ser compartida entre los patógenos); esta acción permite interrumpir la eficiencia de la célula ⁽³¹⁾.

III.HIPÓTESIS

Ho: El aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) no tiene efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

H1: El aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) tiene efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. Diseño de la Investigación

El trabajo de investigación consta de 4 grupos conformados por 7 placas Petri cada grupo teniendo el siguiente orden un control negativo, control estándar y 2 grupos experimentales con diferentes concentraciones de aceite esencial descritos a continuación:

Control negativo:

Conformado por 07 placas con cultivos de *Staphylococcus aureus* y con 4 discos por placa conteniendo el solvente de dilución del aceite esencial (dimetil sulfóxido - DMSO al 10%), se incubo por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37 °C, transcurrido el tiempo determinado se realizó la lectura de los halos de inhibición

Control estándar farmacológico:

Conformado por 07 placas con cultivos de *Staphylococcus aureus* y con 4 discos del ciprofloxacino de 5ug por placa, se incubo por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37 °C, transcurrido el tiempo determinado se realizó la lectura de los halos de inhibición.

El 90% de *S. aureus* aislados producen las enzimas de betalactamasas que son la causa primordial que las penicilinas pierdan su actividad farmacológica. Si se presenta un gran aumento de población bacteriana rápidamente permite que gran cantidad considerable de antibiótico se inactive ⁽³²⁾. Es por ello que se tiene la necesidad de usar el ciprofloxacino que es un antibiótico sintético de segunda

generación que actúa en la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas⁽³³⁾.

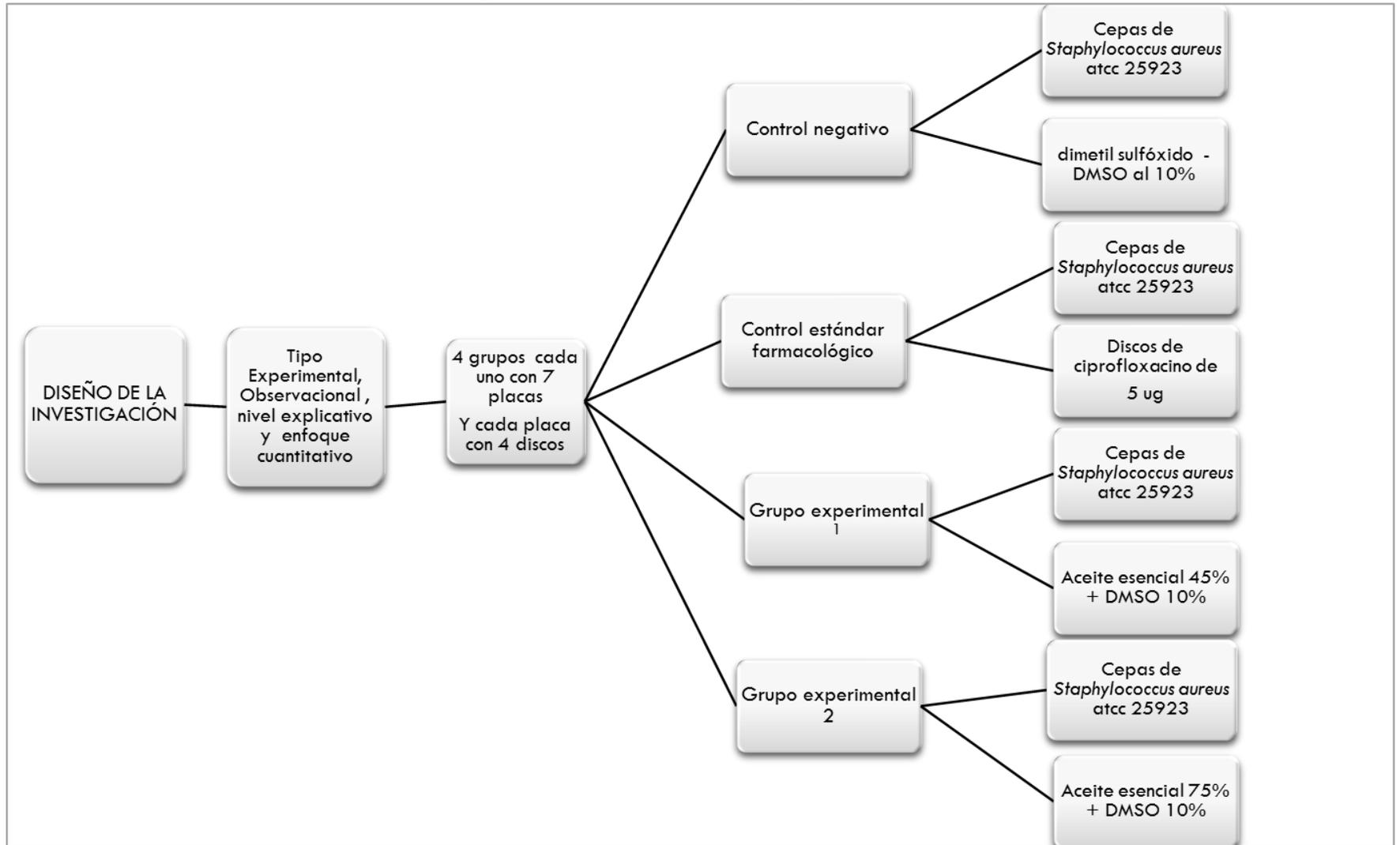
Control experimental N°1:

Conformado por 07 placas con cultivos de *Staphylococcus aureus* y con 4 discos por placa con 25 µl conteniendo el solvente de dilución del aceite esencial de *Mentha spicata* al 45% v/v (dimetil sulfóxido - DMSO al 10% + aceite esencial), se incubo por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37 °C, transcurrido el tiempo determinado se realizó la lectura de los halos de inhibición.

