



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de **Informe final de tesis** es:

Actividad antibacteriana In vitro del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Presentado por:

SUAREZ MEJIA, DANIELA FERNANDA

De la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **11%** por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Ica, 07 de Agosto de 2024


.....
Dra. JOSEFA BERTHA PARI OLARTE
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Actividad antibacteriana In vitro del extracto etanólico de las hojas
de *Melissa officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y
Escherichia coli

Línea de investigación
Salud Pública y conservación del Medio Ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

AUTORA:

BACH. DANIELA FERNANDA SUAREZ MEJIA

Ica, Perú

2024

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta Tesis a mis padres quienes siempre me apoyaron incondicionalmente desde el inicio de mi formación profesional y por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y algunas libertades lo que forjo en mí una persona disciplinada y perseverante.

Gracias Madre y Padre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme en todo momento a construir en mi vida un camino correcto.

A mi familia por motivarme día a día a salir adelante pese a las adversidades que se presentaron en el camino de mi formación, impulsándome a culminar mi etapa universitaria.

A todos mis docentes por sus enseñanzas brindadas, en especial a mi asesora principal por su tiempo, paciencia y dedicación que me brindó en mi proyecto.

ÍNDICE

	Páginas
Portada	
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice	iv
Índice de contenido	v
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. Introducción	9
II. Estrategia metodológica	17
III. Resultados	22
IV. Discusión	31
V. Conclusiones	32
VI. Recomendaciones	33
VII. Fuente de información	34
VIII. Anexos	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Tabla 2 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Tabla 3 Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición (extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L sobre <i>S. aureus</i>)	25
Tabla 4 Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de hojas de <i>Melissa officinalis</i> L a diferentes concentraciones frente a <i>Escherichia coli</i> .	26
Tabla 5 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L frente a <i>Escherichia coli</i> .	28
Tabla 6 Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición (extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L sobre <i>E coli</i>).	29
Tabla 7 Porcentaje de inhibición relativa (PIR) del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Melissa officinalis</i> L	13
Figura 2.	Tratamiento de muestra vegetal	18
Figura 3	Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L frente a <i>S. aureus</i> .	23
Figura 4	Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas <i>Melissa officinalis</i> L frente a <i>Escherichia coli</i> .	27

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Melissa officinalis* L. pertenece a la familia Lamiaceae, es conocida en nuestro país como toronjil.

OBJETIVO: Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

MÉTODOS: La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en disco (Método de Kirby Bauer) y se empleó la técnica de maceración por 48 horas.

RESULTADOS: El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* están en relación directa a su concentración, al 100 %, asimismo el porcentaje de inhibición relativa sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fué de 59 % y 66.7 % lo que reveló efecto inhibitorio poco activo y moderadamente activo respectivamente según referencias del protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET-ESSALUD.

Palabras claves: antibacteriano, extractos, bacterias patógenas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Melissa Officinalis* L. belongs to the Lamiaceae family, is known in our country as a Toronjil.

OBJECTIVE: Determine the in vitro antibacterial activity of the etanolic extract of *Melissa officinalis* L s leaves in front of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Methods: Antibacterial activity was evaluated by the disk dissemination method (Kirby Bauer method) and the maceration technique for 48 hours was used.

Results: The percentage of relative inhibition of the ethanolic extract of leaves of *Melissa officinalis* L on the strain of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are directly related to their concentration, 100 %, also the percentage of relative inhibition on the strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, it was 59 % and 66.7 % that revealed inhibitory effect not very active and moderately active respectively according to references of the study of the IMET-ESSALUD antimicrobial activity.

Keywords: antibacterial, extracts, pathogenic bacteria.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un grave problema mundial que amenaza la eficacia terapéutica, facilitando el incremento de la morbi-mortalidad de los pacientes tanto en el ámbito hospitalario como ambulatorio¹.

Los reportes muestran a *Pseudomonas aureginosa* y *Escherichia coli* como los principales agentes de morbilidad en diferentes edades y sistemas humanos. A ello se suman las consecuencias de la automedicación con antibióticos, es decir la exposición innecesaria de una cepa bacteriana a un antibiótico. Estudios nacionales e internacionales han encontrado que tanto *Escherichia coli* como *Pseudomonas aureginosa* han presentado resistencia a cefalosporinas de la primera hasta la tercera generación y otros antibióticos, posiblemente asociada a la automedicación en poblaciones de rurales. Ante esta situación de salud pública, las plantas medicinales son una alternativa de la medicina natural contra microorganismos con alta resistencia antibiótica por los efectos bactericidas o bacteriostáticos de los metabolitos secundarios que hay en ellas².

La humanidad desde tiempos ancestrales emplea los recursos vegetales en la alimentación, en la salud, así como en sus creencias religiosas, estos conocimientos han sido transmitidos como medicina tradicional a las nuevas generaciones, teniéndose como experiencia que la efectividad de las plantas medicinales depende del modo en que son preparadas y de las posibles combinaciones de éstas, al margen de los principios activos que posean.

Actualmente cientos de especies vegetales se emplean en la medicina, ante lo cual, la ciencia moderna busca precisar, comparar y realizar la clasificación de las propiedades que presenten, por medio de estudios y análisis de sus efectos terapéuticos, que permitan agruparlas por efectos similares, e identificar cuales son los principios activos responsables en la mitigación o recuperación de las enfermedades, para posteriormente aislarlos y determinar en ellos su estructura química, sintetizarlos y formular posibles modificaciones estructurales con la finalidad de lograr una mayor actividad terapéutica³.

Asimismo existe gran repercusión por el acelerado desarrollo de la obtención de fármacos a partir de plantas medicinales en las prácticas actuales.

Los metabolitos secundarios presentes en las plantas cumplen un rol de importancia en su mecanismo de defensa frente a diversas amenazas, como por ejemplo contra los insectos y otros que las afectan, tienen también propiedades farmacológicas pues tienen efecto antibacteriano y antifúngico además actúan como antioxidante, etc.

Entre los metabolitos secundarios con potencial bioactivo se tiene a los compuestos fenólicos útil en la prevención de los daños causados por los radicales libres⁴.

El aumento de la confianza en el uso de plantas medicinales y productos derivados se ve reflejado por su empleo mayoritario tanto en países en vías de desarrollo (80%), como en los países desarrollados (50-60%)⁵.

Es frecuente obtener los principios activos generalmente de las hojas, aceites esenciales, tallos e inflorescencia; y en menor frecuencia de frutos, cáscaras, y semillas o de partes vegetales de descarte, las que puedan presentar alguna propiedad importante en el ámbito de salud; por lo que en el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Melissa Officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que confirman y explican las propiedades de *Melissa Officinalis* L

El presente estudio consta de 8 capítulos:

Capítulo I: refiere a la introducción y contiene los siguientes aspectos: Descripción de la realidad problemática, antecedentes de la investigación, justificación de la investigación, objetivos del presente estudio.

El capítulo II: refiere a la metodología considerada en el presente estudio.

