



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

**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *IN VITRO* DE LA MEZCLA DE  
ACEITES ESENCIALES DE *Melissa officinalis* L.  
(TORONJIL) Y *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) FRENTE  
A *Candida albicans* ATCC 10231**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**AUTORES:**

**Bach. OLANO PIZANGO, LISSETH BEATRIZ**

<https://orcid.org/0000-0002-1867-5810>

**Bach. TEJADA AGUILAR, FANNY YOVANNY**

<https://orcid.org/0000-0002-9257-9931>

**ASESOR:**

**Mg. PALOMINO PACHECO, MIRIAM**

<https://orcid.org/0000-0002-0427-7766>

**LIMA – PERÚ**

**2022**

## DEDICATORIA

A mi madre Beatriz por su apoyo en todos los aspectos de mi vida para poder alcanzar mis estudios superiores.

A mi padre Segundo por sus sabios consejos que me guiaron para realizar mi carrera.

Olano Pizango, Lisseth Beatriz

Dedico esta tesis a Dios porque siempre me brinda salud, sabiduría, fortaleza e ilumina mi camino para alcanzar mis metas; a mis padres, esposo e hija porque son el motor que me impulsan a seguir adelante.

Tejada Aguilar, Fanny Yovanny

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por darnos vida, salud y permitir que hayamos alcanzado este sueño de culminar exitosamente esta maravillosa carrera profesional de Químico Farmacéutico. También agradecemos a nuestros padres por su apoyo incondicional en todo este proceso para hacer realidad esta meta.

Finalmente, agradecemos infinitamente a nuestra asesora de tesis Mg. Palomino Pacheco, Miriam, por haber brindado su capacidad profesional, docente y conocimiento científico en el desarrollo de esta tesis.

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE ANEXOS .....	vi
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	6
2.2 Población muestra y muestreo	6
2.3 Variables de investigación	7
2.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	7
2.5 Plan metodológico para la recolección de datos	8
2.6 Procesamiento del análisis estadístico	10
2.7 Aspectos éticos	10
III. RESULTADOS .....	11
IV. DISCUSIÓN.....	18
4.1 Discusión	18
4.2 Conclusiones	22
4.3 Recomendaciones	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
ANEXOS .....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis estadístico de los grupos experimentales .....	11
Tabla 2. Prueba de distribución normal para cada grupo de tratamientos .....	13
Tabla 3. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene).....	14
Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA).....	15
Tabla 5. Análisis por subgrupos homogéneos mediante la prueba de Tukey .....	16
Tabla 6. Sensibilidad antifúngica según la escala de Duraffourd .....	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Actividad antimicótica in vitro de los aceites de <i>Origanum vulgare</i> L., <i>Melissa officinalis</i> L. y su efecto sinérgico frente a <i>Candida albicans</i> .....	12
Figura: 2. Selección de las especies vegetales de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) y <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) .....	37
Figura: 3. Instalación del equipo de destilación de arrastre por vapor .....	38
Figura: 4. Obtención de los aceites esenciales .....	38
Figura: 5. Activación de la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 .....	39
Figura: 6. Preparación del inóculo: dilución de la carga micótica .....	39
Figura: 7. Inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 a $1.5 \times 10^8$ UFC .....	40
Figura: 8. Sembrado en placa .....	40
Figura: 9. Aplicación de los aceites esenciales .....	41
Figura: 10. Incubación de cultivos de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 .....	42
Figura: 11. Actividad antimicótica y halos de inhibición.....	42

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	28
Anexo B. Matriz de consistencia .....	30
Anexo C. Operacionalización de las variables .....	32
Anexo D. Descripción taxonómica de la especie vegetal .....	33
Anexo E. Certificado de análisis de la especie microbiológica .....	35
Anexo F. Evidencias del trabajo de campo .....	37

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la actividad antimicótica de la mezcla de los aceites esenciales de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) frente *Candida albicans* ATCC 10231.

**Metodología:** Presenta un enfoque cuantitativo, de diseño experimental y tipo prospectivo y transversal, la población de estudio fue *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Origanum vulgare* L. (orégano) obtenidas en el departamento de Cajamarca, a partir de las hojas de estas se obtuvo el aceite esencial mediante la técnica de arrastre con vapor de agua, el efecto antimicótico se determinó mediante el método de difusión en pozo en placas con *Candida albicans*.

**Resultados:** Los halos de inhibición sobre *Candida albicans* fueron de 17,94 $\pm$ 0,35mm; 20,64  $\pm$ 0,44mm y 23,37  $\pm$ 0,28mm; para el aceite de *Origanum vulgare* L. al 50%, 75% y 100% respectivamente; el aceite de *Melissa officinalis* L. obtuvo halos de inhibición de 38,29 $\pm$ 0,36mm; 43,33 $\pm$ 0,47mm y 59,67 $\pm$ 0,26mm para las concentraciones del 50%, 75% y 100% respectivamente, el efecto sinérgico entre ambos aceites evidenció halos de inhibición de 19,89 $\pm$ 0,37mm; 34,93 $\pm$ 0,34mm y 40,47 $\pm$ 0,37mm.

**Conclusiones:** Los aceites esenciales de hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) presentan actividad antimicótica, pero la mezcla de estos no presenta actividad sinérgica frente *Candida albicans* ATCC 10231.

**Palabras Claves:** *Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L. *Candida albicans*, aceite esencial, antimicótico.



## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the antifungal activity of the mixture of essential oils from the leaves of *Melissa officinalis* L. (Less Balm) and *Origanum vulgare* L. (Oregano) against *Candida albicans* ATCC 10231.

**Methodology:** Presents a quantitative approach, experimental design and prospective and cross-sectional type, the study population was *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Origanum vulgare* L. (oregano) obtained in the department of Cajamarca, from the leaves of these the essential oil was obtained by the water vapor dragging technique, the antifungal effect was determined by the well diffusion method in plates with *Candida albicans*.

**Results:** The inhibition halos on *Candida albicans* were 17.94+0.35mm; 20.64+0.44mm and 23.37 +0.28mm; for *Origanum vulgare* L. oil at 50%, 75% and 100% respectively; *Melissa officinalis* L. oil obtained inhibition halos of 38.29+0.36mm; 43.33+0.47mm and 59.67+0.26mm for concentrations of 50%, 75% and 100% respectively, the synergistic effect between both oils showed inhibition halos of 19.89+0.37mm; 34.93+0.34mm and 40.47+0.37mm.

**Conclusions:** The mixture of essential oils from *Melissa officinalis* L. (Less Balm) and *Origanum vulgare* L. (Oregano) leaves do not present synergistic antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231

**Keywords:** *Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L. *Candida albicans*, essential oil, antifungal.

## I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una micosis de distribución mundial que forma la cuarta parte de las infecciones superficiales, siendo *Candida albicans* la que más afecta al ser humano. Estas levaduras se adhieren fácilmente al epitelio cuando hay deficiencia en la inmunidad celular y se genera una fagocitosis inadecuada. Permitiéndole ingresar a las capas superficiales del estrato córneo donde se descaman las células, generalmente en la porción viva de la epidermis<sup>1</sup>.

