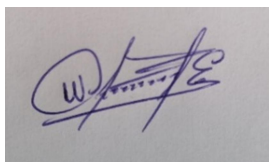


## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, wanner cueva espinal, con DNI **45996575** en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico) presentada para optar el TITULO PROFESIONAL de “Químico farmacéutico” de título “**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Melissa officinalis* L. (TORONJIL) SOBRE *Escherichia coli* ATCC 25922**”, **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

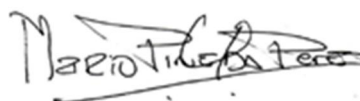
Asimismo, **DECLARO BAJO JURAMENTO** que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de DIECISÉIS PORCIENTO (16%) y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 28 días del mes de diciembre del año 2022.



---

Wanner Cueva Espinal  
DNI: 45996575



---

Mg. Neuman Mario Pineda Pérez  
DNI: 09410930

1. Apellidos y Nombres
2. DNI
3. Grado o título profesional
4. Título del trabajo de Investigación
5. Porcentaje de similitud

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, María Isabel usquiano paredes, con DNI **43851462** en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico) presentada para optar el TITULO PROFESIONAL de “Químico farmacéutico” de título “**EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Melissa officinalis* L. (TORONJIL) SOBRE *Escherichia coli* ATCC 25922**”, **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

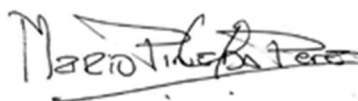
Asimismo, **DECLARO BAJO JURAMENTO** que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de DIECISÉIS PORCIENTO (16%) y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 28 días del mes de diciembre del año 2022.



---

María Isabel Usquiano Paredes  
DNI: 43851462



---

Mg. Neuman Mario Pineda Pérez  
DNI: 09410930

1. Apellidos y Nombres
2. DNI
3. Grado o título profesional
4. Título del trabajo de Investigación
5. Porcentaje de similitud

# TESIS EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO

## INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	5%
2	<a href="http://repositorio.uma.edu.pe">repositorio.uma.edu.pe</a> Fuente de Internet	4%
3	<a href="http://repositorio.uoosevelt.edu.pe">repositorio.uoosevelt.edu.pe</a> Fuente de Internet	3%
4	<a href="http://repositorio.upagu.edu.pe">repositorio.upagu.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
5	<a href="http://essnature.com">essnature.com</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://repositorio.uladech.edu.pe">repositorio.uladech.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://pesquisa.bvsalud.org">pesquisa.bvsalud.org</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://cmhnaaa.org.pe">cmhnaaa.org.pe</a> Fuente de Internet	1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Activo



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

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL  
DE LAS HOJAS DE *Melissa officinalis* L. (TORONJIL) SOBRE  
*Escherichia coli* ATCC 25922**

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

**AUTORES**

Bach. CUEVA ESPINAL, WANNER  
<https://orcid.org/0000-0003-3573-4197>

Bach. USQUIANO PAREDES, MARÍA ISABEL  
<https://orcid.org/0000-0002-4848-9170>

**ASESOR:**

Mg. PINEDA PÉREZ, NEUMAN MARIO  
<https://orcid.org/0000-000-6818-7797>

**LIMA – PERÚ**

**2022**

## **DEDICATORIA**

A DIOS por brindarme salud día a día y darme las fuerzas para avanzar con mi propósito y mis objetivos, por bendecirme con un trabajo para poder sustentar nuestras necesidades ya que muchos han quedado sin ellos

A mis abuelitos María Rojas Terrones y Telmo Espinal Romero que ya están en el cielo

A mis padres Juan Cueva Ramírez y Baceliza Espinal Rojas por todo su apoyo incondicional, porque a pesar de momentos difíciles siempre estuvieron allí presentes en todo momento, por inculcarme valores positivos para ser una persona que soy ahora

A mi hermano Anthony Paul por sus consejos para seguir adelante, a todos ellos mi agradecimiento.

***Wanner Cueva Espinal***

Dedico esta tesis a mis padres Sergio y margarita por su infinito apoyo y dedicación en hacerme una mejor persona.

A mis hermanos Luis, Cesar, Sergio y Patricia, que siempre estuvieron incondicionalmente a mi lado para poder culminar con éxito mis estudios

***María Isabel Usquiano Paredes***

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por guiarnos por el camino del bien y mantenernos siempre de pie durante toda nuestra carrera.

A nuestros padres por su apoyo constante y por enseñarnos a no rendirnos fácilmente, por sus ejemplos de perseverancia.

A nuestros abuelitos que desde el cielo nos iluminan

A la Universidad María Auxiliadora por darnos la oportunidad de formar parte de esta casa de estudio y finalmente a todas aquellas personas que de una u otra manera estuvieron apoyándonos en los momentos que más los necesitamos.

***Los autores***

# ÍNDICE GENERAL

	Páginas
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
II.1. Enfoque y diseño de la investigación.....	15
II.2. Población, muestra y muestreo .....	15
II.3. Variables de investigación .....	16
II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos .....	16
II.5. Plan metodológico para la recolección de datos.....	17
III. RESULTADOS .....	21
IV. DISCUSIÓN .....	28
IV.1. Discusión de Resultados .....	28
IV.2. Conclusiones.....	30
IV.3. Recomendaciones.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32
ANEXOS:.....	35
Anexo A. Instrumento de recolección de datos	36
Anexo B. Matriz de consistencia	367
Anexo C. Operacionalización de las variables	378
Anexo D. Identificación taxonómica de la planta	39
Anexo E. Carta de aceptación del Lab. Microclin	390
Anexo F. Certificado de análisis de Escherichia coli ATCC 25922	41
Anexo G. Análisis estadístico complementario de los datos	423
Anexo H. Evidencias del trabajo de campo	456

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
Tabla 1. Solubilidad del aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) en diferentes solventes	21
Tabla 2. Identificación los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil)	22
Tabla 3. Efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	23
Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA)	25
Tabla 5. Análisis por sub grupos homogéneos mediante la prueba de Tukey	26
Tabla 6. Sensibilidad antibacteriana de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	27
Tabla 7. Análisis del comportamiento normal de los diámetros de inhibición	42
Tabla 8. Determinación la distribución homogénea de las varianzas	43
Tabla 9. Análisis de comparaciones múltiples	43



## ÍNDICES DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	24
Figura 2. Recolección y preparación de la muestra vegetal para extracción del aceite .....	45
Figura 3. Instalación del equipo de destilación por arrastre con vapor y obtención del aceite.....	46
Figura 4. Preparación del aceite esencial de toronjil a diferentes concentraciones	47
Figura 5. Activación de <i>Escherichia coli</i> .....	48
Figura 6. Preparación de la carga bacteriana .....	48
Figura 7. Aplicación de la bacteria en los medios de cultivo.....	49
Figura: 8. Incubación de placas con medio de cultivo.....	50

## RESUMEN

**Objetivo:** Demostrar el efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Metodología:** Empleamos estudio de tipo cuantitativo, transversal, prospectivo, diseño experimental; población de estudio 12 kilogramos de hojas de *Melissa officinalis* L. obtenidas del distrito Niepos, Provincia San Miguel, Departamento Cajamarca, muestra empleada 8 kg de hojas de *Melissa officinalis* L.; técnicas utilizadas ficha de recolección de datos para la parte microbiológica, marcha fitoquímica y prueba de solubilidad; el efecto antibacteriano sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 evaluándose formación de halos de inhibición y análisis estadístico con nivel de significancia 0,05.