Capítulo III: refiere los resultados obtenidos en el presente estudio.

Capítulo IV discusión que contiene sus análisis correspondientes.

Capítulo V conclusión.

Capítulo VI recomendación

Capítulo VII bibliografía

Capítulo VIII anexos.

1.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1 Antecedentes Internacionales

Aucacama L. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana “in vitro” del extracto hidroalcohólico de las hojas de *melissa officinalis* (toronjil) en proteus spp. El objetivo: fue evaluar la actividad antimicrobiana “in vitro” del extracto hidroalcohólico de las hojas de Mellisa officinalis (Toronjil) en Proteus spp. Metodología: se realizó el método de difusión en discos (Kirby-Bauer) que reveló actividad antimicrobiana a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%⁶.

Vélez R, D’Armas H, Jaramillo-Jaramillo C, Vélez E. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa Officinalis* (toronjil). Objetivo: Determinar las familias de compuestos químicos (metabolitos secundarios que brindan la acción terapéutica o toxica) y su acción salina. Metodología: antibiograma: difusión en agar y letalidad con *Artemia salina*. Resultado: de las especies estudiadas, la especie *C. citratus* mostró el mayor efecto antibacteriano contra las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* (halos de

inhibición > 15mm). Asimismo la *C. citratus* y *M. officinalis* mostraron una actividad letal significativa (CL50 <1000 µg/ml) frente a nauplios de *A. salina* a las 24 h de exposición: 358,03 y 72,25 µg/ml respectivamente⁷.

Ruis A. (2018). Identificación por GC-MS de compuestos químicos presentes en extractos orgánicos de *Melissa officinalis* y evaluación de su actividad antimicrobiana. Objetivo: Identificar los compuestos químicos presentes en extractos orgánicos de *Melissa officinalis* a través de cromatografía de gases masas (GC-MS) a fin de evaluar sus propiedades antimicrobianas. Metodología: Los extractos orgánicos obtenidos a partir del uso de los solventes: hexano, éter etílico, acetato de etilo y metanol, fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). Para la prueba de sensibilidad antimicrobiana se utilizó el medio de cultivo agar métodos estándar (AME) de la marca BD Bioxon el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones de uso. Resultados: Se determinó que el extracto metabólico obtenido presentó mayor inhibición del crecimiento de las tres cepas estudiadas con halos de 17,15 y 8 mm⁸.

De Sousa A, Andreza R, Alves E, Cruz A, Leandro L. et al. 2016). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos metanol y hexano, el tallo rodadura *Melissa Officinalis*. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana y modulador de extracto de metanol y hexano rodar el tallo de *M. officinalis L.* frente a las cepas de bacterias normas y las bacterias multirresistentes. Metodología: se empleó la prueba de microdilución y la modulación de aminoglucósidos (gentamicina y amikacina). Resultados: el estudio realizado reveló que ambos extractos obtuvieron resultados ≥ 1024 µg/ml con contra las bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*). El extracto de metanol combinado con la gentamicina presentó resultados significativos contra *E. coli* y *S. aureus*⁹.

Antecedentes nacionales

Lopez C, Lupinta I (2022). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto del etanólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Metodología: se empleó el método de difusión Kirby-Bauer Resultado: El extracto estudiado reveló halos de inhibición de 7,7 mm; 16,8 mm y 19,5 mm a las concentraciones del 20 %, 40 % y 60 % respectivamente¹⁰.

Perez M. (2019). Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* "toronjil" frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019. Objetivo determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* "toronjil". Metodología: se utilizó el método Kirby –

Bauer, la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida. A las concentraciones de 5 % y 10 % se obtuvo mayor halos de inhibición de 9,67 mm y 10,83 mm respectivamente; mientras que la Nistatina obtuvo 17,83 mm. La CMI y la CMF fueron 0,391 mg/ml y 0,781 mg/ml respectivamente¹¹.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Tendrá actividad antibacteriana el extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

Problemas específicos

1. ¿La actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L y del ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* muestran diferencias significativas?
2. ¿Cuál es el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de *Melissa Officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las plantas medicinales son valiosas como recursos para tratar muchas enfermedades, por lo cual, merecen un interés especial, ya que son capaces de contribuir a la sociedad y al país mediante su uso adecuado, fomentando con ello la disminución de resistencia bacteriana producto del descontrolado uso de antibióticos. Es por ello, que surge la necesidad de realizar un estudio experimental, basado en la comprobación de la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa Officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, brindando con ello; la administración de medicina tradicional que podría mejorar el acceso a la atención de salud inmediata¹².

Importancia

El empleo de las plantas medicinales para el cuidado de la salud humana son de importancia invaluable, a pesar de ello, aún se desconoce o no se aprovecha la amplia utilidad de muchas especies como la *Melissa Officinalis* L, lo que demuestra la necesidad de invertir en investigación bajo parámetros científicos modernos y siguiendo las normas éticas internacionales buscando afrontar problemáticas como enfermedades de los sistemas digestivo, genitourinario y respiratorio⁸. Por tanto es necesario seguir trabajando para probar la actividad antimicrobiana específica del extracto a estudiar.

1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Objetivos específicos

1. Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L y del ciprofloxacino frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
2. Determinar el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.2 *Melissa Officinalis* L



Fig. 1. *Melissa Officinalis* L¹³

1.4.3 Clasificación taxonómica

Según Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist. (1988).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Melissa*

Especie: *Melissa officinalis* L

N.V. “toronjil” (anexo 2)

1.4.4 Características botánicas

La melisa es una planta vivaz, nativa del sur de Europa, de 50 a 80 cm de altura; su tallo erguido está más o menos ramificado. De hojas opuestas con el pecíolo largo, ovadas, onduladas en forma de corazón, con bordes irregulares y dentadas, lustrosas, de un hermoso verde en el haz y más pálidas por debajo, aterciopeladas. Las flores son blancas o rosa pálido, de 1 cm, y se reagrupan en vertical a la base de las hojas. Las flores y las hojas estrujadas, especiadas y aromáticas, desprenden un fuerte olor a limón¹³.

1.4.5 Usos

Los aceites esenciales son usados como agentes carminativos, estimulantes, diuréticos y antirreumáticos; algunos poseen propiedades insecticidas, antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos y han sido considerados como ingredientes activos en algunos plaguicidas botánicos, debido a su eficacia frente a un número considerable de plagas, su toxicidad mínima en mamíferos y su disponibilidad general¹⁴.

1.4.6 Nombre común

Toronjil

1.4.7 Composición química

3-metil-4-isopropil fenol

Eugenol

Cariofileno

α -cariofileno

Germacreno D

1.4.8 Extractos de plantas

Es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos y/o químicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología; en general, los extractos son soluciones diluidas de metabolitos secundarios. Los extractos de plantas tienen un gran potencial como compuestos antimicrobianos contra microorganismos⁵.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

2.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

2.1.1 Tipo de Investigación

Básica

Se utilizará para comprender y ampliar nuestros conocimientos sobre un fenómeno o campo específico.