Cada año a nivel mundial se valora que más de 300 millones de la población humana de todos los grupos etarios padecen de una infección micótica grave<sup>2</sup>. Debido a la alta recurrencia de estas infecciones por consecuencia de *Candida spp.* es primordial hacer un diagnóstico temprano para el inicio de una terapia oportuna, ya que tal microorganismo genera resistencia a medicamentos de uso convencional en la terapia para combatir la candidiasis<sup>3</sup>.

En Perú, se realizó un estudio en una población con VIH/SIDA, el cual tuvo una cifra aproximada donde 581 174 de pacientes tuvieron episodios de infecciones por hongos, donde 1557 personas pertenecieron a candidemia y 1621 casos a aspergilosis invasiva. Estos tipos de infecciones se les conoce como oportunistas y se dan en su mayoría en centros hospitalarios, siendo el género *Candida* el que ocupa el 80% como patógeno principal causante de dichas infecciones<sup>4</sup>.

Las plantas medicinales conforman una clasificación de metabolitos secundarios con una composición variada (compuestos bioactivos), razón por la cual algunos autores los señalan como una fuente para la elaboración de nuevos fármacos antimicrobianos<sup>5</sup>. Los aceites esenciales, representan un tema de interés científico en la actualidad, con estudios minuciosos que indican que varios de estos compuestos aislados disponen de una variedad de actividades. Siendo así que reciben mucha atención por sus propiedades antimicrobianas contra diversos tipos de bacterias y hongos<sup>6</sup>.

Podemos definir como agente antimicótico aquella sustancia con capacidad para provocar una disfunción en la estructura interna de un hongo, que imposibilita su crecimiento, cambiando su variabilidad o funciones de sobrevivencia, esto se puede dar de manera directa o indirecta, favoreciendo a los sistemas de defensa del huésped<sup>7</sup>.

Los aceites extraídos de plantas están conformados por elementos aromáticos de forma natural que emana una fragancia agradable de sus flores, hojas y otras partes de las plantas. En general, constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. A nivel farmacológico, poseen características muy variadas debido a la variabilidad química de sus compuestos. Algunos estudios han informado que los aceites presentan efectividad al ser expuestos a hongos (*Candida albicans*) responsables de micosis en el hombre<sup>8</sup>.

#### Antecedentes internacionales

Abdel W., *et al.* (2019), en su artículo tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antimicrobiana del extracto *Melissa officinalis* L. sobre microorganismos patógenos humanos y oportunistas como *Candida albicans*. Después de haber realizado los procedimientos se llegó a concluir que el extracto de toronjil mostró actividad antimicrobiana al ser expuesto con *Cándida albicans*, *Cándida krusei*, *Cándida glabrata* con un CMI de 0,30 – 345,10 ug/ml; así mismo, contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con CMI que oscilaron entre 1,65 y 191,40 µg/ml, esto debido a la presencia de metabolitos antimicrobianos, siendo lo más importante el metilcommate A, el ácido palmítico y el fitol<sup>9</sup>.

Moreno P., *et al.* (2018), realizaron el estudio cuyo objetivo consistió en determinar la inhibición del crecimiento de *E. Coli*, Aerobios Mesófilos Totales y Mohos a través de la formulación y aplicación de un gel antibacterial elaborado a base de aceite esencial de orégano y proteína de suero de leche aislada. En los resultados se mostró que el gel antibacteriano en una concentración del 16.66% de aceite de

orégano inhibe totalmente el crecimiento de mohos y levaduras y en una concentración del 26.53% de aceite de orégano inhibe *E. coli* y mesófilos totales<sup>10</sup>.

Oniga L., *et al.* (2018), en su investigación cuyo objetivo de estudio fue ejecutar una marcha fitoquímica del *Origanum vulgare L.* y hacer una reseña de sus componentes fenólicos principales. Para la marcha fitoquímica se utilizó el equipo HPLC-MS y la susceptibilidad antimicrobiana se determinó por la metodología de Kirby-Bauer, a través de un extracto con las hojas del orégano. La marcha fitoquímica registró en grandes cantidades compuestos como ácido rosmarínico y ácido clorogénico, flavonoides y con respecto al efecto antimicrobiano *Salmonella enteritidis* y *Aspergillus niger* fueron sensibles al extracto de orégano<sup>11</sup>.

#### Antecedentes nacionales

Pérez. P., *et al.* (2020), realizaron una investigación con el objetivo de determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) frente a los microorganismos de *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*. Los resultados obtenidos mostraron que el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare L.* (Orégano) en concentraciones del 25%, 50% y 100% formaron como promedio halos de 8.86, 10.24 y 15.82mm frente *Candida albicans* ATCC 10232<sup>12</sup>.

Colpa M., (2017), en su trabajo de investigación el cual obtuvo como objetivo determinar el efecto inhibitor del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* y *Mentha piperita* comparado con la nistatina frente a cepas de *Candida albicans*. En los resultados se obtuvo que el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* a la concentración del 100% dentro de las 24 horas formó un halo entre 22.30mm el que extendió su tamaño a 45.73mm a las 48 horas<sup>13</sup>.

Villavicencio J., *et al.* (2017), en su estudio realizado cuyo objetivo fue evaluar el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare L.*, sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 1023, en el cual determinaron su efecto antimicótico haciendo uso del método difusión en disco. Obtuvieron como resultado gran efectividad de todos los aceites esenciales en una concentración mayor al 12.5%<sup>14</sup>.

La resistencia de *Cándida sp.* especialmente *Candida albicans* representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones que se caracterizan, a su vez, por una alta morbimortalidad<sup>14</sup>.

El aumento de las infecciones oportunistas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos y debido al uso indiscriminado de los antimicóticos usualmente utilizados, ha generado el interés en investigaciones dirigidas a los agentes fitoterapéuticos por las mínimas reacciones farmacológicas que presenta, teniendo incluso mayor potencial farmacológico que los productos de origen sintético<sup>14</sup>.

Por tal motivo, además de considerar como gran problema mundial la resistencia a los antimicóticos, que viene en aumento en todo el mundo a niveles peligrosos; apareciendo y propagándose nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la efectividad para tratar las enfermedades infecciosas comunes, haciéndose más difíciles y hasta imposible de tratar a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia<sup>24</sup>. El presente trabajo de investigación pretende demostrar la efectividad antimicótica de la mezcla de los aceites esenciales de *Origanum vulgare L.* y *Melissa officinalis L.* con la finalidad de aportar de manera científica en el área de la fitomedicina debido a que el aceite esencial de dichas plantas como una alternativa atractiva en el tratamiento contra infecciones emergentes como la micosis causada especialmente por *Candida albicans*.

Así mismo se realizará un aporte a la comunidad ofreciendo información científica sobre las bondades del aceite esencial el cual significa una alternativa económica y de fácil acceso para la población que no cuenta con suficientes recursos económicos para acceder a un determinado tratamiento médico.