**Resultados:** El aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. presentó solubilidad al dimetil-sulfóxido y cloroformo, metabolitos secundarios identificados triterpenos y taninos; halos de inhibición formados sobre cultivos in vitro de *Escherichia coli* fueron  $10,83 \pm 0,36$  mm al 50% del aceite esencial de toronjil,  $12,07 \pm 0,41$  mm al 75% y  $13,06 \pm 0,41$  mm al 100%; el control positivo (ciprofloxacino) halo de inhibición  $29,48 \pm 0,38$  mm.

**Conclusiones:** El aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. a concentraciones 50%, 75% y 100% demostró efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, aceite esencial, Toronjil, antibacteriano

## ABSTRACT

**Objective:** To demonstrate the in vitro antibacterial effect of the essential oil from the leaves of *Melissa officinalis* L. (Toronjil) on strains of *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Methodology:** We use a quantitative, cross-sectional, prospective study, experimental design; study population 12 kilograms of *Melissa officinalis* L. leaves obtained from the Niepos district, San Miguel Province, Cajamarca Department, sample used 8 kg of *Melissa officinalis* L. leaves; techniques used data collection sheet for the microbiological part, phytochemical march and solubility test; the antibacterial effect on the *Escherichia coli* ATCC 25922 strains, evaluating the formation of inhibition halos and statistical analysis with a significance level of 0.05.

**Results:** The essential oil of the leaves of *Melissa officinalis* L. presented solubility to dimethyl sulfoxide and chloroform, secondary metabolites identified triterpenes and tannins; inhibition halos formed on in vitro cultures of *Escherichia coli* were 10.83+0.36mm at 50% lemon balm essential oil, 12.07+0.41mm at 75% and 13.06+0.41mm at 100%; the positive control (ciprofloxacin) inhibition halo 29.48+0.38mm.

**Conclusions:** The essential oil of the leaves of *Melissa officinalis* L. at 50%, 75% and 100% concentrations demonstrated an in vitro antibacterial effect on *Escherichia coli* ATCC 25922 strains.

**Keywords:** *Escherichia coli*, essential oil, Toronjil, antibacterial.

## I. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* (*E. coli*) habita comúnmente en el intestino del hombre y animales, sin embargo, ciertas cepas productoras de la toxina Shiga pueden llegar a provocar intoxicación grave incluso a producir la muerte de las personas, la contaminación por esta toxina puede producirse por la carne cruda, la leche cruda y ciertas verduras contaminadas con materia fecal. Esta bacteria ha provocado a lo largo de la historia brotes epidemiológicos que han causado graves problemas a los países<sup>1,2</sup>.

En Alemania, esta bacteria ocasionó en el 2011 un brote de casos los cuales fueron reportados por el Sistema de Comunicación de Alertas Sanitarias de la UE (EWRS) mostrando cuadros de diarrea sanguinolenta secundarios a *E. coli* enterohemorrágico productor de toxina Shiga (STEC). Los casos se presentaron en 15 estados de Alemania con un total de 214 casos con Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), 2 fallecidos, siendo el 68% mujeres en su mayoría mayores de 17 años. Este brote posteriormente se extendió a los países de Suecia, Holanda, Reino Unido y Dinamarca<sup>3</sup>.

Esta bacteria, se relaciona con enfermedades diarreicas agudas (EDA) especialmente en menos de 5 años, tanto en América Latina, África y Asia, con edad inferior a 5 años, generalmente los datos estadísticos se ven limitados a la capacidad de los laboratorios para realizar los análisis de esta bacteria en las muestras; sin embargo, se han detectado cepas productoras de toxina Shiga, del mismo modo, diversos estudios han reportado la presencia de *E. coli* enteroagregativa en productos alimenticios en supermercados<sup>4</sup>.

Según la OMS y UNICEF, existe 2000 millones de reportes de enfermedades diarreicas a nivel mundial, de esta cifras aproximadamente 2 millones de niños con edades menores a 5 años fallecen anualmente, representando esta última el 18% de las muertes producidas en este rango de edad, produciéndose la mayor cantidad de muertes (78%) en el continente Africano y Asiático<sup>5</sup>.

El Perú no fue ajeno a los brotes epidemiológicos ocasionados por *Escherichia coli*, de la misma manera, declaró alerta epidemiológica posterior al brote

producido en Europa que dejó 35 muertes en el 2011, solicitando en los aeropuertos descarte de infecciones diarreicas sobre todos a los vuelos procedentes de Europa<sup>6</sup>.

Así mismo, en el Perú un estudio reveló luego del análisis de las muestras de una población de 4,243 niños variantes de *Escherichia coli* entero-agregativa, entero-patogénica, entero-toxigénica, entre otras<sup>7</sup>.

Este tipo de infecciones por *Escherichia coli* se ve aún más complicada debido a la resistencia bacteriana que presenta esta bacteria y que continúa en aumento, un estudio realizado por Marcos P (2020), muestra un estudio realizado en 98 pacientes procedentes de la Costa, Sierra y Selva, observando mayor resistencia a esta bacteria en los pacientes de la sierra del Perú (28,6%) encontrando cepas productoras de betalactamasas con prevalencias entre las edades de 31 a 45 años<sup>8</sup>.

Por otro lado, existen estudios que atribuyen propiedades medicinales a *Melissa officinalis* L. (toronjil) incluyendo la actividad antibacteriana, en ese sentido y en base a esta realidad manifestada con respecto a la problemática que gira en todo a *Escherichia coli*, es necesario plantear propuestas que ayuden a mejorar esta situación, en ese sentido, la investigación propone una investigación basada en un estudio in vitro del efecto antibacteriano de *Melissa officinalis* L. (toronjil) sobre *Escherichia coli*, con la finalidad de encontrar un tratamiento natural a las infecciones causadas por esta bacteria.

*Melissa officinalis*, es una planta procedente del Mediterráneo oriental (Turquía) y que se encuentra en todos los climas templados del planeta. Su uso, como planta medicinal, se remonta a Teofrasto e Hipócrates, en la antigua Grecia, en ese momento, sus beneficios ya eran reconocidos para calmar a las personas ansiosas y calmar los trastornos nerviosos, los árabes lo usaban como antiespasmódico y los europeos como tratamiento digestivo, calmante y antiviral, en el mundo contemporáneo, se utiliza en la medicina herbal para tratar la ansiedad y los trastornos nerviosos, así como los problemas gastrointestinales, también se utiliza por su efecto estimulante sobre la función cerebral y su eficacia en el tratamiento del insomnio<sup>9</sup>

Se han identificado una serie de posibles componentes activos de la hoja seca y

el aceite esencial de esta planta, los componentes que pueden tener efectos farmacológicos incluyen una serie de aldehídos monoterpenoides (incluyendo citronellal, neral y geranial), flavonoides y compuestos polifenólicos (ácido rosmarínico) y glucósidos monoterpénicos, con la identificación de otros nuevos compuestos. Estos componentes se absorben fácilmente después de la ingestión oral de Melissa<sup>10,11</sup>.

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria gram negativa conocido por ser parte de la flora intestinal normal, pero también puede ser la causa de enfermedades intestinales y extraintestinales en los seres humanos, hay cientos de cepas de *E. coli* identificadas, lo que resulta en un espectro de enfermedades desde gastroenteritis leve hasta insuficiencia renal y shock séptico; su virulencia se debe a la capacidad de *Escherichia coli* para evadir las defensas del huésped y desarrollar resistencia a los antibióticos comunes<sup>12</sup>.