2.1.2 Nivel de Investigación

Descriptiva

Tendrá como prioridad la caracterización del fenómeno estudiado

2.1.3 Diseño de Investigación

Experimental

Se controlará deliberadamente las variables para delimitar relaciones entre ellas.

HIPOTESIS

Hipótesis General

El extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L presenta actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Hipótesis específicas

1. La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L y del ciprofloxacino frente la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* no muestran diferencias significativas.
2. El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas *Melissa Officinalis* L y del ciprofloxacino frente la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* están en relación directa a su concentración.

2.3 VARIABLES

- **Variable independiente:** Extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L
- **Variable dependiente:** Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L

2.4 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable independiente	Dimensión	Indicadores
Extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L	mg/mL	Peso del extracto Análisis macroscópico
Variable dependiente	Dimensión	Indicadores
Actividad antibacteriana	Bacterias	
	<i>S. aureus</i> <i>E.coli</i>	mm de diámetro
	Crecimiento en medio de cultivo	Grado de turbidez (Tubo N° 4 y 5 de Mc.Farland)

2.5 POBLACIÓN Y MUESTRA

Población vegetal:

Cultivos de *Melissa Officinalis* L

Comunidad bacteriana:

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Muestra:

Hojas de *Melissa Officinalis* L

2.6 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

Material biológico:

Material vegetal: hojas de *Melissa Officinalis* L

Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Medios de cultivo:

Agar Mueller-Hinton

Agar tripticasa de soya

Control positivo:

Ciprofloxacino

Solventes y reactivos:

- Etanol 96°
- Agua destilada
- Cloruro de sodio

Equipos de laboratorio:

- Microondas
- Balanza analítica
- Refrigeradora
- Campana bacteriológica de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora 36°C

Materiales de laboratorio:

- Baguetas
- Probeta
- Gradilla para tubos de ensayo
- Termómetro
- Matraz Erlenmeyer.
- Vasos de precipitación
- Embudo
- Pipetas
- Asa de Kolle
- Placas petri

Otros:

- Hisopos estériles
- Papel aluminio
- Viales estériles
- Algodón
- Liga
- pavilo
- Papel kraft
- Papel de filtro Whatman
- Algodón
- Guantes quirúrgicos
- Mascarillas

Tratamiento del material vegetal

Obtención y selección de la muestra: Las hojas de *Melissa Officinalis* L, objeto de estudio fue adquirida en una tienda naturista local (procedencia: distrito de Huanta, provincia de

Huanta, región Ayacucho), éstas pasaron por el proceso de selección y se desechó las que estaban en mal estado, utilizándose para su transporte bolsas de papel Kraft.

- **Limpieza:** Para éste efecto se empleó agua potable en un primer paso y finalmente con agua destilada.
- **Secado:** Se realizó al aire libre bajo sombra y en la estufa a una temperatura de 40°C, durante cuatro días, y fué culminado a temperatura ambiente.
- **Molienda:** Se realizó mediante el empleo de un molino eléctrico, que nos proporcionó como resultado una muestra vegetal homogénea.
- **Almacenamiento:** La muestra molida fué almacenada en un frasco de vidrio de color ámbar y de cierre hermético, bajo sombra. En el rótulo se consignó el nombre de la especie, la parte empleada y la fecha en que fue almacenada.

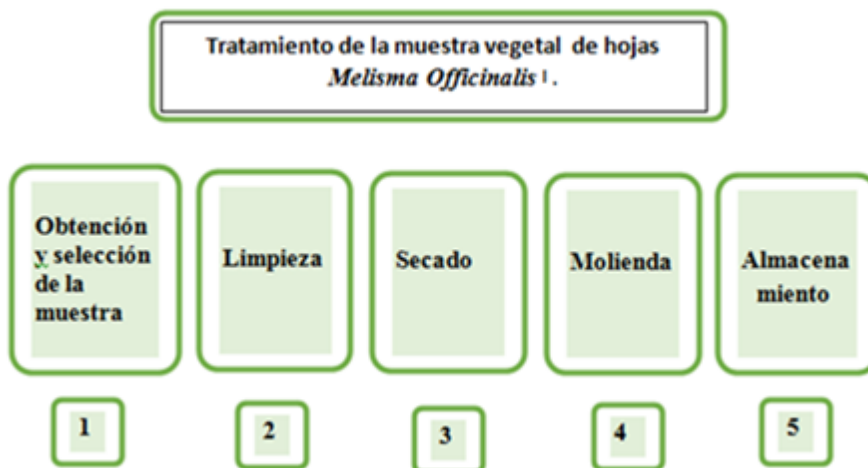


Figura 2. Tratamiento de muestra vegetal

Obtención del extracto etanólico

Se realizó el pesado de 10 g. de la muestra seca de hojas de *Melissa Officinalis* L que fue depositada en 100 mL de etanol de 96°, se realizó la agitación correspondiente y se puso en maceración por 48 horas, obteniéndose el extracto, el cual fue filtrado cuyo solvente fue evaporado hasta sequedad¹⁵.

2.7 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Cepas utilizadas:

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Medios de cultivo:

Agar Mueller-Hinton

Caldo Nutritivo.

Control positivo:

Ciprofloxacino (5 ug)

Control negativo :

Etanol 96°

Preparación de materiales:

Las placas Petri se envolvieron en papel kraft y se esterilizaron por calor seco en una estufa a 180°C por 2 horas. Las pipetas, los viales de vidrio y los tubos con tapa rosca se esterilizaron con calor húmedo en autoclave a 121°C durante 15 minutos¹⁶.

Preparación de medios de cultivo:

Preparación del Medio de Cultivo Sólido. -

Se suspendió 39 g del medio de cultivo Mûeller –Hinton en 1000 mL de agua destilada, y se calentó a ebullición hasta disolución completa. Se distribuyeron en frascos y se esterilizó en autoclave por 15 minutos y 15 lb de presión (121°C)⁹. Una vez temperado a 45 - 50°C se dispuso en placas Petri de vidrio estériles, logrando un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm, correspondiente a 25- 30 mL para placas de 90 mm de diámetro que se dejó solidificar a temperatura ambiente y finalmente se colocó en la estufa durante 24 horas a 35°C para pasar la prueba de esterilidad¹⁶.

Determinación de la actividad antibacteriana

Preparación del inóculo

Se seleccionó cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en agar TSA y se transfirió a un tubo que contiene de 5 mL de solución salina estéril (9.0 g/L NaCl; 9 ‰)

El inóculo se ajustó con solución salina hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, para ello se usó una luz apropiada. Los tubos se observaron contra un fondo blanco con líneas negras como contraste¹⁷.

Inoculación de las Placas

Después de 15 minutos del paso anterior, se introdujo un hisopo estéril en la suspensión del inóculo, retirando el exceso sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido. Se procuró una distribución uniforme del inóculo sobre la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido¹⁷.