El objetivo general fue evaluar la actividad antimicótica de la mezcla de los aceites esenciales de las hojas de *Melissa officinalis L.* (Toronjil) y *Origanum vulgare L.* (Orégano) frente *Cándida albicans* ATCC 10231.

La hipótesis general declara que la mezcla de los aceites esenciales de hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) presentan actividad antimicótica frente *Cándida albicans* ATCC 10231.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Enfoque y diseño de la investigación

El presente trabajo está clasificado como un enfoque de tipo cuantitativo porque las variables en estudio reflejarán datos cuantificables que serán analizados estadísticamente.

Así mismo, presenta un diseño experimental, en el sentido que el investigador manipuló deliberadamente las variables en estudio para determinar la relación de causa – efecto.

El tipo de estudio es prospectivo porque los investigadores observarán directamente el evento en investigación. Y transversal porque se estudiará la relación de las dos variables en un solo momento en el tiempo.

### 2.2 Población muestra y muestreo

**Población:** La población estuvo constituida por 10 kg de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y 10kg *Origanum vulgare* L. (orégano) recolectada del CPM Huambocancha distrito de Cajamarca, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca. Dicha población se considera finita.

**Muestra:** La muestra estuvo conformada por 5 Kg, de hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y 5 kg de *Origanum vulgare* L. (orégano) de las cuales se obtuvo los aceites esenciales.

**Muestreo:** La recolección de la muestra se realizó mediante un muestreo no probabilístico el cual se realizó por conveniencia.

**Criterios de Inclusión:** Las hojas seleccionadas deben ser recolectadas directamente de la planta, no contener signos de estar en mal estado o contaminadas, deben ser frescas, por lo tanto, deben ser recolectadas directamente de la planta.

**Criterios de exclusión:** No corresponden a la muestra de estudios aquellas muestras que no correspondan a la especie en estudio, sean adquiridas en mercados o hayan sido recolectadas en lugares diferentes a la zona de estudio.

Con respecto al tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

### 2.3 Variables de investigación

Las variables de investigación serán los aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Origanum vulgare* L. (orégano) como variables independientes y la actividad antimicótica contra *Candida albicans* como variable dependiente. Según la naturaleza del estudio las variables son cuantitativas con escala de medición de razón.

**Definición conceptual:** mezcla de sustancias aromáticas producidas por muchas plantas<sup>15</sup>.

**Definición operacional:** Se obtuvo aceite esencial mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor de las hojas de las especies vegetales de *Melissa officinalis* L. (toronjil) *Origanum vulgare* L. (orégano)<sup>17</sup>.

**Definición conceptual:** Compuesto con capacidad de frenar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso actuar matándolos<sup>16</sup>.

**Definición operacional:** los halos de inhibición formados al exponer los aceites esenciales con cepas de *Candida albicans* serán medidos según el diámetro formado<sup>17</sup>.

### 2.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

La técnica empleada para la obtención de los aceites esenciales fue la destilación por arrastre con vapor.

La técnica a emplear para el análisis microbiológico fue la de Difusión en pozo de agar con posterior medida del halo de inhibición formado alrededor del pozo.



En cuanto al instrumento que se empleó para la recolección de datos fue el vernier digital y tabla de registro de datos.

## **2.5 Plan metodológico para la recolección de datos**

### **Recolección de la muestra vegetal**

Las muestras vegetales fueron recolectadas del CPM Huambocancha distrito de Cajamarca, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca, las cuales fueron seleccionadas según los criterios de inclusión y exclusión descritos en la metodología, se recolectaron 5 kilogramos de ambas plantas aplicando los criterios de inclusión y exclusión para su selección y recolección<sup>14</sup>.

Una vez recolectadas las plantas se procedió a lavar las hojas con abundante agua, luego se desinfectaron con lejía al 0.5% colocando en una tina por 10 minutos para posteriormente nuevamente lavarlas con abundante agua<sup>14</sup>.

Se colocaron las muestras sobre una mesa, extendidas y frente a una corriente de aire directa para facilitar el secado de las muestras por 24 horas, luego de transcurrido este tiempo se colocaron en una estufa por 8 horas para su secado completo, luego del procedimiento se retiraron los tallos de las hojas y se procedió a triturar manualmente las hojas<sup>14</sup>.

### **Preparación del aceite de orégano y toronjil**

Se instaló el equipo de destilación con arrastre por vapor asegurando las líneas de agua del refrigerante y se colocaron 500 gr. de las hojas secas y trituradas por cada vez hasta completar los 5 kg de hojas. Se encendió el equipo y observó el momento en que la temperatura llegue a 100°C, desde ese momento se contaron 5 horas y se cambió la muestra para iniciar nuevamente el proceso. Se recolectó el destilado a la salida del refrigerante en una pera de bromo. Una vez observada la formación de 2

capas, se decantó el aceite para posteriormente mediante diluciones con dimetilsulfoxido (DMS) preparar las concentraciones del 50% y 75%<sup>17</sup>.

### **Reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231**

La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 fue adquirida a través de un laboratorio de microbiología con su certificado de análisis de la cepa correspondiente. Para la reactivación de la cepa se procedió de acuerdo a la guía establecida por el proveedor de la cepa, según ficha técnica, en tal sentido, la cepa estuvo durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se apertura el sachet que contenía el liofilizado, luego se reconstituye éste con agua estéril y realizaron sembrados con asa bacteriológica en agar Sabouraud, se llevó a incubación a 37°C por 24 horas, luego se tomaron con un hisopo dos a 3 colonias y se diluyeron en 10 ml de agua destilada y prepararon diluciones seriadas hasta llegar a la escala de 0.5 de Mc Farland la cual se consideró el inóculo de trabajo<sup>9</sup>.

### **Evaluación de la actividad antimicótica<sup>18</sup>:**

- Se tomó con un hisopo la suspensión del inóculo de trabajo, se dejó escurrir por las paredes del tubo y luego se realizaron siembras en las placas con agar Mueller Hinton.
- Se realizó un pocito por cada placa donde se colocó 30uL de las diferentes concentraciones al 50%, 75% y 100%, tanto para *Melissa officinalis*. L. (toronjil) y *Origanum vulgare* L. (orégano).
- En otras placas se realizó un pocito en las placas y colocó 15 uL del aceite de *Melissa officinalis*. L. (toronjil) más 15 uL del aceite de *Origanum vulgare* L. (orégano), del mismo modo, a las concentraciones de trabajo respectivamente.

- Posteriormente fueron incubadas por un periodo de tiempo de 24 horas a 37°C, y luego de este tiempo se observaron la formación de halos de inhibición.
- Se procedió a medir el tamaño del halo de inhibición formado y registrar en la ficha de recolección de datos.

## **2.6 Procesamiento del análisis estadístico**

El análisis estadístico de la presente investigación buscó analizar los datos para obtener mediante pruebas de normalidad e inferenciales la aceptación o rechazo de la hipótesis alterna, en ese sentido se realizó la prueba de Anova y Tukey con un alfa de 0,05.