Los diferentes tipos de *Escherichia coli* tienden a contaminar diferentes los alimentos y el agua, tal es así, que los brotes anteriores de *Escherichia coli* patógena en los Estados Unidos han incluido verduras de hoja verde, brotes, leche cruda y quesos, y carne cruda y aves de corral, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), incluida la *Escherichia coli* O157: H7, puede ser particularmente peligrosas, las principales fuentes de brotes de STEC son los productos cárnicos molidos crudos o poco cocidos, la leche cruda y los quesos, y las verduras y brotes contaminados; las personas infectadas con *Escherichia coli* patógena pueden comenzar a notar síntomas desde unos pocos días después de consumir alimentos contaminados o hasta nueve días después. En general, los síntomas incluyen calambres estomacales severos, diarrea, fiebre, náuseas y / o vómitos<sup>13</sup>.

La gravedad o la presencia de ciertos síntomas pueden depender del tipo de *Escherichia coli* patógena que causa la infección. Algunas infecciones pueden causar diarrea sanguinolenta grave y provocar afecciones potencialmente mortales, como un tipo de insuficiencia renal o el desarrollo de presión arterial alta, enfermedad renal crónica y problemas neurológicos. Otras infecciones pueden no tener síntomas o pueden resolverse sin tratamiento médico dentro de cinco a siete días<sup>1</sup>.

La prueba de Kirby-Bauer para la susceptibilidad a los antibióticos (también llamada prueba de difusión del disco) es un estándar que se ha utilizado durante años. Desarrollado por primera vez en la década de 1950, fue mejorado por W. Kirby y A. Bauer, luego estandarizado por la OMS en 1961. En la actualidad la técnica de Kirby-Bauer, ha sido reemplazada en laboratorios clínicos por pruebas automatizadas; sin embargo, esta técnica todavía se usa en algunos laboratorios, o se usa con ciertas bacterias con las que la automatización no funciona bien. Además, esta prueba se utiliza para determinar la resistencia o sensibilidad de los aerobios o anaerobios facultativos a productos químicos específicos y también pueden ser utilizados por el médico para el tratamiento de pacientes con infecciones bacterianas, el diámetro del halo de inhibición confirma la actividad de la sustancia sobre el cultivo. El medio Mueller-Hinton se utiliza para la prueba de Kirby-Bauer y presenta un porcentaje alto en proteínas<sup>2</sup>.

Como antecedente internacional del estudio podemos mencionar a **Behbahani B. et al (2019)**, en su estudio “Composición química, actividad antioxidante, contenido de fenoles y el efecto antibacteriano del aceite de *Melissa officinalis*”. En su desarrollo los compuestos fueron identificados por CG-MS, la actividad antirradical fue evaluada utilizando el reactivo de coloración 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, la presencia de fenoles fue medido con el reactivo Folin-Ciocalteu y el efecto antibacteriano del aceite se evaluó por técnicas microbiológicas de disco y en pozo. Los metabolitos secundarios encontrados fueron, geranilo, citral, Z-citral, citronelal y citronelol; del estudio microbiológico el diámetro de los halos que se formó alrededor de cada pozo fue 7.2 mm; 9.0 mm; 10.6 mm; 12.4 mm y 13.5 mm en promedio evaluados a la concentración de 0.5mg/ml; 1.0mg/ml; 2.0mg/ml; 4.0mg/ml y 8.0mg/ml; al enfrentarse a cultivos de *E. Coli*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*<sup>14</sup>.

**Abdel W. et al (2019)**, en su investigación “Evaluación antibacteriana y perfil fitoquímico mediante el cromatógrafo de gases de los extractos con etanol de la planta *Melissa officinalis*. En referencia a la evaluación antibacteriana fue evaluado mediante la concentración mínima inhibitoria, en la que se observó un fuerte potencial contra *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa* con un CMI de 1.65 y 1.9140ug/ml respectivamente; y contra *C. albicans* su CMI fue de 0,30µg/mL. El

perfil fitoquímico del extracto de *Melissa officinalis* se relacionó con su efecto antibacteriano encontrándose bioactivos como terpenos, ácidos grasos, ácido palmítico y fitol<sup>15</sup>.

**Ehsani A., et al. (2017)**, en Zanjan – Irán, determinaron los “metabolitos secundarios y el efecto antibacteriano contra *S. typhimorium*, *E. coli* y *S. aureus* del aceite esencial de *Melissa officinalis* y *Dracocephalum moldavica*”, la metodología empleada consistió en la técnica de difusión en pozo y los metabolitos fueron determinados mediante cromatografía de gases. En los resultados se encontraron geranial, neral, geraniol, geranilo, citral, timol, citronelal, *Melissa officinalis* demostró tener mayor actividad contra *Staphylococcus aureus* que *Dracocephalum moldavica*, además presentó un diámetro de inhibición promedio de 9.74 mm y 11.17 mm para *Escherichia coli* a las concentraciones de 75% y 100%<sup>16</sup>

Entre los antecedentes nacionales contamos con la investigación de **Curo M. et al (2021)**, en su investigación “Evaluación de la actividad contra la cepa ATCC *Escherichia coli* del aceite esencial extraído de la especie *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) con el objetivo de formular una emulsión para beber. Los resultados mostraron tamaños de halos de 8.91 mm; 10.11 mm y 11.99 mm para las concentraciones de 50.0 %, 75.0 % y 100.0 % respectivamente<sup>17</sup>.

**Salazar R, Yerren M. (2021)** mediante su estudio “Efecto antibacteriano del aceite de *Melissa officinalis* (toronjil) y *Origanum vulgare* (orégano) frente a *Escherichia Coli*” se evaluaron las concentraciones del 50% y 100%. Los resultados mostraron tamaños de halo de 10,36mm y 12,05mm para las concentraciones de 50.0 % y 100.0 % respectivamente, el dimetilsulfoxido presento halo de 6.17mm y el ciprofloxacino obtuvo halo de 30.35mm<sup>18</sup>.

**Lema A. (2018)**, en su investigación “Actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Mellisa officinalis* (toronjil) en *Proteus spp*”. Se evaluó el tamizaje fitoquímico de la planta y el estudio microbiológico se realizó por difusión en disco. En el estudio fitoquímico se evidencio la existencia de saponinas, fenoles, flavonoides (chalconas, auronas), alcaloides, y quinonas; los



halos inhibitorios formados fueron de 13,0mm; 15.0mm; 18.0mm y 20,0mm para las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% contra *Proteus spp*<sup>19</sup>

El estudio de investigación pretende mediante los resultados encontrados, brindar una alternativa al tratamiento con medicamentos contra *Escherichia coli*, y de esta manera reducir los costos del tratamiento, además disminuir la resistencia bacteriana de esta bacteria y los índices de morbi-mortalidad lo que puede reflejar una reducción en los costos por tratamiento y hospitalización de los pacientes, además de servir como componente en la elaboración de preparados magistrales con efecto terapéutico.

En ese sentido, se planteó el objetivo principal:

Demostrar el efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

Hipótesis general: El aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) presenta efecto antibacteriano in vitros sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Enfoque y diseño de la investigación

- Cuantitativo, basado en un conjunto de procesos sistemáticos y metodológicos que empleó los datos recolectados mediante variables numéricas para realizar un análisis estadístico.
- Transversal, debido a que, el momento de recolección de los datos, se realizó en un periodo de tiempo específico.
- Prospectivo, debido a que se analizaron los datos recolectados en el presente y las posibilidades futuras de interacción entre las variables.
- Experimental, porque se derivó del análisis de las variables en estudio, las cuales son modificadas por el investigador para demostrar su grado de relación causal entre estas<sup>20,21</sup>.