Método de Difusión en agar (actividad antibacteriana)

Este método se basa en la formación en el gel de agar de una gradiente de concentración del compuesto antimicrobiano (antibiótico) a partir de un disco impregnado con una determinada cantidad del mismo. El disco al ponerse en contacto con la humedad del agar absorbe el agua y el antimicrobiano difunde radialmente a través del espesor del agar circundante a partir del disco formándose así una gradiente¹⁸.

Método de Difusión de Disco

Los discos impregnados de los extractos a diferentes concentraciones (100%,50% y 25%), se colocaron sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril, con la que se presionó suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Posterior a los 15 minutos, las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 24 h. Finalmente se midieron los diámetros de los halos de inhibición con la ayuda de una regla de medición (incluyendo el diámetro del disco)¹⁹.

Se utilizó como control positivo Ciprofloxacino y como control negativo etanol de 96°.

Con el método de difusión se mide únicamente el diámetro del halo de inhibición. Por tanto, Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en las siguientes categorías sensible (S): ≥ 20 , intermedia (I): 15-19 o resistente: ≤ 14 (R)²⁰.

	Halos de inhibición (mm)
Sensible	≥ 20
Intermedio	15-19
Resistente	≤ 14

La determinación de la actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en agar descrito por Bauer et al. (1966)¹⁵.

Los ensayos fueron realizados por triplicado²¹.

Porcentaje de inhibición Relativa (PIR):

El cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, se procedió aplicando la siguiente expresión¹⁸

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{media diámetro.halo inhib.del extracto} \times 100}{\text{media diámetro.halo inhib.control positivo}}$$

Donde:

- A = Diámetro del halo de inhibición del extracto.
B = Diámetro del halo de inhibición del antibiótico
PIR (%) = Porcentaje de inhibición relativa

2.8 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Los datos obtenidos fueron recopilados en una ficha de recolección y se procesaron con el Software SPSS V 26.

El análisis de varianza (ANOVA) determinó diferencias significativas entre los diámetros de inhibición revelados por el extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L a las concentraciones estudiadas frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$) permitió establecer el efecto del extracto etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L a las concentraciones 25%, 50% y 100% sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

III. RESULTADOS

TABLA 1

**Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L
frente a *Staphylococcus aureus***

Diámetro (mm) de los halos de inhibición a diferentes concentraciones				
	25%	50%	100%	Control
	(1)	(2)	(3)	(+)
	09	11	13	22
Extracto etanólico	10	12	14	23
	09	11	13	22
Promedio	09	11	13	22

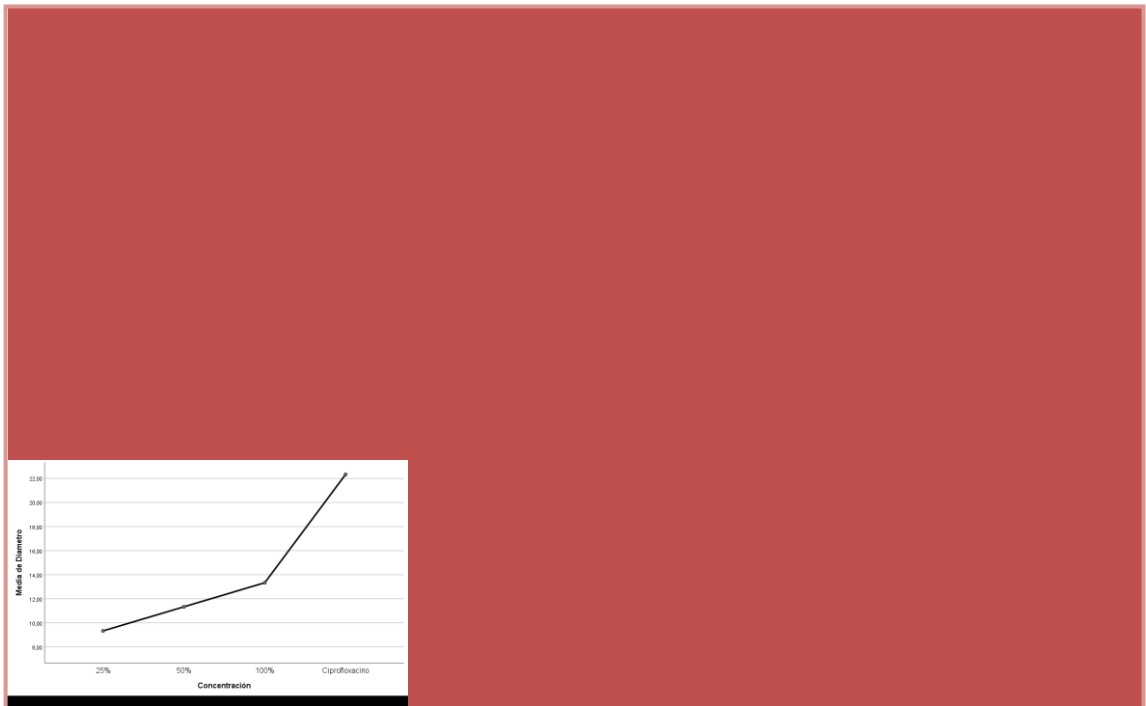
C.P.=

C.P.= Ciprofloxacino (5ug)

C.N.= Etanol 96°

FIGURA 3

Diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus*



Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26

Los promedios de diámetros, de los halos de inhibición, revelados por el efecto inhibitorio del extracto etanólico a diferentes concentraciones sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* mostraron que la mencionada cepa tiene resistencia bacteriana intermedia frente al extracto etanólico al 100% con halos de inhibición de 13 mm de diámetro.

TABLA 2

Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus*

ANOVA

Diámetro					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	296,250	3	98,750	296,250	,000
Dentro de grupos	2,667	8	,333		
Total	298,917	11			

Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26

El análisis estadístico por **ANOVA (Análisis de varianza)** presenta un nivel de significancia de 0,000 ($p < 0.05$), concluyéndose que hay diferencia significativa entre los promedios de diámetros, de los halos de inhibición, evidenciados por la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L a diferentes concentraciones sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*.

TABLA 3

Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición generado por el efecto del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L sobre *Staphylococcus aureus*

Diámetro					
HSD Tukey^a					
Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
25%	3	9,3333			
50%	3		11,3333		
100%	3			13,3333	
Ciprofloxacino	3				22,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26

Luego con el análisis de promedios de Tukey se tiene que el extracto etanólico estudiado a una concentración del 100% frente a la cepa de *S. aureus*, muestra halos de inhibición de mayor promedio con 13 mm que difiere significativamente del diámetro obtenido con el Ciprofloxacino (22 mm) que se utilizó como control positivo.