Control experimental N°2:

Conformado por 07 placas con cultivos de *Staphylococcus aureus* y con 4 discos por placa con 25 µl conteniendo el solvente de dilución del aceite esencial de *Mentha spicata* al 75% v/v (dimetil sulfóxido - DMSO al 10% + aceite esencial), se incubo por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37 °C, transcurrido el tiempo determinado se realizó la lectura de los halos de inhibición.

Esquema del diseño de la investigación



4.2. Población y Muestra

Población Microbiológica:

Cepas de bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron obtenidas del laboratorio Microbiologics.

Criterios de inclusión

- ❖ Cepa de bacteriana de *Staphylococcus aureus* viable

Criterios de exclusión

- ❖ Cepa de bacteriana que estén contaminadas

Población vegetal:

Planta de *Mentha spicata* crece en el Distrito de Pacanga provincia de Chepén, Departamento La Libertad situada a una altitud 82 msnm.

Muestra vegetal:

Se recolectaron 4000 g de hoja verde de *Mentha spicata* para la extracción del Aceite esencial.

Criterios de inclusión

- ❖ Se recolectaron hojas verdes de menta del Distrito de Pacanga
- ❖ Las hojas deberán estar en buenas condiciones sin presentar alteración en su estructura morfológica

Criterios de exclusión

- ❖ Las plantas de menta que hayan sido fumigadas con una semana de anterioridad

4.3. Definición y operacionalización de las variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala de Medición
Variable Independiente Aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta).	Conjunto de componentes volátiles de <i>Mentha spicata</i> contenidos en un solvente (DMSO 10%) que un tienen efecto inhibitorio en bacterias ⁽³¹⁾ .	Se utilizó concentraciones	2 Aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> al 45% Aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> 75%	Variable Cualitativa Nominal
Variable Dependiente Efecto antibacteriano del aceite esencial in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	Es la inhibición del crecimiento bacteriano o de cualquier microorganismo; produciendo daño celular a nivel de la pared, membrana celular de los agentes patógenos ⁽³¹⁾ .	Se determinó a través de los halos de inhibición	Diámetro del halo de inhibición mm (milímetros)	Variable Cuantitativa de razón.

Variable independiente:

Aceite esencial. Los aceites esenciales son un conjunto de componentes volátiles con características aromáticas que están conformados por compuestos químicos; que se encuentran presentes en las plantas, los cuales son extraídos por la técnica de destilación; su característica física y químicas son líquidos y liposoluble que son obtenidos como el producto final del metabolismo secundario de las plantas y demuestran tener efecto inhibitorio en las bacterias o microorganismos ⁽³⁴⁾.

Variable dependiente:

Efecto antibacteriano. Es la inhibición del crecimiento bacteriano o de cualquier microorganismo; produciendo daño celular a nivel de la pared, membrana celular de los agentes patógenos ⁽³⁴⁾.

4.4. Técnicas e Instrumentos**Material vegetal y obtención del aceite esencial:**

Mentha spicata (Menta) es cultivada en la costa Liberteña de la provincia de Chepén, Distrito Pacanga. Para obtención del aceite esencial de menta, primero se deshojó, luego se pesó 4000g, seguidamente se lavó. Esto se realizó por hidrodestilación que es una técnica de destilación directa, para lo cual se utilizó las hojas frescas.

Se agregó en el balón de 2000 ml modelo GLASSCO NS 29/32, 500 g de muestra vegetal fresca partida en trozos pequeños, se añadió agua destilada hasta la mitad del balón y se colocó cuerpos de ebullición. Se montó el balón en su manta de calefacción marca ISOLAB, modelo 450W 220 V/ 50 Hz y se sostuvo con unas

pinzas; se colocó cuidadosamente el equipo de Clevenger marca INNOVADORA, se sostuvo con otras pinzas la boca que llevo el refrigerante ⁽³⁵⁾.

Se anexo las mangueras al refrigerante, se conectó la canastilla al reóstato y se comenzó a calentar cuidadosamente hasta la ebullición, hasta precisar un reflujo adecuado. El aceite se fue separando en la bureta de la trampa y se suspendió el reflujo cuando se obtuvo la cantidad suficiente (0.25 ml de aceite), se recogió en un vaso de precipitación pequeño. Este procedimiento se realizó por 8 veces seguidas obteniendo un rendimiento total de 2 ml de aceite esencial y se almacenó en un frasco ámbar a una temperatura de 4°C ⁽³⁵⁾.