### II.2. Población, muestra y muestreo

**Población:** Estuvo representada con 12 kilogramos de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) las que fueron obtenidas en el distrito de Niepos, Provincia San Miguel, Departamento Cajamarca ubicado a una latitud Sur de 6°55'35'' y una longitud Oeste de 79°7'47''.

La identificación taxonómica de la especie vegetal fue realizada en la ciudad de Lima, por un profesional Biólogo con especialidad en Botánica, quien emitió un certificado en conformidad de la identificación de la especie vegetal.

**Muestra:** Sólo se utilizó 8 kg de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil), las cuales luego de ser recolectadas, pasaron por un proceso de selección, empleándose solamente las hojas que no presentaron descomposición, plagas o deterioro; posteriormente se lavaron con abundante agua y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.1%. La muestra fue seleccionada tomando en consideración los siguientes criterios:

#### **Criterios de inclusión:**

- Muestra identificada taxonómica
- Hojas de tamaño y forma similar
- Correspondiente a la misma zona geográfica de la población
- Recolectada directamente de la zona de cultivo

**Criterios de exclusión:**

- Tratamiento con insecticidas
- Muestras con plagas
- En estado de putrefacción y/o deterioro
- De diferente especie

**Unidad de análisis:** Fue la cepa microbiológica de *Escherichia coli* ATCC 25922, que fue adquirida del Laboratorio Microbiologics, quien proporcionó el certificado de análisis correspondiente de la cepa.

**Muestreo:** Se aplicó el tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia, dada la facilidad de acceso y disponibilidad del lugar de recolección de la muestra

**II.3. Variables de investigación**

**Variable independiente:** Aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil).

**Definición conceptual:** Solución oleosa extraída de una muestra vegetal con por medio de arrastre con vapor

**Definición operacional:** Solución oleosa con propiedades medicinales y que puede emplearse como antibacteriano.

**Variable dependiente:** Efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922

**Definición conceptual:** Inhibición en la multiplicación celular de las bacterias

**Definición operacional:** Identificación de halos de inhibición tras la utilización de una sustancia con efecto antibacteriano.

**II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos****Técnicas:**

La técnica de estudio corresponde a la Observación.

**Ficha de recolección de datos – Microbiológica:** Esta ficha fue elaborada siguiendo la información referencial citada por Yerren M. (2021)<sup>22</sup>, la cual permitió el registro de los datos recolectados con respecto a los tamaños del halo de inhibición (milímetros) formados por el aceite a diferentes concentraciones, comparados con los grupos control negativo

(dimetilsulfoxido) y positivo (ciprofloxacino).

**Ficha de recolección de datos – Marcha fitoquímica:** Esta ficha fue elaborada siguiendo la información referencial citada por Angulo D. (2019)<sup>23</sup>, la cual permitió registrar los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica, donde se puede apreciar la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios de la planta, así mismo en caso de la presencia de metabolitos se caracterizó la intensidad observada de la coloración, según sea intensidad Baja (+), intensidad Moderada (++) e intensidad Alta (+++).

**Ficha de recolección de datos – Prueba de solubilidad:** Esta ficha será elaborada siguiendo la información referencial citada por López C. (2022)<sup>24</sup>, la cual registra el grado de solubilidad del aceite en diferentes tipos de solventes según el grado de polaridad.

## **II.5. Plan metodológico para la recolección de datos**

### **II.5.1 Elaboración del aceite esencial**

El aceite se elaborará mediante el método de arrastre con vapor, siguiendo la técnica propuesta por Acuña D. (2021)<sup>25</sup>, las hojas de la muestra se colocaron en el compartimiento del equipo previo armado, en cantidades de 500 gr., se instalaron las líneas refrigerantes al equipo y al final se recolectó el aceite y agua obtenidos en el embudo de decantación, donde se separó el aceite del agua.

### **II.5.2 Prueba de solubilidad**

La prueba de solubilidad fue realizada según el método propuesto por Pacheco C. (2021)<sup>26</sup>. Se evaluará el grado de solubilidad del aceite por medio de dilución directa colocando en tubos de ensayo, 1 ml del aceite y 1 ml de etanol 96°, metanol, alcohol ter-butílico, éter, acetona, cloroformo y dimetilsulfoxido según corresponda. Se evaluó el grado de disolución de la mezcla según sea Soluble, Medianamente soluble e Insoluble.

### **II.5.3 Marcha fitoquímica**

Se realizó la marcha fitoquímica según el método propuesto por Soto M. (2015)<sup>27</sup> mediante reacciones de coloración con reactivos específicos empleando el aceite esencial de la siguiente manera:

**El ensayo de Sudán III:** Este tipo de ensayo se empleó para determinar la existencia de partículas grasas; si se observa la presencia de gotas coloreadas confirma esta reacción. Se colocaron para tal fin, 0.5ml de la muestra y agregó 1 ml del reactivo de Sudan III

**Ensayo de Dragendorff.** Se empleó para la identificación de alcaloides en la muestra analizada, se agregó 0.5 ml del aceite en un tubo de ensayo y luego se agregó 11 gotas del reactivo de Dragendorff, la formación de un precipitado naranja o turbidez confirma la presencia de alcaloides.

**Ensayo de Baljet.** Este ensayo permite determinar cumarinas o compuestos con grupos lactónicos. En una muestra de 0.5 ml se agrega 11 gotas del reactivo de Baljet y se agita suavemente, la presencia de una coloración o precipitado es confirmatorio para esta reacción.

**Ensayo de Borntrager.** Este ensayo permite identificar quinonas. En una muestra de 0.5 ml del aceite se agregó 0.5 ml de una solución de NaOH (10%), si aparece un color rosado-rojo en la fase acuosa confirma la reacción.

**Ensayo de Liebermann-Burchard.** Permite la identificación de triterpenos o esteroides, debido a la presencia del núcleo de androstano. En una muestra de 0.5 ml se agrega 0.5 ml del reactivo de Liebermann-Burchard, un color rojo en la interfase muestra una reacción positiva.

**Ensayo de Ninhidrina.** Permite identificar aminoácidos, a una muestra de 0.5 ml del aceite se le agrega 11 gotas del reactivo de Ninhidrina, luego se lleva a baño maría a 45°C por 10 minutos y se observa, la aparición de una coloración azul-violeta es confirmatorio de la reacción.

**El ensayo de Shinoda.** Este ensayo se emplea para determinar la presencia de flavonoides. En un tubo se agregó 0.5 ml del aceite y luego se agregó 0.5 ml de alcohol isoamílico, la presencia de una coloración amarilla, naranja o roja, indica una reacción positiva.

**El ensayo de antocianidinas.** Esta reacción también permite identificar flavonoides que presenten la secuencia en su estructura

C6-C3-C6 del flavonoide. En un tubo con 0.5 ml se le agrega 11 gotas del reactivo en mención. La coloración roja o marrón mostrará la presencia de flavonoide.

**El ensayo de espuma.** Se emplea para determinar la existencia de saponina. La presencia de espuma luego de agitar el tubo por más de 2 minutos, confirma la reacción.