TABLA 4

**Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L
frente a *Escherichia coli***

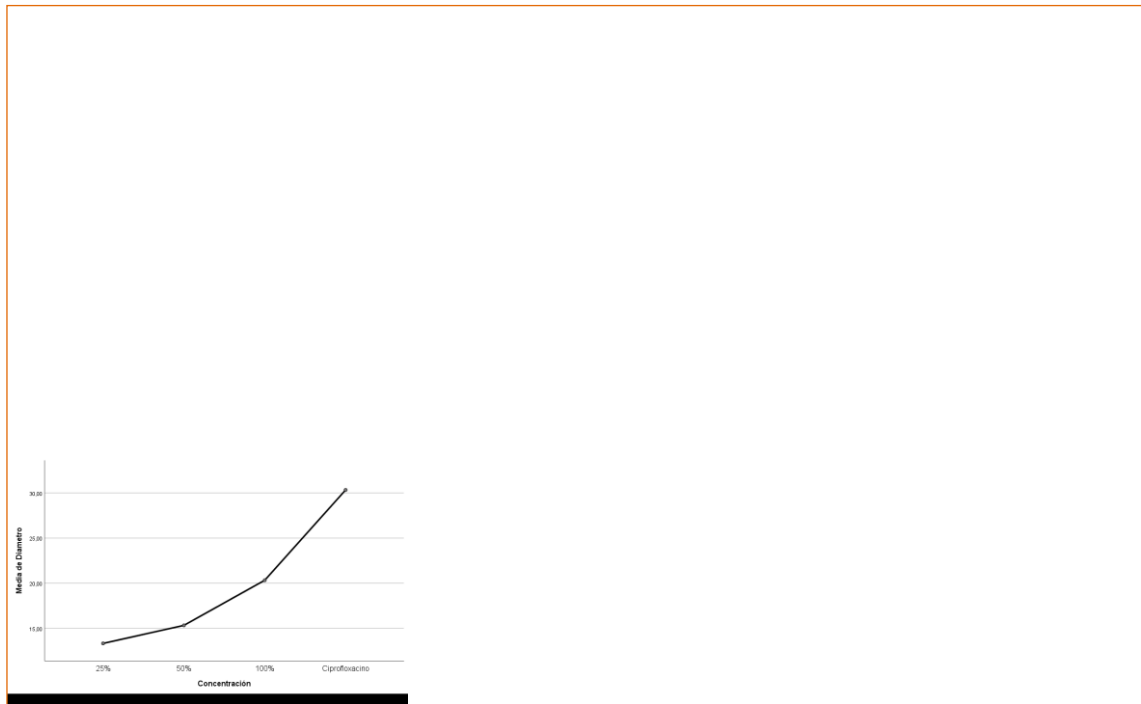
	Diámetro (mm) de los halos de inhibición a diferentes concentraciones			
	100% (1)	50% (2)	25% (3)	Control (+)
	13	15	20	30
Extracto etanólico	14	16	21	31
	13	15	20	30
Promedio	13	15	20	30

C.P.= Ciprofloxacino (5ug)

C.N.= Etanol 96°

FIGURA 3

Diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L frente a *Escherichia coli*.



Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26

Los promedios de diámetros de los halos de inhibición, revelados por el efecto inhibitorio del extracto etanólico a diferentes concentraciones sobre las cepas de *Escherichia coli*, mostraron que la mencionada cepa tiene sensibilidad bacteriana con halos de inhibición de 20 mm de diámetro.

TABLA 5

**Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L
frente a *Escherichia coli***

ANOVA					
Diametro	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	519,000	3	173,000	519,000	,000
Dentro de grupos	2,667	8	,333		
Total	521,667	11			

Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26

El análisis estadístico por ANOVA (Análisis de varianza) presenta un nivel de significancia de 0,000 ($p < 0.05$), concluyéndose que, hay diferencia significativa entre los promedios de diámetros, de los halos de inhibición, revelados por la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L a diferentes concentraciones frente las cepas de *Escherichia coli*.

TABLA 6

**Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición
(extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L sobre *E coli*).**

HSD Tukey ^a		Diametro			
Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
25%	3	13,3333			
50%	3		15,3333		
100%	3			20,3333	
Ciprofloxacino	3				30,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26

Luego con el análisis de promedios de Tukey se tiene el extracto etanólico estudiado a una concentración del 100% frente a la cepa *de E. coli*, muestra halos de inhibición de 20 mm con diferencia al diámetro obtenido con el ciprofloxacino (30 mm) que se utilizó como control positivo.

TABLA 7

Porcentaje de inhibición relativa (PIR) del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Microorganismo	Diámetro (mm) de halos de inhibición a diferentes concentraciones (%)			Control (+)	PIR
	25	50	100	mm	(%)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	09	11	13	22	59,09 %
<i>Escherichia coli</i> ATCC 13216	13	15	20	30	66,66 %

X³ = Promedio de tres repeticiones

- Control positivo = Ciprofloxacino (5 ug)
- PIR = Porcentaje de Inhibición Relativa

El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* están en relación directa a su concentración, al 100 %, el porcentaje de inhibición relativa sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fué de 59 % y 66.7 % lo que reveló efecto inhibitorio poco activo y moderadamente activo respectivamente según referencias del protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET-ESSALUD³⁴.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación demostraron que el mayor porcentaje de inhibición relativa (PIR), del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L se obtuvo contra las cepas de *Escherichia coli* con 66.7%, lo que permitió comprobar el efecto inhibitorio significativo del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L sobre la cepa mencionada a diferencia del efecto inhibitorio mostrado sobre la cepas de *Staphylococcus aureus* con 59.0 % de inhibición, dichos resultados se contrasta con el estudio titulado “Evaluación de la actividad antibacterial de extractos metanol y hexano, el tallo rodadura *Melissa Officinalis*” realizado por De Sousa A, Andreza R, Alves E, Cruz A, Leandro L. y otros quienes obtuvieron resultados con contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* Asimismo los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. sobre la bacteria *Escherichia coli* del, presente ewstudio se puede contrastar con los obtenidos en el trabajo titulado Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* realizado por Lopez C, Lupinta I que revelaron halos de inhibición de 7,7 mm; 16,8 mm y 19,5 mm a las concentraciones del 20 %, 40 % y 60 % respectivamente considerando que las bacterias en mención son gran negativas.

El ANOVA (Análisis de Varianza) indicó que existen diferencias significativas entre las bacterias evaluadas, en donde las cepas de *Escherichia coli* presentó mayor susceptibilidad frente al extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L a diferencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* con menor susceptibilidad (Tabla 1 y 4).

Con el análisis de significancia de Tukey se observó que el extracto etanólico estudiado a una concentración del 100% frente a la cepa de *S. aureus* y *E.coli*, reveló halos de inhibición de mayor promedio con 13 mm y 20 mm que difiere del diámetro obtenido con el Ciprofloxacino (22 mm y 30 mm) que se utilizó como control positivo.

La acción antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L se debe a la presencia compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides en abundancia como también al eugenol y el cariofileno que los principales componentes del aceite esencial de toronjil (*Melissa officinalis* L) que se encuentran en altos porcentajes 47.47 % y 40.77% respectivamente.