Dilución del Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 10%

Se utilizó 500 µl de DMSO y se agregó 4500 µl de agua destilada.

Dilución del aceite esencial de *Mentha spicata* al 45%

Un 1 ml de aceite esencial de *Mentha spicata* es el 100%, para obtener la concentración del aceite esencial al 45% se utilizó 0.45 ml. Se necesitó un volumen total de 700 µl (315 µl de aceite esencial de *Mentha spicata* al 45% + 385 µl de DMSO 10%) para el grupo de experimentación conformado por 7 placas conteniendo 4 discos cada uno. Se administró a cada disco 25 µl (11.25 µl de aceite esencial al 45% + 13.75 µl de DMSO 10%)

Dilución del aceite esencial de *Mentha spicata* al 75%

Un 1 ml de aceite esencial de *Mentha spicata* es el 100%, para obtener la concentración del aceite esencial al 75% se utilizó 0.75 ml. Se necesitó un volumen total de 700 µl (525 µl de aceite esencial de menta spicata al 75% + 175 µl de DMSO

10%) para el grupo de experimentación conformado por 7 placas conteniendo 4 discos cada uno. Se administró a cada disco 25 µl (18.75 µl de aceite esencial al 75% + 6.25 µl de DMSO 10%)

Material bacteriano:

La cepa *Staphylococcus aureus* fueron obtenidas del laboratorio de Microbiologics, se sembró en un medio de cultivo Agar Muller-Hinton (laboratorio de MERK MILLIPORE) y DMSO al 10% más ciprofloxacino ⁽³⁶⁾.

Método de difusión de discos

El método más utilizado en la evaluación de la actividad antimicrobiana es el ensayo Kirby – Bauer. Los discos empleados fueron impregnados del aceite esencial de *Mentha spicata* en diferentes concentraciones para colocarlas en cada placa a una distancia establecida. Al ser sometidos a un grado de incubación de 37°C en 24 h. para *Staphylococcus aureus*, el aceite esencial difundió radialmente desde el disco a través del agar, el cual la concentración disminuyó al extenderse y alejarse desde el punto de disco. Llegó a un punto en que el aceite esencial con actividad antibacteriana no ejercerá dicho efecto frente a la cepa. Se midió el diámetro del área de inhibición alrededor del disco, se pudo clasificar en diferentes categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I o R). ^(34,35) Según especificaciones de la Asociación Argentina de Fitomedicina, frente a Resultados teóricos de la Concentración Mínima Inhibitoria son ⁽³⁶⁾:

POSITIVO	Si el radio del halo es mayor a 9mm (Diámetro mayor a 18 mm)
ACTIVIDAD INTERMEDIA	Si el radio del halo es de 6-9 mm (Diámetro entre 12-18)
NEGATIVO (SIN ACTIVIDAD)	Si el radio del halo es inferior a 6mm (Diámetro inferior a 12 mm)

Se utilizó discos de ciprofloxacino (5 ug) para el control positivo. Para los azoles, la CMI más baja es de ($\geq 50\%$) efecto antibacteriano, reduciendo el crecimiento control después de 24h ⁽³⁷⁾.

Preparación de Nefelómetro: Preparación de la suspensión estándar de turbidez 0,5 de McFarland

Los pasos para la preparación son los siguientes, agregar 0.5ml de una solución de BaCl₂ 0.048M a 99.5mL a una solución de H₂SO₄ 0.18M generando así una suspensión de sulfato de bario; en un tubo de ensayo se distribuyó parte de la suspensión aproximado al volumen del inóculo ⁽³⁶⁾.

Preparación del medio de cultivo:

Para el cultivo de bacterias, el medio adecuado para su crecimiento es el agar Muller-Hinton. La composición del medio de cultivo, Agar Muller-Hinton (Caseína ácida hidrolizada 17.5g/L, Pasta de extracto de corazón 5.0g/L, almidón 1.5g/L, Agar 12.0g/L.). Para la preparación se procedió a pesar 34g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y se ajustara a un pH 7.4.

Luego se dejó embeber de 10 a 15 minutos, se comenzó a calentar con agitación fuerte y constante y se llevó a hervir durante 1 minuto. A continuación, se procedió a esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar hasta que llegó a una temperatura entre 45°-50°C y se procedió a distribuir de 25 a 30 ml en las placas Petri, de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm. ⁽³⁷⁾.

Preparación del inóculo para *Staphylococcus aureus*:

De una placa de cultivo con agar no selectivo e incubada por 18-24horas, con ayuda de un hisopo estéril, se seleccionan colonias aisladas y se prepara una suspensión directa en solución salina. La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0.5 de Mc. Farland. Esta solución tendrá una concentración de 1×10^8 - 5×10^8 UFC/ml. ⁽³⁷⁾.

Siembra de la muestra:

Se utilizó un asa bacteriológica o un hisopo estéril, luego sumergió en la solución preparada para coger *Staphylococcus aureus*. Se colocó el aplicador por encima del nivel del contenido o la muestra del tubo y se giró por las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo ⁽³⁷⁾.