#### II.5.4 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se realizó siguiendo el método propuesto por Guerrero S. (2021)<sup>28</sup>. Primero se activó la cepa microbiológica de *Escherichia coli* ATCC 25922 la cual fue adquirida del laboratorio Microbiologics, esta fue activada mediante disolución y sembrado directo en agar MacConkey selectivo para bacterias Gram negativas entéricas, posteriormente se llevaron a incubación por 48 horas hasta observar la formación de colonias.

Para preparar el Agar MacConkey se disolvieron 49.53 gr de este agar deshidratado en 1 litro de agua destilada y llevó hasta disolución completa mediante calentamiento hasta ebullición, luego se llevó a esterilización en autoclave a una presión de 15 libras, 121°C por 15 minutos, luego se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y agregó a las placas Petri en un ambiente estéril.

Se preparó el inóculo bacteriano a partir de las colonias formadas en la placa con *Escherichia coli*, se realizaron diluciones sucesivas 1/10 en tubos con solución salina fisiológica hasta llegar a la escala 0.5 de McFarland por comparación directa.

A partir del inóculo se sembró *Escherichia coli* en 15 placas donde se prepararon pocitos de 6 mm de diámetro mediante sacabocado y posteriormente se aplicó en cada pocito 30 uL del aceite a la concentración de 50%, 75% y 100% respectivamente previa identificación.

Los grupos control fueron tratados de la misma manera, preparando 15 placas con dos pocitos en cada una donde se aplicó 30 uL de dimetilsulfoxido y 30 uL de ciprofloxacino 100mg/ml.

Se llevó a incubación por 24 horas a 37°C  $\pm$  2 y observó luego de este

tiempo la formación de crecimiento bacteriano y de halos de inhibición. Los datos fueron recolectados mediante un vernier digital que sirvió para obtener el tamaño de los halos formados en milímetros (mm) y posteriormente se registraron los datos en la ficha de recolección de datos para el estudio microbiológico.

## **II.6 Procesamiento de los análisis estadísticos**

Los datos recolectados fueron analizados en mediante la hoja de cálculo Microsoft Excel y el software estadístico SPSS ver. 26, donde se determinaron los estadísticos descriptivos de los datos recolectados y mediante las pruebas de ANOVA y Tukey con una confianza del 95% se contrastó la hipótesis del estudio.

## **II.7. Aspectos éticos**

Dentro de este aspecto se consideró el principio de veracidad y autoría sometiendo la investigación al software antiplagio turnitin para demostrarlo, así mismo, los investigadores son los únicos responsables del contenido de la investigación y se someten a las sanciones respectivas en caso se falte a estos principios; así mismo, se mantuvo los criterios de bioseguridad durante el desarrollo de la parte experimental y el manejo de material biocontaminado para evitar daños al medio ambiente o los participantes. Del mismo modo, todas las referencias con las que se han trabajado para el desarrollo de esta investigación, han sido citadas de acuerdo al estilo de Vancouver (superscript).

### III. RESULTADOS

Tabla 1. Solubilidad del aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) en diferentes solventes

Solvente	Solubilidad
Agua destilada	-
Dimetil-sulfoxido	+++
Acetona	++
Cloroformo	+++
Etanol	+
Hexano	++
Metanol	-
Alcohol ter-butílico	-

Fuente: Elaborada por los investigadores

**Leyenda:**

Alta solubilidad	+++
Mediana solubilidad	++
Baja solubilidad	+
Totalmente insoluble	-

En la tabla 1, se muestra la solubilidad del aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) en diferentes solventes realizada mediante la mezcla de estos con el aceite, los resultados encontrados muestran que el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. presenta alta solubilidad al dimetil-sulfóxido y cloroformo, presenta mediana solubilidad a la acetona y hexano, baja solubilidad al etanol y es totalmente insoluble al agua destilada, metanol y alcohol ter-butílico.



**Tabla 2. Identificación los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil)**

Metabolitos Secundarios	Reactivos	Resultado
Alcaloides	Dragendorff	-
Mucílagos	No emplea	-
Flavonoides	Antocianidina	-
<u>Triterpenos</u> / Esteroides	Liebermann Burchard	++
Compuestos fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	-
Quinononas	Borntrange	-
Aminoácidos	Ninhidrina	-
Aceite y grasas	Sudan III	++
Saponinas	Espuma	-
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	+

Fuente: Elaborada por los investigadores

**Leyenda:**

Ausente (-)  
 Escaso (+)  
 Leve (++)  
 Moderado (+++)  
 Abundante (++++)

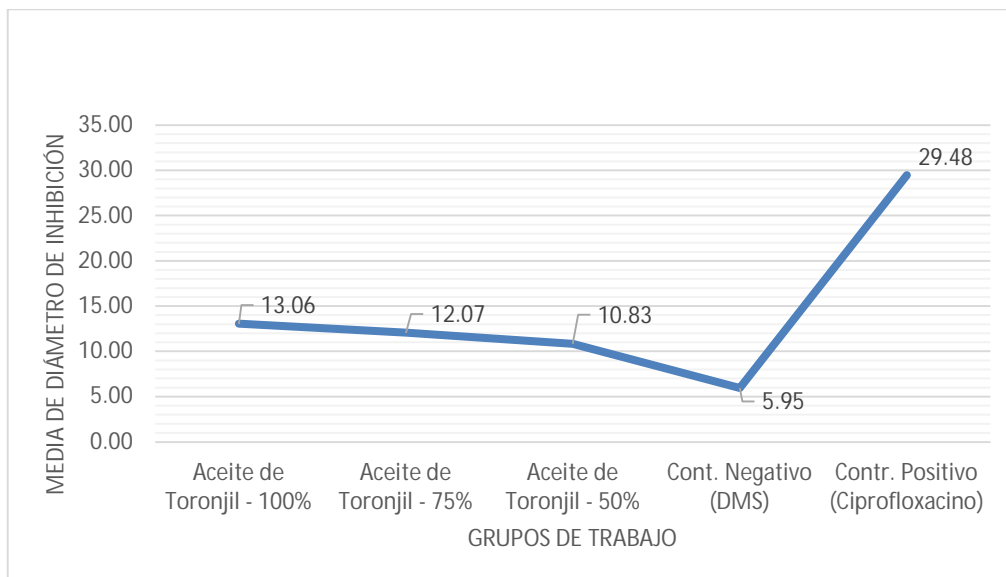
En la tabla 2, muestra las reacciones cualitativas de identificación de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) las que se expresan según la leyenda presentada, los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. fueron triterpenos y taninos, resultando negativo para el resto de metabolitos mostrados.

**Tabla 3. Efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* ATCC 25922**

Grupo de trabajo	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Aceite de Toronjil - 100%	15	13,06	0,41	0,11	12,83	13,29	12,37	13,58
Aceite de Toronjil - 75%	15	12,07	0,41	0,11	11,84	12,30	11,39	13,01
Aceite de Toronjil - 50%	15	10,83	0,36	0,09	10,63	11,03	10,22	11,65
Cont. Negativo (DMS)	15	5,95	0,36	0,09	5,76	6,15	5,53	6,68
Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	15	29,48	0,38	0,10	29,28	29,69	28,73	30,16

**Fuente:** Elaborada por los investigadores

Los datos mostrados en la tabla 3, muestran los parámetros estadísticos del comportamiento que presentan los datos recolectados del tamaño del halo de inhibición; así mismo, los valores medios de los halos de inhibición para los grupos experimentales al 50% del aceite esencial de toronjil fue de  $10,83 \pm 0,36$  mm para el aceite esencial de toronjil al 75% fue de  $12,07 \pm 0,41$  mm y para aceite esencial de toronjil al 100% fue de  $13,06 \pm 0,41$  mm, el control positivo (ciprofloxacino) presento halo de inhibición promedio de  $29,48 \pm 0,38$  mm; el control negativo (DMS) obtuvo un valor promedio de diámetro de inhibición de  $5,95 \pm 0,36$  mm.