V. CONCLUSIONES

1. La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se determinó mediante el método de difusión en disco, obteniéndose a la concentración de 100% un promedio de halos de 13 mm y 20 mm respectivamente, indicando mayor inhibición sobre la bacteria de *Escherichia coli* a esta concentración.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L al 100% presentó mayor efecto antimicrobiano sobre la cepa de *Escherichia coli* con promedio de halos de inhibición de 20 mm, dicho efecto reveló halos de inhibición menores a los del ciprofloxacino (control positivo 30 mm de diámetro).
3. El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* están en relación directa a su concentración al 100 %, asimismo el porcentaje de inhibición relativa sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fué de 59 % y 66.7 % lo que demostró efecto inhibitorio poco activo y moderadamente activo respectivamente según referencias del protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET-ESSALUD

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. frente a otras cepas bacterianas de importancia.
2. Comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Melissa* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con otros controles positivos.
3. Evaluar la actividad antibacteriana de otros tipos de extractos de las hojas de *Melissa officinalis* L. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

VII. FUENTE DE INFORMACION

1. Altamirano L, Castro E, Cruz-López C. et al. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Morinda Citrifolia* (NONI) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. *Medicina Naturista* [Internet]. 2021 [fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; 15 (2). Disponible en: [file:///D:/Users/Teresa/Downloads/Dialnet-EfectoInhibitorioInVitroDelExtractoEtanologicoDeMori-7998125%20\(2\).pdf](file:///D:/Users/Teresa/Downloads/Dialnet-EfectoInhibitorioInVitroDelExtractoEtanologicoDeMori-7998125%20(2).pdf)
2. Rodriguez-quezada M, Gamarra-Torres O, Pérez-Azahuanche F. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos de seis plantas medicinales usadas en Amazonas. *Medicina Naturalista* [Internet]. 2021 [fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; 15 (1). Disponible en: <file:///D:/Users/Teresa/Downloads/TamizajeFitoquimicoYActividadAntibacterianaDeLosEx-7747848-MEDICINANATURALISTA.pdf>
3. Cabrera D, Sanchez Y, Guerra D. et al. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de extractos de *Bryophyllum pinnata*. *Revista Química Viva* [Internet]. 2011 [fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; (1). Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n1/cabrera.pdf>
4. Aronés-Jara M, Cárdenas-Landeo E, Luna-Molero H. et al. Tamizaje fitoquímico, contenido de compuestos fenólicos y potencial antioxidante de trece plantas medicinales de los afloramientos rocosos del Bosque de Piedras de Huaraca en Perú. *Rev. Soc. Quím. Perú* [Internet]. 2022 [fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; 88 (2). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2022000200165
5. Vélez R, D'Armas H, Jaramillo-Jaramillo C, Vélez E. Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa Officinalis* (toronjil). *Facsalud* [en línea]2018[fecha de acceso 8 mayo de 2023];2(2).Disponible en: <http://docplayer.es/97915200-Metabolitos-secundarios-actividad-antimicrobiana-y-letalidad-de-las-hojas-de-cymbopogon-citratus-hierba-luisa-y-melissa-officinalis-toronjil.html>
6. Aucacama L. Evaluación de la actividad antimicrobiana “in vitro” del extracto hidroalcohólico de las hojas de *melissa officinalis* (toronjil) en *proteus spp.*[tesis]. Ecuador: Universidad Regional Autónoma de los Andes; 2018[citada 28 abril 2023]. 89p. Disponible en: <https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/8752/1/PIUAMFCH012-2018.pdf>
7. Vélez R, D'Armas H, Jaramillo-Jaramillo C, Vélez E. Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa*

- Officinalis (toronjil). Facsalud [en línea]2018[fecha de acceso 8 mayo de 2023];2(2).Disponible en: <http://docplayer.es/97915200-Metabolitos-secundarios-actividad-antimicrobiana-y-letalidad-de-las-hojas-de-cymbopogon-citratus-hierba-luisa-y-melissa-officinalis-toronjil.html>
8. Ruis A. Identificación por GC-MS de compuestos químicos presentes en extractos orgánicos de *Melissa officinalis* y evaluación de su actividad antimicrobiana. [tesis]. México: Autónoma del Estado de Hidalgo; 2018 [citada 10 mayo 2023]. 64p. Disponible en:
<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/2195/Identificaci%C3%B3n%20por%20GC-MS%20de%20compuestos%20qu%C3%ADmicos%20presentes%20en%20extractos%20org%C3%A1nicos%20de%20Melissa%20officinalis%20y%20evaluaci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 9. De Sousa A, Andreza R, Alves E, Cruz A, Leandro L, et al. Evaluación de la actividad antibacterial de extractos metanol y hexano, el tallo rodadura *Melissa Officinalis*. Rev. Cienc. Salud.[en línea]2016[fecha de acceso 12 mayo de 2023];14 (2): 201-210. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/recis/v14n2/v14n2a06.pdf>
 10. Lopez C, Lupinta I. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *melissa officinalis* L. (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. [tesis]. Lima-Perú: Universidad Maria Auxiliadora; 2022[citada 15 mayo 2023]. 69 p. Disponible en: [file:///D:/Users/Teresa/Downloads/TESIS%20\(22\).pdf](file:///D:/Users/Teresa/Downloads/TESIS%20(22).pdf)
 11. Perez M. Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019. [tesis]. Ayacucho-Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga 2019[citada 18 mayo 2023]. 64 p. Disponible en: http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/4398/1/TESIS%20Far576_Per.pdf
 12. Grupo técnico de expertos en plantas medicinales OPS/OMS. Situación de las Plantas Medicinales en Perú 2018. [citada 19 mayo 2023]. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50479/OPSPER19001_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 13. Vogel. *Melissa officinalis* L. [citado 27 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.avogel.es/enciclopedia-plantas/melissa-officinalis.html>

14. Acevedo D, Navarro M, Montero P. Composición Química del Aceite Esencial de las Hojas de Toronjil (*Melissa officinalis* L.). Inf. tecnol. [Internet]. 2013 [fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; 24 (4): 49-54. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642013000400006
15. Romero A, Baldeón I. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Tropaeolum majus* L. (mastuerzo), frente a *Staphylococcus epidermidis*, por la técnica de Kirby-Bauer [tesis]. Lima-Perú: Universidad Inca Garcilaso de la Vega 2019 [citada 22 mayo 2023]. 68p. Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/5389/TESIS_ROMERO%20VERAMENDI-%20BALDE%20c3%93N%20MENDOZA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
16. Guerra J, Pozo W. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* “indano” mediante el método de difusión en agar. [tesis]. Iquitos-Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana 2013 [citada 23 mayo 2023]. 128 p. Disponible en: https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/3644/Jessy_Tesis_Titulo_2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y
17. Cruz-Carrillo A, Rodríguez N, Rodríguez C. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *bidens pilosa*, *lantana camara*, *schinus molle* y *silybum marianum*. Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.[en línea] 2010 [fecha de acceso 25 de mayo del 2023]; 13(2): 117-124. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n2/v13n2a14.pdf>
18. Romero G. Actividad antimicrobiana in vitro del aceite de Copaiba frente a bacterias patógenas. [tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2013 [citada 26 mayo 2023]. 53 p. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3458/Francia_fj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
19. Malbrón C. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión. Servicios antimicrobianos-Inei-Anus [citada 26 mayo 2023]. Disponible en: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wpcontent/uploads/2012/11/02/METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION_2012.pdf
20. Sierra-García I, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S. Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo Acta Biol [en línea] 2012 [fecha de acceso 29 de mayo de 2023]; 34 (96). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842012000100001