En la superficie de la placa con el medio de cultivo, se sembró el inóculo de manera uniforme. La siembra se realizó en 3 direcciones evitando el exceso. Se dejó la placa tapada entre 5 a 10 minutos para que la superficie del medio se seque ⁽³⁷⁾.

Después del sembrado de la bacteria en estudio, se colocó los discos en la superficie del agar dentro de la placa usando pinzas estériles, se presionó los discos suavemente sobre el medio de cultivo para asegurar la adherencia al medio y el contacto sea

uniforme. En la superficie de la placa se añadió 4 discos en la periferia, con una medida de 2 cm de distancia entre disco y disco, para evitar que el halo de inhibición quede sobrepuesto⁽³⁷⁾.

Incubación:

Se incubaron las placas en posición invertida a 35°C, durante 24 horas. Luego se prosiguió con la medición de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco después del tiempo a los que estén expuestos, en 24 horas⁽³⁷⁾.

Recolección de datos:

Se realizó mediante observación directa de los resultados de la experimentación: Medición de los halos de inhibición formados por la aplicación de los discos embebidos con el aceite esencial a diferentes concentraciones

4.5. Plan de Análisis

Los resultados fueron sometidos a pruebas paramétrica como son ANOVA para variables cuantitativas, a un 95% de confianza ($\alpha \leq 0.05$) y un error del 5% y a la prueba de T-STUDENT. Se utilizó el Paquete estadístico SPSS v 22.1

4.6. Matriz de Consistencia

Título de la investigación	Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Tipo de la investigación y diseño	variables	Definición operacional	Indicadores y escala de medición	Plan de análisis
Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	¿El aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta) tendrá efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ?	<p>Objetivo General:</p> <p>• Demostrar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <p>Determinar el efecto antibacteriano in vitro <i>Mentha spicata</i> (Menta) por medio del método de susceptibilidad Kirby-Bauer frente a <i>Staphylococcus aureus</i> a Las concentraciones del 45% y 75%.</p> <p>Comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas <i>Mentha spicata</i> (Menta) a las concentraciones del 45% y 75% y ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Hipótesis alternativa: El aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta) tiene efecto antibacteriano sobre <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Hipótesis nula: El aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta) no tiene efecto antibacteriano frente <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>TIPO: experimental, Observacional</p> <p>NIVEL: explicativo</p> <p>ENFOQUE cuantitativo.</p>	<p>Variable independiente</p> <p>Aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> (Menta)</p> <p>Variable dependiente</p> <p>Efecto antibacteriano in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Concentración del aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> al 45% y 75%</p> <p>Se determinó mediante el diámetro del halo de inhibición del crecimiento</p>	<p>Dos concentraciones v/v del aceite esencial de hojas de <i>Mentha spicata</i> de 45% y 75% variable cualitativa nominal</p> <p>mm (milímetros) Variable cuantitativa de razón</p>	<p>Prueba estadística ANOVA y T-STUDENT</p>

4.7. Principios Éticos

La presente investigación fue realizada teniendo en cuenta los protocolos de bioseguridad en la manipulación microbiológica. Las cepas de staphylococcus aureus se les acondiciono el medio cultivo , los nutrientes y la temperatura adecuada para su crecimiento , normativizados en el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión reglamentada por el Instituto Nacional de Salud (INS) del Perú.

Se respetó correctamente las normas de bioseguridad dentro y fuera del laboratorio. Conforme lo establecido en los principios que rigen la actividad investigadora de la UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES DE CHIMBOTE, donde nos menciona que las investigaciones se realizaran previa evaluación de los beneficios y los riesgos posibles, tanto para el medio ambiente y las personas responsables en la ejecución del trabajo ⁽³⁸⁾.

V. RESULTADOS

Tabla 01: Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) a concentraciones de 45% y 75 % frente a *Staphylococcus aureus*

GRUPO	Promedio \pm Desviación Estándar del diámetro de halos de inhibición en “mm”	ANOVA Sig. (P)
Dimetilsulfóxido 10 %	6.00 \pm 0.00	
Estándar Farmacológico (Ciprofloxacino 5 μ g)	22.06 \pm 0.39	
Aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> al 45 %	17.06 \pm 0.25	0.000
Aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> al 75 %	23.90 \pm 0.31	

$P=0.000 < 0.05$. Son estadísticamente significativos, se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula.

Fuentes: Paquete Estadístico SPSS 22.0, datos obtenidos en la investigación

Tabla 02: Comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* (Menta) a concentración de 45%, 75% y ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus*

GRUPOS	Significancia (p) *
Aceite esencial <i>Mentha spicata</i> al 45% Vs Ciprofloxacino	0.008
Aceite esencial <i>Mentha spicata</i> al 75% Vs Ciprofloxacino	0.094
Aceite esencial <i>Mentha spicata</i> al 45% Vs 75%	0.000

* P (<0.05); PRUEBA T- STUDENT.