## **2.7 Aspectos éticos**

Se tomó en consideración las normas de Bioseguridad en laboratorios de ensayo; así mismo, durante el desarrollo de la tesis se tuvo extremo cuidado en no contaminar el medio ambiente, no causar daño a los participantes; en ese sentido, se cumplieron con lo establecido en las guías de manuales de bioseguridad y de manejo de residuo sólido, así mismo, se mantuvo el principio de veracidad y transparencia en los resultados obtenidos no favoreciendo de ninguna manera a alguna empresa o institución, por vínculos o nexos que puedan afectar el correcto desarrollo trabajo de investigación<sup>19</sup>.

### III. RESULTADOS

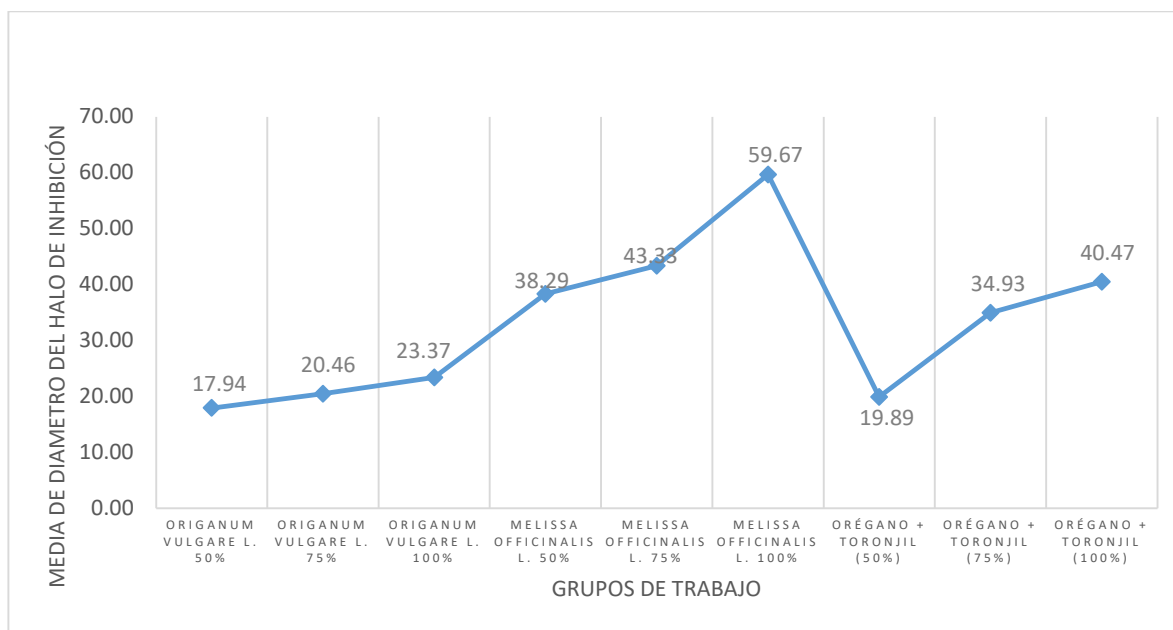
**Tabla 1. Análisis estadístico de los grupos experimentales**

	Diámetro del halo de inhibición							
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite Superior	Límite Inferior		
Origanum vulgare L. 50%	15	17,94	0,35	0,09	17,75	18,14	17,25	18,48
Origanum vulgare L. 75%	15	20,46	0,44	0,11	20,22	20,70	19,88	21,05
Origanum vulgare L. 100%	15	23,37	0,28	0,07	23,22	23,53	22,97	23,99
Melissa officinalis L. 50%	15	38,29	0,36	0,09	38,09	38,49	37,75	38,86
Melissa officinalis L. 75%	15	43,33	0,47	0,12	43,07	43,59	42,63	44,12
Melissa officinalis L. 100%	15	59,67	0,26	0,07	59,52	59,81	59,36	60,15
Orégano + Toronjil (50%)	15	19,89	0,37	0,09	19,69	20,09	19,32	20,63
Orégano + Toronjil (75%)	15	34,93	0,34	0,09	34,75	35,12	34,41	35,59
Orégano + Toronjil (100%)	15	40,47	0,37	0,10	40,27	40,68	39,84	41,27

La tabla 1 muestra el análisis estadístico descriptivo de los datos recolectados para cada grupo de trabajo con respecto a la media (M) que nos muestra el promedio de las mediciones de los halos de inhibición para cada grupo de trabajo, la desviación (DS) y error estándar (ES) que muestran el grado de variación o precisión en la recolección o medición de los datos obtenidos; así como también los límites de confianza sobre los cuales varían los datos con un nivel de confianza del 95%. Los valores promedio de los halos de inhibición obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar por parte los grupos de tratamientos sobre *Candida albicans* fueron de 17,94±0,35mm; 20,64 ±0,44mm y 23,37 ±0,28mm para el aceite de

*Origanum vulgare* L. al 50%, 75% y 100% respectivamente; el aceite de *Melissa officinalis* L. obtuvo halos de inhibición de 38,29±0,36mm; 43,33±0,47mm y 59,67±0,26mm para las concentraciones del 50%, 75% y 100% respectivamente; el efecto sinérgico entre ambos aceites evidenció halos de inhibición de 19,89±0,37mm; 34,93±0,34mm y 40,47±0,37mm.

Figura 1. Actividad antimicótica in vitro de los aceites de *Origanum vulgare* L., *Melissa officinalis* L. y su efecto sinérgico frente a *Candida albicans*



#### Interpretación:

En la figura 1, se muestra el comportamiento del efecto antifúngico de los grupos de tratamiento y su efecto sinérgico frente a *Candida albicans*. Se observa halos de inhibición de 17.94mm, 20.46mm y 23.37mm para las concentraciones de 50%, 75% y 100% del aceite de *Origanum vulgare* L.; halos de inhibición de 38.29mm, 43.33mm y 59.67mm para las concentraciones de 50%, 75% y 100% del aceite de *Melissa officinalis* L.; y halos de inhibición de 19.89mm, 34.93mm y 40.47mm para la mezcla de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. y *Melissa officinalis* L. Así mismo, se observa mayor efecto antimicótico en el aceite de *Melissa officinalis* L.; por otro lado, no se evidencia un efecto sinérgico frente a *Candida albicans* al combinar

estos dos aceites, encontrándose halos de inhibición menor que los encontrados con el aceite de *Melissa officinalis* L. pero superior a los encontrados por parte del aceite de *Origanum vulgare* L. a diferentes concentraciones.