21. Picazo J. Procedimientos en microbiología clínica [citado 29 de mayo 2023]. Disponible en:

http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variable	Métodos
<p>Problema principal</p> <p>¿Tendrá efecto inhibitorio el extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Problemas específicos1.</p> <p>1. ¿El efecto inhibitorio del extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L y del ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> muestran diferencias significativas?</p> <p>2. ¿Cuál es el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p>Objetivo general</p> <p>Determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>1. Comparar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i></p> <p>2. Determinar el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Hipótesis General</p> <p>El extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L presenta efecto inhibitorio frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Hipótesis específicas</p> <p>1. El efecto inhibitorio del extracto etanólico de hojas <i>Melissa Officinalis</i> L y del ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> no muestran diferencias significativas.</p> <p>2. El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> están en relación directa a su concentración.</p>	<p>Independiente:</p> <p>Extracto etanólico de hojas de <i>Melissa Officinalis</i> L</p> <p>Dependiente</p> <p>Efecto inhibitorio frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Tipo de investigación</p> <p>Básica</p> <p>Nivel de investigación</p> <p>Descriptiva</p> <p>Diseño de investigación</p> <p>Experimental</p>

Anexo 2. Certificación botánica de *Melissa officinalis* L

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

"AÑO DE LA UNIDAD, LA PAZ Y EL DESARROLLO"

El B|go. Que suscribe determina que, la muestra biológica presentada por el bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga SUAREZ MEJIA DANIELA FERNANDA, con DNI N° 70379683, para su determinación pertenece al nombre científico de *Melissa officinalis* L., "toronjil", según Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist, (1988).

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GÉNERO: *Melissa*

ESPECIE: *Melissa officinalis* L.

N.V. "toronjil"

Se emite la presente certificación a solicitud del interesado, para fines de estudios

Ica 28 de abril del 2023.




.....
Dr. Miranda Huamán David Máximo
BIÓLOGO
CBP. 3681

Anexo 3. Autorización del uso de instalaciones del laboratorio de Farmacognosia.



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



CONSTANCIA

LA DIRECTORA ACADÉMICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA.

HACEN CONSTAR QUE LA ESTUDIANTE:

**SUAREZ MEJIA
DANIELA FERNANDA**

Código N° 20162526

Se le autoriza el uso de las instalaciones del laboratorio de Farmacognosia, para el desarrollo de su proyecto de tesis, el cual lleva como título "**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE Melissa Officinalis L FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHIA COLI**", y que aprobado el proyecto deberá presentar un documento con su asesor, indicando los días y horas que hará uso del laboratorio.

Se expide la presente constancia para los fines pertinentes.

Ica, 29 de agosto 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
Dirección de Escuela Académica

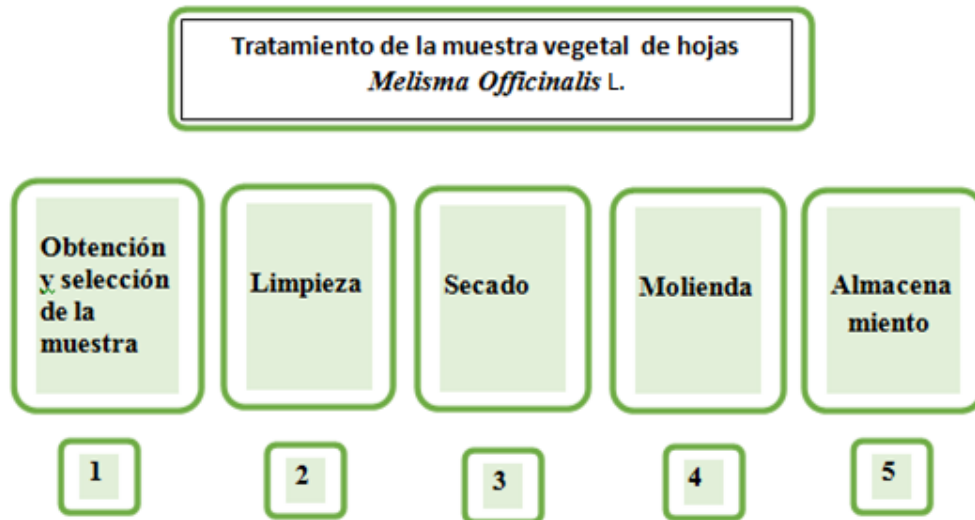


Dra. ELIZABETH JULIA MELGAR MERINO
DIRECTORA

Anexo 4. Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET-ESSALUD 2007

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	PORCENTAJE DE INHIBICION
INACTIVO	< 55%
POCO ACTIVO	55-65 %
MODERADAMENTE ACTIVO	66-80 %
BUENA ACTIVIDAD	>80%