Fuentes: Paquete estadístico SPSS 22.0, datos obtenidos en la investigación

5.1. Análisis de Resultados

El presente estudio de investigación es de tipo experimental “in vitro” fue diseñado para demostrar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* (MENTA) frente a las cepas de *staphylococcus aureus* atcc 25923 utilizando como patrón comparativo los discos de antibióticos de ciprofloxacino de 5 ug/disco. Se realizó las concentraciones de estudio al 45 % y 75 %.

El promedio de los halos de inhibición fueron de 17.06 mm y de 23.90 mm que pertenecen a las concentraciones del 45% y 75% del aceite esencial de las hojas de *Mentha spicata* sobre *staphylococcus aureus*.

En la tabla N 01, se elaboró el Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación de los grupos de trabajo aquí se observó que presenta un valor de significancia de 0.000 demostrando que existe diferencia estadística altamente significativa, entre los Grupos de experimentación en los que se administró el aceites esencial de *Mentha Spicata* (Menta) en las concentraciones del 45% y 75% es decir se Acepta la Hipótesis Alternativa : El aceite esencial de *Mentha Spicata* (Menta) tiene efecto antibacteriano frente a las cepas de *staphylococcus aureus*.

En la tabla N 02, se utilizó la prueba estadística de T – STUDENT, donde se comparó el aceite esencial de las hojas de *Mentha spicata* a concentraciones del 45% y 75 % frente al ciprofloxacino, donde nos indica que en la concentración del 45% del aceite

esencial de *Mentha spicata* presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al ciprofloxacino y al 75% del aceite esencial de *Mentha spicata* no presenta valores estadísticos altamente significativos con respecto al ciprofloxacino , se podría decir que tienen el mismo efecto antibacteriano frente a los *Staphylococcus aureus*.

En las concentraciones del 45% y 75% del aceite esencial de *Mentha spicata* si presentan valores estadísticos altamente significativos lo que indica que el aceite esencial de *Mentha spicata* a la concentración del 75% presentó mayor efecto antibacteriano.

Esta investigación se asemeja a mucho al estudio realizado por Shahbazi, donde nos refieren que el aceite esencial de *Mentha spicata* tiene efecto antibacteriano frente a las bacterias Gram positivas mostrando un halo de inhibición de 22 mm ⁽¹³⁾; con respecto a este de trabajo de investigación se trabajó con concentración de 45% y 75% obteniendo un promedio de halo de inhibición de 17.06 mm y 23.90 mm respectivamente.

Asimismo Fitsiou et al. en el año 2016 realizó un estudio sobre el análisis de los componentes volátiles de la *Mentha spicata* y otras especies, donde nos refiere que el mayor componente es la carvona con un porcentaje del 85.4% brindándole el efecto antimicrobiano frente a las bacterias ⁽¹⁵⁾.

En el estudio realizado por Golestan et al. nos indica que el aceite esencial de *Mentha spicata* y *Mentha aquatica* tiene efecto antibacteriano frente a diversas bacterias Gram positivas como es *staphylococcus aureus* ; al igual que el presente trabajo se utilizó el método de kirby- Bauer y los resultados obtenidos muestran el efecto antibacteriano que tiene el aceite esencial ⁽¹⁷⁾.

Citamos a Reaño donde nos refiere que también evaluó el efecto antibacteriano de *Mentha spicata* frente a *Staphylococcus aureus* utilizando el mismo método de investigación y nos confirma que si presenta efecto antibacteriano frente a esta cepa de *S. aureus* y sus resultados obtenidos fueron analizados por ANOVA y T-STUDENT mostrando significancia ⁽²¹⁾.

Otros estudios como el de Shahbazi, Shavisi, se basaron en identificar que componentes del aceite esencial le confiere el efecto antibacteriano mencionándonos que el más abundante es la carvona (78.76%), el limoneno (11.50%) y el β -bourbonene (11.23%) y posiblemente se debe a estos su efecto antibacteriano ⁽¹⁶⁾.

El mecanismo de acción del efecto antibacteriano que presenta los metabolitos de *Mentha spicata* aún no ha sido claramente determinados pero como se menciona en los estudios anteriores que posiblemente el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* se debe a la carvona que es un monoterpeno, que está relacionado con la rotura de la membrana por los componentes lipofílicos ⁽³¹⁾.

Otros estudios nos explican que los componentes fitoquímicos de la *Mentha spicata* como es 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 y también nos indican que el mentol presenta un efecto “anti-plásmid” esta acción permite interrumpir la eficiencia de la célula⁽³²⁾.

Un aspecto importante del presente estudio, es que en la revisión bibliográfica no se han identificado estudios anteriores relacionados al efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas *Mentha spicata* frente a *Staphylococcus aureus*, contribuyéndose de esta manera a dar como aporte que el aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre dicha bacteria.