**Tabla 2. Prueba de distribución normal para cada grupo de tratamientos**

Grupos de trabajo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	df	Sig.	Estadístico	df	Sig.	
Diámetro del halo de inhibición (mm)	Origanum vulgare L. 50%	0,116	15	,200*	0,962	15	0,731
	Origanum vulgare L. 75%	0,190	15	0,152	0,888	15	0,062
	Origanum vulgare L. 100%	0,193	15	0,138	0,914	15	0,157
	Melissa officinalis L. 50%	0,140	15	,200*	0,932	15	0,293
	Melissa officinalis L. 75%	0,108	15	,200*	0,955	15	0,604
	Melissa officinalis L. 100%	0,187	15	0,164	0,895	15	0,081
	Orégano + Toronjil (50%)	0,104	15	,200*	0,974	15	0,916
	Orégano + Toronjil (75%)	0,127	15	,200*	0,958	15	0,654
	Orégano + Toronjil (100%)	0,239	15	0,021	0,929	15	0,261

\*. Este es un límite inferior del verdadero significado.

a. Corrección de la significancia de Lilliefors

**Fuente: SPSS ver. 26**

En la tabla 2 se realizó el análisis estadístico para la determinación del comportamiento normal de los grupos de datos mediante dos pruebas, la prueba de Kolmogorov Smirnov y la prueba de Shapiro Wilk, en ambas pruebas se pudo determinar niveles de significancia superiores al nivel alfa de 0.05 establecido en el estudio, por lo tanto, se confirma que todos los grupos de datos representan una distribución normal o comportamiento Gaussiano.

**Tabla 3. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)**

		<b>Estadístico de Levene</b>	<b>d f</b>	<b>df2</b>	<b>p-valor</b>
<b>Diámetro del halo de inhibición</b>	Basado en la media	1,452	8	126	0,182
	Basado en la mediana	1,282	8	126	0,259
	Basado en la mediana con ajuste de df	1,282	8	116,2 51	0,260
	Basado en la media recortada	1,447	8	126	0,183

**Fuente: SPSS ver. 26**

En la tabla 3, del mismo modo se realizó un análisis estadístico mediante el software SPSS versión 26 para confirmar la distribución homogénea de las varianzas de cada grupo mediante la prueba de Levene, luego del análisis se obtuvo valores de significancia superior al valor  $\alpha=0.05$ ; por lo tanto, se confirma que los grupos de datos analizados presentan distribución homogénea de sus varianzas.

### **CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS:**

H<sub>1</sub>: La mezcla de los aceites esenciales de hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) presentan actividad antimicótica frente *Cándida albicans* ATCC 10231

H<sub>0</sub>: La mezcla de los aceites esenciales de hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) no presentan actividad antimicótica sinérgica frente *Candida albicans* ATCC 10231.

**Decisión:** Por lo tanto, se rechaza la hipótesis H<sub>1</sub> y se acepta la H<sub>0</sub> que confirma la mezcla de los aceites esenciales de hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) no presentan actividad antimicótica sinérgica frente *Cándida albicans* ATCC 10231.

**Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA)**

Diámetro del halo de inhibición

	Suma de cuadrados	df	Media al cuadrado	F	p-valor.
Entre grupos	23306,269	8	2913,284	21812,528	0,000
Dentro de los grupos	16,829	126	0,134		
Total	23323,097	134			

**Fuente: SPSS ver. 26**

En la tabla 4, se muestra la comparación de los grupos de datos en función de su media mediante la prueba estadística paramétrica de ANOVA, esta prueba permite evidenciar si existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de cada grupo de datos analizados, luego del análisis se observa un p-valor superior al nivel de significancia del estudio (0.05); por lo tanto, se confirma que existe al menos un grupo estadísticamente diferente entre los grupos de los datos analizados.



**Tabla 5. Análisis por subgrupos homogéneos mediante la prueba de Tukey**

Diámetro del halo de inhibición (mm)		Tukey HSD <sup>a</sup>										
Grupos de trabajo	de	N	Subset for alpha = 0.05									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Origanum vulgare L.	50%	15	17,94									
Orégano+ Toronjil	(50%)	15		19,89								
Origanum vulgare L.	75%	15			20,46							
Origanum vulgare L.	100%	15				23,37						
Orégano + Toronjil	(75%)	15					34,93					
Melissa officinalis L.	50%	15						38,29				
Orégano + Toronjil	(100%)	15							40,47			
Melissa officinalis L.	75%	15								43,33		
Melissa officinalis L.	100%	15									59,67	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15,000.

**Fuente: SPSS ver. 26**

La tabla 5, muestra el análisis complementario al análisis de la prueba de ANOVA, dicho análisis se realizó mediante la prueba de TUKEY que nos permite determinar de manera gráfica mediante el análisis de las medias de los grupos si estas se corresponden o son significativamente diferentes, el análisis de los datos nos muestra que todos los grupos de los datos presentan valores promedio diferentes entre estos, o lo que es decir que la actividad antimicótica de cada grupo de tratamientos es estadísticamente diferente, presentando el menor efecto el aceite de *Origanum vulgare* L. al 50% y el mayor efecto el aceite de *Melissa officinalis* L. al 100% con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 6. Sensibilidad antifúngica según la escala de Duraffourd**

<b>Tratamiento</b>	<b>Sensibilidad nula ≤ 8 mm</b>	<b>Sensible 8–14 mm</b>	<b>Muy sensible 15-20 mm</b>	<b>Altamente sensible &gt; 20 mm</b>
Origanum vulgare L. 50%			17,94	
Orégano + Toronjil (50%)			19,89	
Origanum vulgare L. 75%				20,46
Origanum vulgare L. 100%				23,37
Orégano + Toronjil (75%)				34,93
Melissa officinalis L. 50%				38,29
Orégano + Toronjil (100%)				40,47
Melissa officinalis L. 75%				43,33
Melissa officinalis L. 100%				59,67

En la tabla 6, muestra el análisis comparativo de la sensibilidad de *Candida albicans* a los aceites y su mezcla mediante la clasificación de la escala de Duraffourd, donde se observa que *Candida albicans* es muy sensible al aceite de *Origanum vulgare* L. al 50% y a la mezcla de los aceites de orégano y toronjil al 50%; y es altamente sensible a los demás aceites analizados.

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1 Discusión

Los aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Origanum vulgare* L. (orégano) han sido estudiados en la presente investigación para determinar su actividad antimicótica *in vitro* contra *Candida albicans* ATCC 10231, ya que existen varios estudios que han demostrado sus propiedades antimicrobianas, los resultados obtenidos en la investigación se discuten a continuación.

Luego de extraer los aceites esenciales mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, se determinó la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. Mediante el método de difusión en pozo frente a *Candida albicans* ATCC 10231, se obtuvieron los valores de los halos de inhibición para el aceite de *Origanum vulgare* L. 17,94 $\pm$ 0,35mm; 20,64  $\pm$ 0,44mm y 23,37  $\pm$ 0,28mm para las concentraciones de trabajo de 50%, 75% y 100% respectivamente, dichos valores fueron obtenidos mediante el análisis estadístico mediante el uso del software estadístico SPSS versión 26 con un valor de significancia alfa del 0.05.