Anexo 5. Diagrama de flujo de tratamiento de la muestra

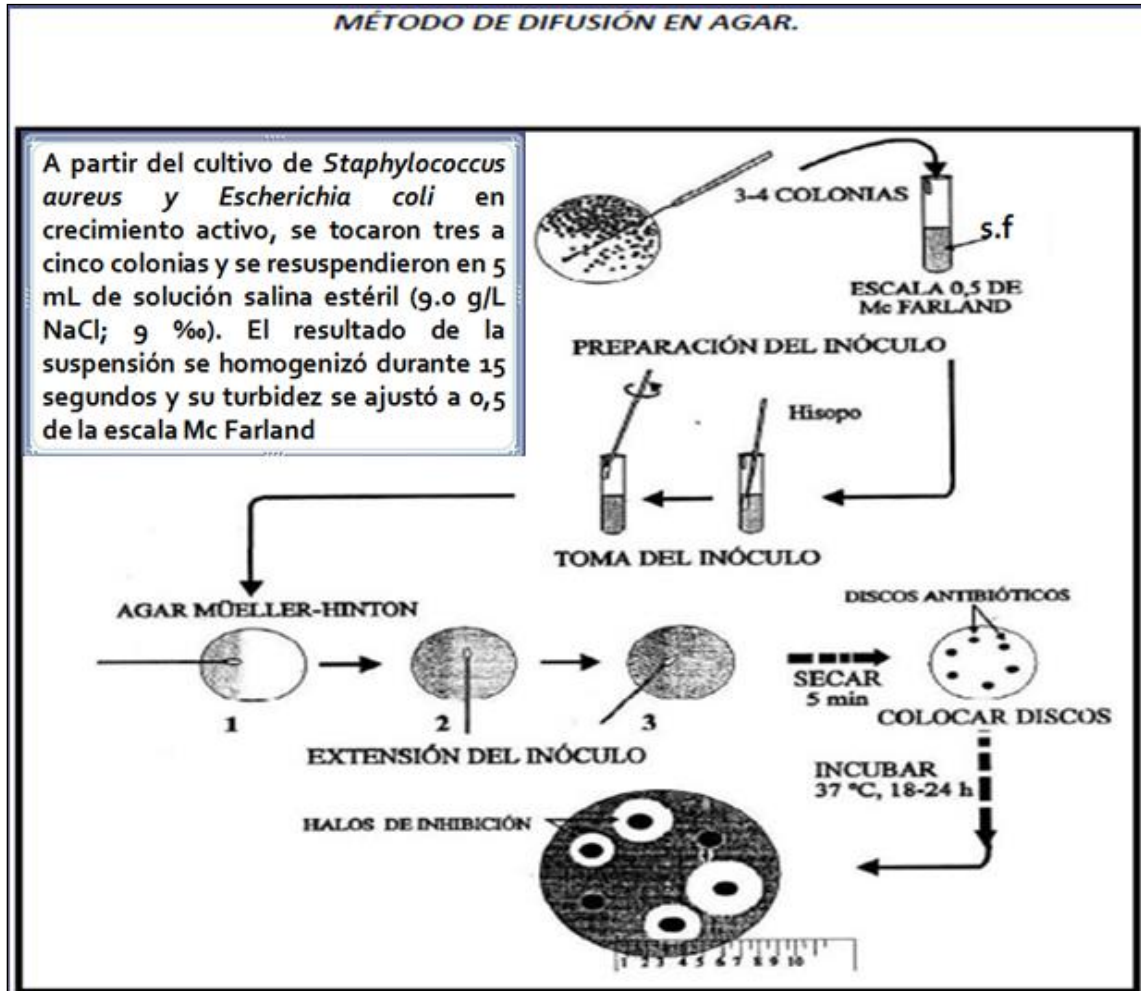


Anexo 6. Metabolitos secundarios del etanólico de hojas de *Melissa Officinalis* L

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYO	REACCIÓN
Compuestos fenólicos	Reactivo Tricloruro férrico 5 %	+++
Taninos	Reactivo Gelatina 1 %	+
Flavonoides	Reactivo Shinoda	+++
Esteroides y triterpenoides	Reactivo Lieberman Burchard	+
Sesquiterpenlactonas	Reactivo Baljet	-
Alcaloides	Reactivo Mayer	+++
Antraquinonas	Reactivo Bornträger	-
Saponinas	Prueba de la espuma	++

Donde: Abundante (+++) Moderado (++) Leve (+) Ausencia (-)

Anexo 7. Método de difusión en agar



Anexo 8. Tratamiento de la muestra vegetal *Melissa officinalis* L



Material vegetal seco

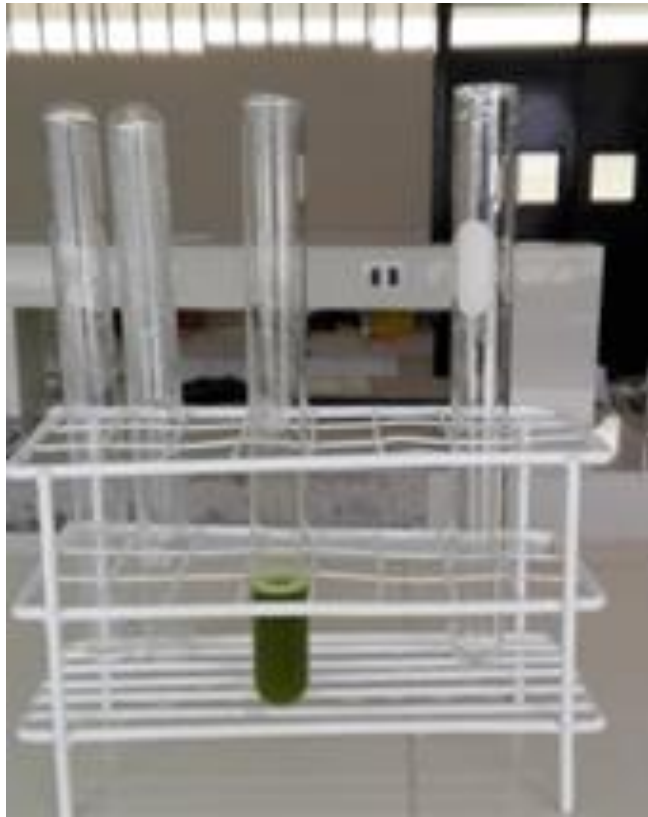


**Molienda del material vegetal
Melissa officinalis L**

Anexo 9. Obtención del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* L



**Filtración del extracto etanólico
Melissa officinalis L**



**Extracto etanólico de hojas de
Melissa officinalis L**

Anexo 10. Ensayo del efecto antibacteriano del extracto etanolito de las hojas de *Melissa officinalis* L





**Pesado del medio de cultivo
Agar Mueller-Hinton**





Preparación de medio de cultivo



Medios de cultivo



Autoclavado de los medios de cultivo



Inoculación







Lectura del diámetro de los halos de inhibición

11. Ficha de Registro de resultados de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Melissa Officinalis* L a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* por el método de difusión de disco.

ESPECIE BACTERIANA : STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Concentraciones del extracto	:	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).		13	11	09
Placa 2 en (mm).		14	12	10
Placa 3 en (mm).		13	11	09
Promedio		13	11	09

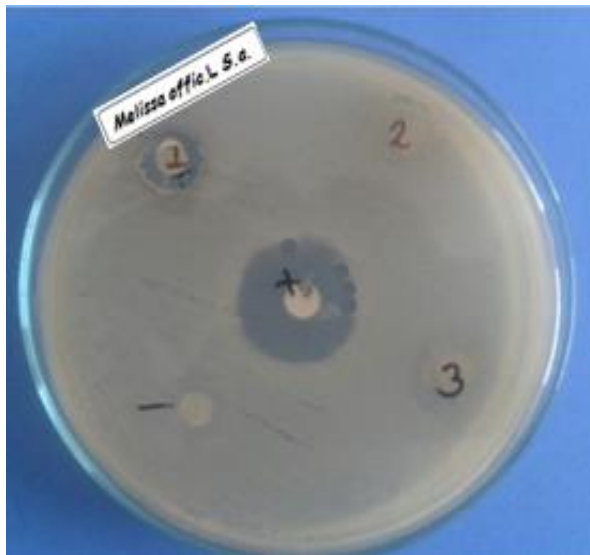
Anexo 12. Ficha de Registro de resultados de actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Melissa Officinalis* L a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* por el método de difusión de disco..

ESPECIE BACTERIANA : *ESCHERICHIA COLI*

Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).	20	15	13
Placa 2 en (mm).	21	16	14
Placa 3 en (mm).	20	15	13
Promedio	20	15	13

Anexo 13. Halos de inhibición de crecimiento de las bacterias de estudio

Halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus*



Halos de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli*