VI. CONCLUSIONES

- ❖ El aceite esencial de hojas de *Mentha spicata* a concentración del 45% y 75% presentan efecto antibacteriano frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *M. spicata* al 45% comparado con Ciprofloxacino presenta diferencia significativa; en tanto que el efecto antibacteriano del aceite esencial al 75% con Ciprofloxacino presenta similar efecto.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS

- ❖ Se recomienda utilizar mayor cantidad de hojas de menta para obtener mayor obtención de aceite esencial.
- ❖ Recomienda realizar nuevos estudios comparativos con antibióticos indicados para combatir infecciones producidas por estafilococo aureus.
- ❖ Recomienda realizar la extracción con hoja seca para comparar el rendimiento de la extracción del aceite esencial de *Mentha spicata*
- ❖ Recomienda realizar estudios in vivo preclínico para comprobar si se obtiene resultados similares con el estudio in vitro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mamani B. Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L sobre flora mixta salival [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Odontología. 2013. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3424/1/Mamani_cb.pdf
2. Vílchez G. Estudio etnobotánico de especies medicinales en tres comunidades asháninkas y su tendencia al deterioro. Chanchamayo, Junín. Tesis. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2017. [Citado 20 Enero 2019]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6635/Vilchez_gg.pdf?sequence=1
3. Palacios E, ECONOMIA Y PLANTAS. CSI[Internet] 2002. [13 may 2017]; (52):1-4 Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/Pdf/a04.pdf>
4. Zendeja G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed [Internet]. 2014. [citado 20 May 2017]; 25(3):129-143. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

5. Gil M. Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Rev Chili Infect [Internet]. 2000. [Citado 20 May 2017]; 17 (2): 145-152. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v17n2/art10.pdf>
6. Cervantes E, García R, Salazar P. Características Generales del Staphylococcus aureus. Latinoam Patol Clin Med Lab [Internet]. 2014. [13 May 2017]; 61(1):28-40. Disponible en : <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
7. Ignacio J. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Elsevier [Internet] 2015.[13 may 2017];33(10):692-699.Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-una-S0213005X14003413>
8. Velásquez M, Meza M. Surgimiento y Diseminación Staphylococcus aureus metilicilinoresistente. Salud Pública de México.[Internet]. 2017.[13 de May 2017]; 47(5):381-387.Disponible en: <http://scielosp.org/pdf/spm/v47n5/28384.pdf>
9. Cadillo J. Prevalencia de enteroparasitosis frente al consumo cotidiano y dirigido de Mentha spica L. “hierba buena” en el centro Educativo N°86282 Francisco Alegre Serrano de la ciudad de Carhuaz-Ancash, noviembre 2001.[Internet].Lima: Universidad Nacional. Facultad de Farmacia y Bioquímica.2004. Disponible en:http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1473/1/Cadillo_mj.pdf

10. Rosas A, Lopez A. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomatillo (*Thymus vulgaris*). *TSIA* [Internet]. 2011.[13 may 2017];5(1):41-50.Disponible en:[http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5\(1\)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf)

11. Padrini F, Lucheroni M. Las Guías del Bienestar : Aceites esenciales para recuperar la vitalidad bienestar , la belleza. Editorial de vecchi s.a [Internet] 2000. [citado 27 May 2017]: 3-95. Disponible en: <http://www.inocua.org/site/Archivos/libros/aceites%20esenciales.pdf>

12. Snoussi M, Noumi E, Trabelsi N, Flamini G, Papetti A, De Feo V. *Mentha spicata* Aceite esencial: composición química, propiedades antioxidantes y antibacterianas Actividades contra planctónicos y biofilm culturas de *Vibrio* spp. *Son. Rev Molecules* [Internet]. 2015. [citado 11 Jun 2017]; 20(8): 14402-14424. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/8/14402/htm>

13. Shahbazi Y. Composición Química y Actividad Antibacteriana In Vitro de *Mentha spicata* Aceite Esencial contra Bacterias Patógenas Comunes. Hindawi Publishing Corporation [Internet] 2015 [Citado 11 Jun 2017]; 2015: 1-5. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jpath/2015/916305/>

14. Fitsiou E, Mitropoulou G, Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Vamvakias M, Bardouki H, Panayiotidis M, Galanis A, et al. Perfil fitoquímico y evaluación de las

actividades biológicas de los aceites esenciales derivados del griego aromático a especies de plantas *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* y margarita Fortunella. *Molecules* [Internet].2016. [Citado 11 Jun 2017]; 21(8): 2-15. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/8/1069/htm>

15. Shahbazia Y, Shavisib N. Interacciones de los aceites esenciales de *Ziziphora clinopodioides* y *Mentha spicata* con quitosano y ciprofloxacina contra patógenos comunes relacionados con los alimentos. *Rev.Food Science and Technology* [Internet].2016.[Citado 11 Jun 2017];7: 364-369. Disponible en: <https://www.science-direct.com/science/article/pii/S0023643816301955>

16. Golestan L, Seyedyousefi L, Kaboosi M, Safari H. Efecto de los aceites esenciales de *Mentha spicata* L. y *Mentha aquatica* L. en las propiedades microbiológicas del producto lácteo fermentado, kashk.2016.*Rev Internacional FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY* [Internet].2016. [Citado 11 Jun 2017]51 (3):581-587. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13014>