Un estudio similar fue el de Requejo F., *et al.* (2021)<sup>20</sup>, empleando aceite esencial de *Origanum vulgare* L. y resina de *Copaifera paupera* L. sobre *Candida albicans* ATCC 10231 obtuvieron como resultado que el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. a concentraciones de 50%, 75% y 100% formaron como promedio halos de 25 mm + 0.40, 31,2 mm + 0.32 y 33,2 mm + 0.31 demostrando que el aceite tiene un efecto antimicótico sobre *Candida albicans*, resultado similar a nuestro estudio al comparar los halos de inhibición obtenidos de 17,94 $\pm$ 0,35mm; 20,64  $\pm$ 0,44mm y 23,37  $\pm$ 0,28mm para el aceite de *Origanum vulgare* L. al 50%, 75% y 100% respectivamente.

Del mismo modo Pérez. P., *et al.* (2020)<sup>12</sup>, evaluaron la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare L.* (Orégano) frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* encontraron que el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare L.* a concentraciones del 25, 50 y 100% formaron como promedio halos de 8.86, 10.24 y 15.82mm frente a *Candida albicans* ATCC 10232, comparando dichos resultados con los de nuestro estudio, se puede evidenciar que nuestros resultados según los halos inhibición muestran mejor actividad antimicótica mostrando halos de 17,94 $\pm$ 0,35mm; 20,64  $\pm$ 0,44mm y 23,37  $\pm$ 0,28mm para el aceite de *Origanum vulgare L.* al 50%, 75% y 100% respectivamente.

Por su parte Colpa M., (2017)<sup>13</sup>, determinó el efecto inhibidor del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* y *Mentha piperita* en comparación a la nistatina frente a cepas de *Candida albicans* demostrando efecto inhibitorio con halos de inhibición para el aceite de *Origanum vulgare L.* al 100% halos de 22.30mm.

De manera similar los resultados encontrados en este estudio se corroboran con los obtenidos para el aceite de *Origanum vulgare L.* al 100% donde se obtuvo halos de inhibición de 23,37  $\pm$ 0,28mm.

Por otro lado, Oniga L., *et al.* (2018)<sup>11</sup>, determinaron mediante una marcha fitoquímica del extracto de hojas de *Origanum vulgare L.* grandes cantidades compuestos como ácido rosmarínico y ácido clorogénico, flavonoides; así mismo, se observó la presencia de efecto antimicrobiano contra *Salmonella enteritidis* y *Aspergillus niger*, el análisis estadístico consistió en un estudio comparativo del tamaño de los halos de inhibición y valores de desviación estándar.

Los metabolitos secundarios que presenta *Origanum vulgare L.* como ácido rosmarínico y ácido clorogénico le confieren propiedades tanto antimicóticas como antibacterianas, corroborando los resultados obtenidos en nuestro estudio contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Por otro lado, la determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. a diferentes concentraciones de 50%, 75% y 100% obtuvo halos de inhibición de  $38,29 \pm 0,36$  mm;  $43,33 \pm 0,47$  mm y  $59,67 \pm 0,26$  mm respectivamente contra *Candida albicans* ATCC 10231, clasificando como altamente sensible este microorganismo al aceite esencial de *Melissa officinalis* L, según la escala de Duraffourd.

En un estudio similar Chapoñan R, *et al.* (2021)<sup>21</sup>, evaluaron el efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. frente a *Candida albicans* ATCC 10231, donde encontraron como resultado que el toronjil en forma de extracto etanólico frente a *Candida albicans* mostró halos de inhibición promedio de  $11,87 + 0,31$  mm al 50% y de  $14,73 + 0,41$  mm al 100%, por otro lado, el aceite de *Melissa officinalis* L. evidenció halo de inhibición de  $47,59 + 0,32$  mm al 50% y de  $52,42 + 0,26$  mm al 100%, de manera similar los resultados encontrados en dicho estudio se corroboran con los obtenidos para el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. al 50% y 100% donde se obtuvo halos de  $43,33 \pm 0,47$  mm y  $59,67 \pm 0,26$  mm respectivamente.

Por su lado Yerren M, *et al.* (2021)<sup>22</sup>, determinaron el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. y *Origanum vulgare* L. frente a *Escherichia coli* L. reflejaron que el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. sobre *Escherichia coli* obtuvo halos promedio de  $10,36 + 0,30$  mm al 50% y de  $12,05 + 0,31$  mm al 100%; así mismo, el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. al 50% y 100% obtuvieron halos de inhibición de  $11,68 + 0,29$  mm y  $15,28 + 0,36$  mm respectivamente; el control negativo (DMS) obtuvo halo de inhibición de  $6,17 + 0,20$  mm y el control positivo (ciprofloxacino) obtuvo halo de inhibición de  $30,35 + 0,32$  mm demostrando mediante la técnica de difusión en pozo que los aceites de toronjil y orégano presentan efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* .

Los resultados encontrados en nuestro estudio demuestran la actividad antimicótica del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. al 50%, 75% y 100%

obtuvo halos de inhibición de  $38,29 \pm 0,36$  mm;  $43,33 \pm 0,47$  mm y  $59,67 \pm 0,26$  mm respectivamente contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Además de determinar el efecto de cada aceite esencial a diferentes concentraciones se evaluó su efecto sinérgico a las concentraciones de trabajo encontrando que el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. presenta mayor actividad antimicótica que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L., sin embargo, no se pudo demostrar el efecto sinérgico de estos aceites debido a que demostraron perder efectividad juntos debido a que tal vez actúan sobre el mismo mecanismo de acción sobre los receptores y hay acción competitiva entre estas sustancias sobre los receptores<sup>23</sup>.

## 4.2 Conclusiones

- La mezcla de los aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Origanum vulgare* L (Orégano) presentaron actividad antimicótica frente *Cándida albicans* ATCC 10231.
- Se determinó la actividad antimicótica del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) al 50%, 75% y 100% frente *Candida albicans* ATCC 10231 mediante la formación de halos de inhibición de 38,29 $\pm$ 0,36 mm; 43,33 $\pm$ 0,47 mm y 59,67 $\pm$ 0,26 mm respectivamente.
- Se determinó la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (Orégano) al 50%, 75%, y 100% frente *Candida albicans* ATCC 10231 mediante la formación de halos de inhibición de 17,94 $\pm$ 0,35mm; 20,64  $\pm$ 0,44mm y 23,37  $\pm$ 0,28mm respectivamente.
- No se logró demostrar el efecto antimicótico sinérgico de los aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) al 50%, 75% y 100% frente a *Cándida albicans* ATCC 10231.