Fuente: Elaboración propia

**Figura 1. Efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* ATCC 25922**

La imagen de la figura 1, muestra el valor promedio del diámetro de halo de inhibición obtenido por cada grupo de trabajo, se observa en los grupos experimentales un halo de inhibición superior al grupo control negativo, con halos de inhibición crecientes a mayor concentración del aceite esencial de toronjil; sin embargo, el control positivo, presentó un halo de inhibición claramente diferente a los otros grupos experimentales, siendo este último mayor que todos.

## Comparación del efecto antibacteriano in vitro, del aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 con Ciprofloxacino

### CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS:

H<sub>0</sub>: El aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) no presentan mayor efecto antibacteriano in vitro sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 que el ciprofloxacino.

H<sub>1</sub>: El aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) presentan mayor efecto antibacteriano in vitro sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 que el ciprofloxacino.

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

ANOVA					
Diámetro de inhibición					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4781,191	4	1195,298	8070,914	0,000
Dentro de grupos	10,367	70	0,148		
Total	4791,558	74			

**Fuente: SPSS ver. 26**

En la tabla 4, se muestra la evaluación de los valores promedio de los halos de inhibición por grupo de trabajo para determinar si existe diferencia significativa entre ellos, lo cual se analizó mediante la prueba de Análisis de la Varianza (ANOVA), al comparar el p-valor de la tabla con el valor de significancia del estudio, se llegó a la conclusión que existe evidencia suficiente para confirmar que entre los grupos analizados existe al menos un grupo diferente entre en su valor promedio de halo de inhibición, lo que nos lleva a la realización de la siguiente prueba de Tukey.

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

**Diámetro de inhibición**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Grupos de trabajo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Cont. Negativo (DMS)	15	5,95				
Aceite de Toronjil - 50%	15		10,83			
Aceite de Toronjil - 75%	15			12,07		
Aceite de Toronjil - 100%	15				13,06	
Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	15					29,48
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

**Fuente: SPSS ver. 26**

La tabla 5, se observa el análisis de los datos mediante la prueba de Tukey, que nos permite establecer si existen grupos con similar actividad antibacteriana al agruparlos por sub grupos, del análisis se demuestra que todos los grupos presentan efectos diferentes contra *Escherichia coli* ATCC 25922, siendo el efecto superior en el ciprofloxacino.

**Decisión:** Por lo tanto, se decide rechazar la hipótesis H<sub>1</sub> y aceptar la H<sub>0</sub> que confirma que el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) no presentan mayor efecto antibacteriano in vitro sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 que el ciprofloxacino.

**Tabla 6. Sensibilidad antibacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922**

<b>Tratamiento</b>	<b>Sensibilidad nula ≤ 8 mm</b>	<b>Sensible 8–14 mm</b>	<b>Muy sensible 14-20 mm</b>	<b>Altamente sensible &gt; 20 mm</b>
Cont. Negativo (DMS)	5,95			
Aceite de Toronjil - 50%		10,83		
Aceite de Toronjil - 75%		12,07		
Aceite de Toronjil - 100%		13,06		
Contr. Positivo (Ciprofloxacino)				29,48

En la tabla 6, se realizó la comparación de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 tomando como referencia la escala de Duraffourd para evaluar la sensibilidad de la bacteria en estudio al aceite, donde se observa que *Escherichia coli* ATCC 25922 presenta Sensibilidad Nula al dimetilsulfoxido (control negativo), es Sensible al aceite esencial de *Melissa officinalis* L. a todas las concentraciones estudiadas y es altamente sensible al ciprofloxacino (control positivo).

## IV. DISCUSIÓN

### IV.1. Discusión de Resultados

Las investigaciones sobre plantas medicinales siempre han logrado obtener una fuente de información importante para el descubrimiento de nuevos principios activos, lo que resalta la importancia de este tipo de investigaciones, en tal sentido, tomando como base la realidad problemática planteada en torno a *Escherichia coli* y estudios relacionados sobre el efecto antimicrobiano del aceite esencial de hojas de *Melissa officinalis* L., se planteó la presente investigación la cual muestra los resultados obtenidos y los discute a continuación.

Con respecto a las pruebas de solubilidad realizadas al aceite esencial de hojas de *Melissa officinalis* L., se logró determinar que este presenta alta solubilidad al dimetil-sulfóxido y cloroformo, presenta mediana solubilidad a la acetona y hexano, baja solubilidad al etanol y es total insoluble al agua destilada, metanol y alcohol ter-butílico.

Así mismo, se identificaron los metabolitos secundarios en el aceite esencial como triterpenos y taninos, los resultados encontrados son similares a los realizados por **Behbahani B. et al** en el 2019, en su investigación sobre la composición química y actividad antibacteriana del aceite de *Melissa officinalis* encontró mediante técnicas de cromatografía de gases con detector masas la presencia en el aceite de toronjil, de geranilo, citral, Z-citral, citronelal y citronelol, los que corresponden al grupo de los terpenoides. Otros resultados que respaldan nuestro estudio es el desarrollado por **Abdel W. et al** en el 2019, quienes mediante la técnica de cromatografía de gases lograron identificar como metabolitos secundarios terpenos, ácidos grasos, ácido palmítico y fitol; del mismo modo, **Ehsani A., et al.** en el 2017 identificó diferentes metabolitos en el aceite esencial de toronjil como geranial, neral, geraniol, geranilo, citral, timol, citronelal. Es lógico entender que los metabolitos secundarios presentes en mayor concentración en el aceite esencial de toronjil estén relacionados con los terpenoides debido a sus características físico-químicas.

En el análisis microbiológico del efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *Melissa officinalis* L. se basó en el tamaño de los halos de inhibición formados por los grupos de trabajo donde se obtuvo halos de inhibición para los grupos experimentales al 50% del aceite esencial de toronjil de  $10,83 \pm 0,36$  mm para el aceite al 75% de  $12,07 \pm 0,41$  mm y para aceite esencial al 100% de  $13,06 \pm 0,41$  mm, el control positivo (ciprofloxacino) presentó halo de inhibición promedio de  $29,48 \pm 0,38$  mm; el control negativo (DMS) obtuvo un valor promedio de diámetro de inhibición de  $5,95 \pm 0,36$  mm. Estos valores al confrontarse con los obtenidos por **Behbahani B. et al (2019)**, muestran similares resultados con respecto a los halos de inhibición formados frente a cultivos de *Escherichia coli*, los que variaron entre 7,2 mm a 13,5 mm, del mismo modo, **Ehsani A., et al.** determinó también la formación de halos de inhibición de 9.74 mm y 11.17 mm frente a *Escherichia coli* a las concentraciones de 75% y 100% del aceite de toronjil. **Curo M. et al (2021)**, por su parte, de la misma forma expuso el aceite de toronjil a las concentraciones de 50%, 75% y 100% encontrando halos de inhibición de 8.91 mm; 10.11 mm y 11.99 mm para las concentraciones de 50.0%, 75.0% y 100.0%. Todos los estudios coinciden en los tamaños de los halos de inhibición formados por el aceite de toronjil frente a *Escherichia coli*, con pequeñas diferencias que pueden estar relacionadas con errores en la medición de los halos de inhibición hasta condiciones del hábitat de la especie vegetal y técnica extractiva del aceite.