17. Bayan Y, KUSEK M. Composición química y actividad antifúngica y antibacteriana del aceite volátil *Mentha spicata* L. *Rev. Cienc. Inv. Agr.* 2018.[Citado 10 abr 2018], 45 (1): 64-69.Disponible en : <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071816202018>

18. Karaca, N, Demirci B, Demirci Y. "Evaluación de los aceites esenciales de *Lavandula stoechas* L. subsp. *Stoechas* L., *Mentha spicata* L. subsp. *Spicata* L. y sus principales

- componentes contra los patógenos sinusitis" .Rev Zeitschrift für Naturforschung 2018. [Citado 10 Abril 2018] .Disponible en :<https://www.degruyter.com/view/j/znc.ahead-of-print/znc-2017-0150/znc-2017-0150.xml>
19. Horváth P, Koščová J. Actividad antibacteriana in vitro de los aceites esenciales de *Mentha* contra *Staphylococcus aureus*. Rev. FOLIA VETERINARIA 2018[Citado 10 Abr 2018];61(3):71-77. Disponible en: <https://content.sciendo.com/view/journals/fv/61/3/article-p71.xml>
20. Reaño C. Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos de *Aloysia triphylla* “cedrón”, *Rosmarinus officinalis* “romero”, *Mentha spicata* “hierbabuena”, *Portulaca oleracea* “verdolaga” y *Taraxacum officinale* “diente de león” [Internet]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas. 2014. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4801>
21. Capasso F, GrandoliniG, Izzo A. Fitoterapia: Impiego razionale delle droghe vegetali.2nd ed.Italia: Springer; 2006. [Citado, 11 Jun 2018]. Disponible en: https://books.google.es/books?id=Fc68KL2TFdsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&hl=es#v=onepage&q&f=false
22. Ing. Qca. García R. Obtención de aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) extraído por arrastre con vapor a escala piloto: estudio de la influencia

- de variables en el rendimiento y la calidad del aceite.[Tesis Maestria].Argentina: Universidad Tecnologica. Facultad Regional Resistencia. 2014. [Citado 11 Jun 2017]. Disponible en: <http://ria.utn.edu.ar/bitstream/handle/123456789/847/Tesis%20final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
23. Essalud. Formulario Nacional de Recursos Naturales y Afines. Perú .2002. [Citado 11 Jun 2018].
24. The Center for Food Security & Public Health [Página principal en Internet].USA: Staphylococcus aureus resistente a la meticilina. C2006-2011. [Actualizado 2011 enero; citado 11 Jun 2017]. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/mrsa-es.pdf>
25. Gómez C. staphylococcus aureus en población pediátrica: epidemiología molecular y factores de virulencia [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. 2013. [Citado 11 Jun 2017]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/22440/1/T34696.pdf>
26. Álvarez S. medicina General Integral. [Internet]. Vol I. 2 nd ed. La Habana: Ciencias Médicas; 2008. [Citado 11 Jun 2018]. Disponible en: <http://b15delta.xpg.uol.com.br/B51MGI1.pdf>

27. Bascones A, Figuero E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Av Periodon Implantol* [Internet].2005 [Citado 11 Junio 2017]; 17(3):147-156. Disponible en:<http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v17n3/147enfermedades.pdf>
28. Garcia R, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timo, y carvacrol sobre microorganismo de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* [Internet].2008. [Citado 11 Jun 2017]; 2(2):41-51. Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
29. Torrenegra M, Pájaro N, León G. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2018[Citado 20 Agosto 2018]. 46(2):160-175, 2017. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v46n2/0034-7418-rccqf-46-02-00160.pdf>
30. Nascimento P. Estudio de la actividad antibacteriana de Carvona y sus derivados. Tesis. Covilhã: universidad de Beira Interior.2014.[Citado 11 Jun 2018]. Disponible en: https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/6179/1/3778_7477.pdf
31. ZUNI J. Actividad Antibacteriana “in vitro” DEL ACEITE ESENCIAL DE MENTA (*Mentha piperita* L.) FRENTE A *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA (EPEC). Tesis. Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.2017. [Citado 11 Jun 2018]. Disponible en:http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4194/Zuni_Mamani_Jhonn_y.pdf?sequence=1&isAllowed=y

32. Mensa J, et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter 2013. [Citado 13 Feb 2019]; 26 (1):1-84. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>
33. Rubio A, Travieso M, Riverón Y, Martínez A, Peña J, Espinosa I, et al . Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba en cepas de *Salmonella enterica*. Rev Salud Anim. [Internet].2018.[citado 10 Feb 2019] ; 40(3). Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2018000300004&lng=es.
34. Huari G. Efecto Antibacteriano in vitro del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* (MUÑA) EN *Streptococcus mutans* [Tesis].Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.2014. Disponible en:http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3680/Huari_gg.pdf;jsessionid=3BEA695F16593D6AAE9D14597A5F4CE3?sequence=1