### **4.3 Recomendaciones**

- Determinar los principios activos de las plantas estudiadas que brindan el efecto antimicótico mediante técnicas analíticas.
- Realizar estudios de estas plantas en formulaciones farmacéuticas y evaluar su efecto y aplicación.
- Promover el uso de las plantas medicinales en el tratamiento complementario de infecciones micóticas.
- Promover el estudio in vitro sobre plantas medicinales con efecto antimicótico y antibacteriano.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Núñez S y Jiménez M. Candidiasis. Hipoc Rev Med [Internet]. 2011 Ene [citado el 18 de octubre del 2021]; 24: 12-15. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/hipocrates/hip-2011/hip1124d.pdf>
2. Zurita J. Infecciones micóticas: esas Enfermedades Relegadas de la Salud ública. Bionatura [Internet]. 2017 [citado el 18 de octubre del 2021]; 2(3): 344-347. Disponible en: <http://revistabionatura.com/2017.02.03.2.html>
3. Pinilla G, Esteban J, Navarrete J, Muñoz L, Lindarte D, Molano J., *et al.* Herramientas para el Análisis de Mecanismos de Resistencia de *Candida albicans*. Enf Inf Microbiol [Internet]. 2018 [citado el 18 de octubre del 2021]; 38(3): 86-92. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2018/ei183e.pdf>
4. Zurita S. Situación de la Resistencia Antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública [Internet]. 2018 [citado el 19 de octubre del 2021]; 35(1):126-31. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v35n1/a19v35n1.pdf>
5. Ingaroca S, Castro A y Ramos N. Composición Química y Ensayos de Actividad Antioxidante y del Efecto Fungistático Sobre *Candida albicans* del Aceite Esencial de *Piper aduncum* L. "Mático". Rev Soc Quím Perú [Internet]. 2019 [citado el 19 de octubre del 2021]; 85(2): 268-279. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2019000200013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2019000200013&script=sci_arttext)
6. Efraín M, Castro-Alayo, Segundo G, Chávez-Quintana, Erick A, Auquiñivín-Silva., *et al.* Aceites esenciales de plantas nativas del Perú: Efecto del lugar de cultivo en las características fisicoquímicas y actividad antioxidante. Rev

- Sci. Agropecu [Internet]. 2019 [citado el 19 de octubre del 2021]; 10(4): 479–487. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v10n4/a04v10n4.pdf>
7. Valdés G. Estructura y Actividad de los Antifúngicos. Rev cubana Farm [Internet]. 2005 [citado el 22 de octubre del 2021]; 39(2): 1-1. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf>
  8. López M. Los Aceites Esenciales Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. OFFARM [Internet]. 2004 [citado el 22 de octubre del 2021]; 23(7): 88-91. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13064296>
  9. Abdel W, Fahim J, Fouad M y Kamel M. Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies *Melissa officinalis* L.. South African Journal of Botany [Internet]. 2019 [citado el 23 de octubre del 2021]; 124: 228-234. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629919303096>
  10. Moreno P y Ronquillo B. Evaluación de la inhibición del crecimiento de tres cultivos bacterianos mediante la aplicación de un gel antibacterial formulado a base de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) y proteína de suero de leche aislada [Tesis]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2018.
  11. Oniga L, Puscas C, Dumitrescu R, Kinga N, Sevastre B, Marica R., et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. Rev Molecules [Internet]. 2018 [citado el 23 de octubre del 2021]; 23(8): 2077. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222339/>
  12. Perez P y Cabrera Y. Actividad antimicótica In vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 [Tesis]. Lima: Universidad María Auxiliadora; 2021.

13. Colpa M. Evaluación de la inhibición del crecimiento de tres cultivos bacterianos mediante la aplicación de un gel antibacterial formulado a base de aceite esencial de orégano (*origanum vulgare*) y proteína de suero de leche aislada [Tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2017.
14. Villavicencio J, Moromi H, Salcedo D, Pineda M, Ramos D, Zambrano L., *et al.* Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans*. Odontol. Sanmarquina [Internet]. 2016 [citado el 23 de octubre del 2021]; 19(2): 5-8. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/12907/11528>
15. Montoya G. Aceites Esenciales Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero [Internet]. 1 ed. Colombia: Editorial Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales; 2010 [citado el 27 de octubre del 2021]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/55532/9588280264.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Cribillero R. Actividad antimicótica in vitro de una crema elaborada a base del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* “Canela” frente a *Candida albicans* [Tesis]. Chimbote: Universidad Católica los Ángeles de Chimbote; 2019.
17. Contreras S. Efecto sinérgico *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” con ciprofloxacino frente a *E. coli* ampicilino-resistente [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
18. Taroco R. Seija V. Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En: Gabriela Algorta. Temas de bacteriología y virología médica. 3<sup>ra</sup> ed. Montevideo: Facultad de medicina de la UDELAR; 2008. p. 663-671.

19. Universidad de Navarra. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. España; 2013.
20. Requejo F y Vásquez D. Efecto antimicótico “in vitro” del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” y resina de *Copaifera paupera* “copaiba” sobre *Candida albicans* ATCC 10231. [Tesis]. Lima: Universidad María Auxiliadora, 2021.
21. Chapoñan R y Chávez C. Efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. [Tesis]. Chiclayo: Universidad Roosevelt, 2021.
22. Yerren M y Salazar R. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Melissa officinalis* (toronjil) y *Origanum vulgare* (orégano) frente a cepas de *Escherichia coli*. [Tesis]. Huancayo: Universidad Roosevelt, 2021.
23. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica [Internet]. 12ed ed. Brunton L, Chabner B, Knollmann B, editores. Mc Graw Hill. México: McGraw-Hill/Interamericana; 2018. Disponible en: <https://edimeinter.com/catalogo/novedad/goodman-gilman-las-bases-farmacologicas-la-terapeutica-13a-edicion-2018/>
24. López K, Dzul K, Lugo C, Arias J y Zavala J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Rev Biomed [internet]. 2016 [citado el 25 de marzo de 2022]; 27:127-136. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2016/bio163e.pdf>

## ANEXOS

### Anexo A. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

N° de Repeticiones	<i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)			<i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil)			<i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)		
	50%	75%	100%	50%	75%	100%	50%	75%	100%
1	18,0 7	20,5 9	23,41	38,3 2	43,1 2	59,61	19,8 8	34,9 8	40,38
2	17,5 3	20,4 5	23,26	38,2 4	43,4 4	60,15	20,6 3	35,0 7	40,38
3	17,2 5	21,0 5	23,03	37,7 9	44,0 3	59,53	19,3 2	34,5 4	41,27
4	17,6 7	19,9 7	23,23	38,6 8	43,2 6	59,36	19,7 6	34,6 6	40,26
5	18,4 3	19,9 3	23,85	38,8 6	43,5 8	59,94	20,2 2	35,5 9	39,84
6	18,4 7	20,8 1	22,98	38,4 4	42,6 3	59,72	19,4 7	34,4 1	40,53
7	18,0 5	21,0 1	23,99	37,9 2	43,5 5	59,44	19,8 9	34,5 2	40,51
8	17,8 3	20,5 3	22,97	38,6 4	43,1 2	59,40	19,5 3	35,1 5	41,07

9	17,9 5	19,8 8	23,37	38,6 0	42,6 6	59,39	20,4 1	34,6 2	40,15
10	18,4 8	20,9 4	23,41	38,5 9	43,9 6	60,06	19,9 4	34,7 6	40,12
11	17,6 0	20,0 9	23,43	37,9 8	43,5 3	59,57	20,1 1	35,2 8	40,42
12	17,8 6	20,8 7	23,37	38,3 5	44,1 2	59,75	19,5 4	35,1 4	40,25
13	17,8 4	20,7 5	23,50	38,3 7	43,2 4	59,53	19,9 5	34,9 1	40,52
14	18,1 6	19,9 4	23,47	37,7 5	42,8 4	59,54	19,6 3	35,1 3	40,94
15	17,9 4	20,1 1	23,33	37,8 3	42,9 2	60,03	20,1 1	35,2 1	40,45

## Anexo B. Matriz de consistencia

Actividad antimicótica in vitro de la mezcla de aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Origanum vulgare* L. (Orégano) frente a *Cándida albicans* ATCC 10231.

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
<b>Problema General</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>Hipótesis General</b>
¿Presentará actividad antimicótica la mezcla de los aceites esenciales de hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano) frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	Evaluar la actividad antimicótica de la mezcla de los aceites esenciales de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Origanum vulgare</i> L (Orégano) frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	La mezcla de los aceites esenciales de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Origanum vulgare</i> L (Orégano) presentan actividad antimicótica frente <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.
<b>Problemas Específicos</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicas</b>
¿Poseerá actividad antimicótica el aceite esencial de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) al 50%, 75% y 100% frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.?	Determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) al 50%, 75% y 100% frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	El aceite esencial de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) al 50%, 75% y 100% presenta actividad antimicótica frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.

<p>¿Presentará actividad antimicótica el aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (Orégano) al 50%, 75% y 100% frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?</p>	<p>Evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (Orégano) al 50%, 75%, y 100% frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>	<p>El aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (Orégano) al 50%, 75% y 100% presenta actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>
<p>¿Cuál será el efecto antimicótico sinérgico de la mezcla de los aceites esenciales de <i>Melissa officinalis L.</i> (Toronjil) y <i>Origanum vulgare L</i> (Orégano) al 50%, 75% y 100% frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?</p>	<p>Demostrar el efecto antimicótico sinérgico de los aceites esenciales de <i>Melissa officinalis L.</i> (Toronjil) y <i>Origanum vulgare L</i> (Orégano) al 50%, 75% y 100% frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>	<p>Existe efecto sinérgico antimicótico entre los aceites esenciales de <i>Melissa officinalis L.</i> (toronjil) y <i>Origanum vulgare</i> (orégano) al 50%, 75% y 100% frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>



### Anexo C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	Nº DE ÍTEMS	VALOR
Aceite esencial de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)	Mezcla de sustancias aromáticas producidas por muchas plantas	Se obtendrá aceite esencial mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor de las hojas de las especies vegetales	Concentraciones	100 75 50	Ordinal	3	%
Actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i>	Capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte	Se medirán los halos de inhibición formado al exponer los aceites esenciales con cepas de <i>Candida albicans</i>	Diámetro del halo de inhibición	≤ 8mm 8mm a 14mm 15mm a 20mm > a 20mm	Ordinal	4	Nula Sensible Medio Muy sensible

## Anexo D. Descripción taxonómica de la especie vegetal

Hamilton W. Beltrán S.  
Consultor Botánico  
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María  
hamiltonbeltran@yahoo.com

### CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

El Biólogo colegiado, certifica que la planta conocida como "TORONJIL" proporcionada por los Bachilleres, Lisseth Beatriz Olano Pizango y Fanny Yovanny Tejada Aguilar, Tesistas de la Universidad "María Auxiliadora", ha sido estudiada científicamente y determinada como *Melissa officinalis* L. y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Asteridae  
Orden: Lamiales  
Familia: Lamiaceae  
Género: *Melissa*  
Especie: *Melissa officinalis* L.

Se expide la presente certificación a solicitud de los interesados para los fines que estime conveniente.

Lima, 16 diciembre 2021

  
Bigo. Hamilton Beltrán  
Hamilton W. Beltrán Santiago  
Físico - Botánico  
C. No. 2119

Hamilton W. Beltrán S.  
Consultor Botánico  
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María  
hamiltonbeltran@yahoo.com

## CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

El Biólogo colegiado, certifica que la planta conocida como "ORÉGANO" proporcionada por los Bachilleres, Lisseth Beatriz Olano Pizango y Fanny Yovanny Tejada Aguilar, Tesistas de la Universidad "María Auxiliadora", ha sido estudiada científicamente y determinada como *Origanum vulgare* L. y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino:        Plantae  
División:    Magnoliophyta  
Clase:        Magnoliopsida  
Subclase:    Astaridae  
Orden:        Lamiales  
Familia:     Lamiaceae  
Género:      *Origanum*  
Especie:     *Origanum vulgare* L.

Se expide la presente certificación a solicitud de los interesados para los fines que estime conveniente.

Lima, 16 diciembre 2021

  
Bigo. Hamilton Beltrán  
Hamilton W. Beltrán Santiago  
Finkgo - Botánico  
C. Nº 2719

## Anexo E. Certificado de análisis de la especie microbiológica



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-1006** Reference Number: ATCC® 10231™† Purity: Pure Passage from Reference: 3	<b>Expiration Date:</b> 2022/12/28 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Alexandra D Siensvad <b>Release Date:</b> 2020/11/18
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. <b>Microscopic Features:</b> Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	<b>Medium:</b> Nutrient <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF (1)	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamyospore production: positive
See attached ID System results document.	 Amanda Kupcus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p><small>*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on the certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitakill: Although the Vitakill 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.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="256 1291 467 1444">   <b>ACCREDITED</b>  <small>REFERENCE MATERIAL PRODUCER                      CERT #2603.02</small> </div> <div data-bbox="446 1444 1404 1486"> <small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark, and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="256 1522 467 1675">   <b>ACCREDITED</b>  <small>TESTING CERT #2603.01</small> </div> <div data-bbox="519 1654 889 1680"> <small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small> </div> </div>	

## 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	No Organism Identification Possible	(-)	red

### Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> 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)	<b>Low consistency:</b> 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)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Candida albicans  
 Sample Description: 0443  
 Sample ID: 443-1006  
 Sample Creation Date/Time: 2019-03-08T14:55:06.305 ADS  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A2 (+++) (A)	443-1006	Candida albicans	2.11

Comments:

n/a



## Anexo F. Evidencias del trabajo de campo

Figura: 2. Selección de las especies vegetales de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Origanum vulgare* L. (orégano)



**Figura: 3. Instalación del equipo de destilación de arrastre por vapor**



**Figura: 4. Obtención de los aceites esenciales**



**Figura: 5. Activación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231**



**Figura: 6. Preparación del inóculo: dilución de la carga micótica**





**Figura: 7. Inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 a  $1.5 \times 10^8$  UFC**



**Figura: 8. Sembrado en placa**



**Figura: 9. Aplicación de los aceites esenciales**



**Figura: 10. Incubación de cultivos de *Candida albicans* ATCC 10231**



**Figura: 11. Actividad antimicótica y halos de inhibición**