35. Cerpa, M. Hidrodestilación de aceites esenciales. Valladolid. [Tesis Doctoral]. Valladolid: Universidad de Valladolid. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, 2007. Disponible en: <http://www.anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceites-esenciales.pdf>
36. Lazo S. Rivas V. Estudio de las propiedades antifúngicas de los extractos de hojas de *cassia grandis* (carao) y bulbos de *allium sativum* (ajo) en *microsporium canis*, *trichophyton rubrum* y *epidermophyton floccosum*. [Tesis]. El Salvador: Universidad de el Salvador. Facultad de Química y Farmacia. 2004. Disponible en :<http://ri.ues.edu.sv/5622/1/10128676.pdf>
37. Pedrique M. Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Antibiograma). Venezuela. 2002. [Citado 20 Marzo 2017]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf
38. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Código de Ética para La Investigación. Versión 001. Aprobado por acuerdo del Consejo Universitario con Resolución N° 0108-2016-CU-Uladech Católica, de fecha 25 de enero de 2016. [Citado 6 Feb 2019]. Disponible en: <https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2016/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v001.p>

ANEXOS

Anexo 01:

Tabla 3: PRUEBA DE CHAPIRO – WILKS PARA DETERMINAR LA NORMALIDAD DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Pruebas de normalidad(b)

GRUPO	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
H24 ESTANDAR	0.631	7	0.010
EXP01	0.903	7	0.035
EXP02	0.927	7	0.024

Este es un límite inferior de la significación verdadera.

- a) Corrección de la significación de Lilliefors
- b) H24 es una constante cuando GRUPO = NEGATIVO y se ha desestimado.

FUENTE: PAQUETE ESTADÍSTICO SPSS 22.0 SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA INVESTIGACIÓN

Anexo 02

Tabla 4: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS ENTRE LOS GRUPOS ESTUDIADOS UTILIZANDO ESTADÍSTICO DE LEVENE

Prueba de homogeneidad de varianzas

H24

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
7.555	3	24	0.001

FUENTE: PAQUETE ESTADÍSTICO SPSS 22.0 SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA INVESTIGACIÓN

Anexo 03

Tabla 5: DATOS VÁLIDOS SEGÚN CRITERIO DE NORMALIDAD

Resumen del procesamiento de los casos

GRUPO		CASOS					
		Válidos		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
H24	NEGATIVO	7	100.0%	0	0.0%	7	100.0%
	ESTANDAR	7	100.0%	0	0.0%	7	100.0%
	EXP01	7	100.0%	0	0.0%	7	100.0%
	EXP02	7	100.0%	0	0.0%	7	100.0%

FUENTE: PAQUETE ESTADÍSTICO SPSS 22.0 SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS
EN LA INVESTIGACIÓN

ANEXO 04

CERTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-374** Reference Number: ATCC® 25923™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Megan B Stein Release Date: 2017/3/9
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm


 Amanda Kuperus
 Quality Control Manager
 AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and picking slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



ATCC Licensed Derivative

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC's cultures.



TESTING CERT #2655.01

(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC.266

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	Non-identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus
 Sample Description: 0360
 Sample ID: 360-374
 Sample Creation Date/Time: 2017-03-06T15:02:23.906 MS/MS
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
G1 (+++)(A)	360-374	Staphylococcus aureus	2.24

Comments

N/A

Anexo 05

Mentha spicata (Menta)



ANEXO 06

CERTIFICACIÓN DE LA PLANTA

**Herbarium Truxillense (HUT)**
Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 009 – 2019- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO:

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae
- Super Orden: Asterales
- Orden: Lamiales
- Familia: Lamiaceae
- Género: *Mentha*
- Especie: *M. spicata* L.
- Nombre común: "menta"

Muestra alcanzada a este despacho por JESSICA JANETH ZELADA BECERRA, identificado con DNI: 46227462, con domicilio legal en Calle Agua Marina 134, Urb. Santa Inés- Trujillo. Estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote- Sede Trujillo, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del Proyecto de Tesis: "Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Mentha spicata* "menta" en cepas de *Staphylococcus aureus*"

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiere lugar.

Trujillo, 13 de febrero del 2019


Dr. JOSÉ MOSTACERO LEÓN
Director del Herbario HUT

cc. Herbario HUT



E-mail: herbariumtruxillensehut@yahoo.com

Anexo 07

PROCEDIMIENTO

RECOLECCIÓN DE LA PLANTA



Fuente fotográfica propia



Pesar las hojas de menta



Extracción del aceite esencial con el equipo de clevenger



Llevar a la incubadora



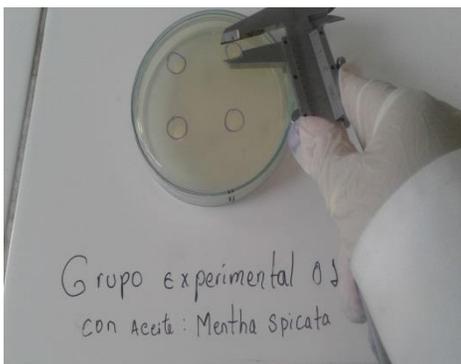
SIEMBRA DEL CULTIVO



Fuente fotográfica propia

MEDICACIÓN DE LOS HALOS

Materiales: vernier



Fuente fotográfica propia