Luego del análisis estadístico mediante pruebas inferenciales establecidas con un nivel de significancia de 0.05, se logró determinar que existe efecto antibacteriano del aceite de toronjil frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, pero que este es menor que el ciprofloxacino, similares resultados se encontraron en el estudio realizado por **Salazar R, Yerren M. (2021)**, donde logró evaluar el aceite de toronjil frente a *Escherichia coli*, a las concentraciones del 50.0 % y 100.0 % mostró halos de inhibición de 10,36 mm y 12,05 mm respectivamente, en cuanto al control negativo a base de dimetilsulfoxido presentó halo de 6.17 mm y el ciprofloxacino obtuvo halo de 30.35 mm. En ambos estudios se demostró el efecto antibacteriano superior del ciprofloxacino contra esta bacteria.

Por otro lado, el estudio de *Melissa officinalis* (toronjil) también se ha



realizado sobre el extracto hidroalcohólico de las hojas de esta planta y frente a diferentes microorganismos como *Proteus spp*, como lo menciona **Lema A. (2018)** encontrando como metabolitos presentes saponinas, fenoles, flavonoides (chalconas, auronas), alcaloides, y quinonas. El halo de inhibición formado por el extracto a las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% contra *Proteus spp* fueron de 13,0mm; 15,0mm; 18,0mm y 20,0mm. Esta situación muestra que *Melissa officinalis* (toronjil) presenta metabolitos secundarios con poder antimicrobiano, tanto en el aceite como en sus extractos, siendo esta planta una alternativa potencial en el tratamiento de diferentes tipos de infecciones.

Por último, la evaluación de la sensibilidad que presenta *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al aceite de toronjil y los grupos control se determinó mediante la escala valorativa de Durrafourd, en tal sentido, se determinó que la bacteria es altamente sensible al control positivo (ciprofloxacino), es sensible al aceite de toronjil al 50%, 75% y 100%, y presenta sensibilidad nula al control negativo (DMS).

## IV.2. Conclusiones

1. La solubilidad del aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) evaluado en diferentes solventes con características polares y apolares mostró alta solubilidad al dimetil-sulfóxido y cloroformo, mediana solubilidad (+++) a la acetona y hexano, baja solubilidad (++) al etanol y es totalmente insoluble (-) al agua destilada, metanol y alcohol ter-butílico.
2. Identificar los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) fueron triterpenos y taninos en leve cantidad (++).
3. El efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 relacionado con el halo de inhibición formado fue de  $10,83 \pm 0,36$ mm;  $12,07 \pm 0,41$ mm y  $13,06 \pm 0,41$ mm respectivamente.
4. El efecto antibacteriano in vitro, del aceite esencial de las hojas de

*Melissa officinalis* L. (Toronjil) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 es menor que el ciprofloxacino que obtuvo un halo de inhibición de  $29,48 \pm 0,38$ .

### **IV.3. Recomendaciones**

- ✓ La identificación de los metabolitos secundarios de las plantas con poder antibacteriano es esencial para lograr determinar el tipo de metabolitos que produce el efecto, en tal sentido, se recomienda profundizar las investigaciones con diferentes técnicas instrumentales que permitan su identificación.
- ✓ Implementar el uso de principios activos en el tratamiento de enfermedades a nivel sector salud, lo que ayudaría a disminuir índices de resistencia y disminuir costos de tratamiento.
- ✓ Del mismo modo, se recomienda evaluar el efecto sinérgico del toronjil con otras plantas medicinales en tratamiento de las infecciones por bacterias y hongos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Huerta N. Escherichia coli. Una revisión bibliográfica [Internet]. Ocronos. 2018 [cited 2022 May 9]. Available from: <https://revistamedica.com/escherichia-coli-revision-bibliografica/>
2. E. coli [Internet]. [cited 2022 May 6]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
3. Dirección General en Salud. Brote de casos de infección por E. Coli enterohemorrágico productor de toxina Shiga en Alemania [Internet]. Servicio Extremeño de Salud. 2016 [cited 2022 May 9]. Available from: [https://areasaludbadajoz.com/images/datos/saludpublica/Alerta\\_brote\\_SHU\\_en\\_Alemania.pdf](https://areasaludbadajoz.com/images/datos/saludpublica/Alerta_brote_SHU_en_Alemania.pdf)
4. Gómez-Duarte OG. Enfermedad diarreica aguda por Escherichia coli patógenas en Colombia. Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología. 2015;31(5):577.
5. Farthiing M, Salam M, Lindberg G, Dite P. Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. 2014;
6. Perú declara una alerta epidemiológica por brote de “E. coli” en Europa [Internet]. 2014 [cited 2022 May 9]. Available from: <https://expansion.mx/mundo/2011/06/14/peru-declara-una-alerta-epidemiologica-por-brote-de-e-coli-en-europa>
7. Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, et al. Frecuencia de Patotipos de Escherichia coli diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 2011;28(1):13–20.
8. Marcos-Carbajal P, Galarza-Perez M, Huancahuire-Vega S, Otiniano-Trujillo M, Soto-Pastrana J. Comparación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de Escherichia coli uropatógena e incidencia de la producción de betalactamasas de espectro extendido en tres establecimientos privados de salud de Perú. Biomédica. 2020;40(Suppl 1):139.
9. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas medicinales. 2da ed. Editorial Acribia, S.A.; 2010.
10. Saz Peiró, Gálvez Galve ST. Distribución y ecología. Medicina Naturista. 2015; 5:36–8.
11. Jalal Z, el Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine [Internet].

- 2015;5(6):458–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.03.003>
12. Rojas N, Chaves E, García F. Bacteriología diagnóstica. Universidad de Costa Rica. Costa Rica: Facultad de Microbiología; 2015.
  13. Bush L. Infecciones por Escherichia coli - Infecciones - Manual MSD versión para público general [Internet]. Manual MSD. 2020 [cited 2022 May 9]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-escherichia-coli>
  14. Behbahani B. y Shahidi F. Melissa officinalis Essential Oil: Chemical Compositions, Antioxidant Potential, Total Phenolic Content and Antimicrobial Activity. Nutrition and Food Sciences Research. 2019;6(1):17–25.
  15. Abdel W, Fahim J, Fouad M, Kamel M. Estudios antibacterianos, antifúngicos y GC-MS de Melissa officinalis - ScienceDirect. South African Journal of Botany [Internet]. 2019 [cited 2021 Jul 14]; 124:228–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629919303096>
  16. Ehsani A., Alizadeh O., Hashemi M. AA y AM. Propiedades fitoquímicas, antioxidantes y antibacterianas de los aceites esenciales Melissa officinalis y Dracocephalum moldavica. Veterinary research forum. 2017;8(3):223–9.
  17. Curo M. y Gonzales M. Comparación de la actividad anti Escherichia coli ATCC 25922 de los aceites esenciales de Melissa officinalis L. (toronjil) y Syzygium aromaticum L. (clavo de olor) para el desarrollo de una formulación de emulsión bebible. 2021.
  18. Yerren M, Salazar R. Efecto antibacteriano del aceite esencial de Melissa officinalis (toronjil) y Origanum vulgare (orégano) frente a cepas de Escherichia Coli. Universidad Roosevelt; 2021.
  19. A. L. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE Melissa officinalis (TORONJIL) EN Proteus spp. Vol. 2, Procedia Computer Science. Universidad Regional Autonoma de los Andes Uniandes; 2018.
  20. Alonso A, García L, León I, García E, Gil B, Ríos L. Métodos de investigación de enfoque experimental. In: Metodología de la investigación educativa. 2016. p. 167–93.
  21. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación [Internet]. 6ta ed. México, D.F.: Mc Graw Hill; 2014. Available from: [https://periodicooficial.jalisco.gob.mx/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia\\_de\\_la\\_investigacion\\_-\\_roberto\\_hernandez\\_sampieri.pdf](https://periodicooficial.jalisco.gob.mx/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia_de_la_investigacion_-_roberto_hernandez_sampieri.pdf)
  22. Yerren M, Salazar R. Efecto antibacteriano del aceite esencial de Melissa officinalis (toronjil) y Origanum vulgare (orégano) frente a cepas de Escherichia coli [Internet]. 2021. Available from:

- <https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/bitstream/handle/ROOSEVELT/641/Tesis%20-%20Rosmery%20-%20Yerren.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
23. Angulo D, Dionisio A. Perfil de seguridad de las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) mediante el método het-cam [Internet]. 2019. Available from: [http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/4593/TESIS\\_ANGULO\\_DIONISIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/4593/TESIS_ANGULO_DIONISIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  24. López 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*. [Internet]. 2022 [cited 2022 May 27]. Available from: <https://repositorio.uma.edu.pe/handle/20.500.12970/801>
  25. Acuña D, Flores C. Efecto antibacteriano de una crema a base de aceite de *Melissa officinalis* (toronjil) y *Moringa oleífera* (moringa) sobre *Staphylococcus aureus* [Internet]. 2021. Available from: <http://50.18.8.108/bitstream/handle/ROOSEVELT/517/TESIS%20ACU%c3%91A%20Y%20FLORES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  26. Pacheco C. Obtención y caracterización del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria recutita* L.) mediante microondas y arrastre con vapor [Internet]. 2021. Available from: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4624/pacheco-ferrer-claudia-fernanda.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  27. Soto M. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper Peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región amazonas. Universidad Nacional de Trujillo. 2015;6(1):33–43.
  28. Guerrero S, Santamaría M. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum*, en los laboratorios forense Lambayeque y Microclin Trujillo, 2021 [Internet]. 2021. Available from: <http://50.18.8.108:8080/bitstream/handle/ROOSEVELT/577/TESIS%20SAYRA%20-%20MILAGROS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**ANEXOS:****Anexo A. Instrumento de recolección de datos**

<b>EFFECTO ANTIBACTERIANO <i>IN VITRO</i> DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE <i>Melissa officinalis</i> L. (TORONJIL) SOBRE <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>					
<b>Número de placas</b>	<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>			<b>GRUPOS CONTROL</b>	
	100%	75%	50%	DMS (dimetilsufoxido)	Ciprofloxacino
Placa N°01	12,56	12,33	11,22	5,54	29,29
Placa N°02	13,58	11,95	10,88	5,53	29,83
Placa N°03	13,16	12,39	11,21	6,68	29,05
Placa N°04	13,45	12,13	10,87	5,86	29,60
Placa N°05	12,97	11,67	10,93	6,25	29,75
Placa N°06	13,54	12,21	11,65	5,74	29,37
Placa N°07	13,41	13,01	10,77	5,60	30,16
Placa N°08	13,45	11,53	10,80	6,44	29,11
Placa N°09	12,69	12,48	11,02	5,73	29,66
Placa N°10	12,80	11,39	10,76	6,11	29,67
Placa N°11	12,37	11,67	10,74	5,59	28,73
Placa N°12	12,49	12,23	10,46	6,01	29,43
Placa N°13	13,13	11,88	10,22	5,80	29,38
Placa N°14	12,83	12,01	10,47	6,07	29,25
Placa N°15	13,43	12,12	10,48	6,36	29,97

## Anexo B. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
<b>Problema General</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>Hipótesis General</b>
¿Qué efecto antibacteriano in vitro presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?	Demostrar el efecto antibacteriano in vitro que presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	El aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) presenta efecto antibacteriano in vitros sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<b>Problemas Específicos</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicas</b>
¿Cuál será la solubilidad del aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) en diferentes solventes?	Conocer la solubilidad del aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) en diferentes solventes	La solubilidad del aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) en buena en diferentes solventes
¿Qué metabolitos secundarios presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil)	Identificar los metabolitos secundarios presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil)	El aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) presenta metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.
Que efecto antibacteriano in vitro presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?	Conocer que efecto antibacteriano in vitro presenta el aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	El aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% presenta efecto antibacteriano sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro, del aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 comparado con Ciprofloxacino?	Comparar el efecto antibacteriano in vitro, del aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 con Ciprofloxacino	El aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) a concentraciones del 50%, 75% y 100% presenta efecto antibacteriano sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922

### Anexo C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	N° DE ÍTEMS	VALOR
aceite esencial de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil)	Solución oleosa extraída de una muestra vegetal con propiedades medicinales	Extracción por medio de arrastre con vapor	Concentración	Porcentaje	Razón	3	100 75 50
Efecto antibacteriano <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición en la multiplicación celular de las bacterias	Identificación de halos de inhibición	Halo de inhibición	Diámetro	Razón	4	≤ 8mm (-) 8mm-14mm (+) > 14 mm-20mm (++) > 20mm : (+++)



## **Anexo D. Identificación taxonómica de la planta**

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, **María Isabel Usquiano Paredes** y **Wanner Cueva Espinal**, Tesisistas 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 junio 2022

  
Bigo. Hamilton Beltrán  
Hamilton Wanner Beltrán Santiago  
Biólogo - Botánico  
C.R.P. 2719

## Anexo E. Carta de aceptación del Lab. Microclin



### CARTA DE ACEPTACIÓN

#### EL QUE SUSCRIBE

#### Hace constar

Que Cueva Espinal Wanner y Usquiano Paredes María Isabel, bachilleres en Farmacia y Bioquímica han sido aceptados por este laboratorio para realizar la ejecución de su trabajo de investigación titulado "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Melissa officinalis* L. (TORONJIL) SOBRE *Escherichia coli* ATCC 25922" en nuestras instalaciones

Trujillo, 02 de agosto de 2022

  
  
Bgo. Liliana E. Niño Barbanán  
C.B.A. 1997

REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE DOCUMENTO NO ESTA PERMITIDA SIN LA AUTORIZACIÓN PREVIA Y EXPRESA DE MICROCLIN S.R.L.

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 948051687

Trujillo-Perú





Web: [www.microclin.com](http://www.microclin.com)

e-mail: [microclin@microclin.com](mailto:microclin@microclin.com)

## Anexo F. Certificado de análisis de Escherichia coli ATCC 25922



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p><b>Specifications</b>  <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli  <b>Catalog Number:</b> 0335  <b>Lot Number:</b> 335-506**  <b>Reference Number:</b> ATCC® 25922™†  <b>Purity:</b> Pure  <b>Passage from Reference:</b> 3</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2024/3/31 <b>Release Information:</b>  <b>Quality Control Technologist:</b> Mary L. Bowman  <b>Release Date:</b> 2022/4/8</p>
<p><b>Performance</b></p>	
<p><b>Macroscopic Features:</b>                  2 colony types, both are gray &amp; beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge &amp; smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge &amp; rough  <b>Microscopic Features:</b>                  Gram negative straight rod</p>	<p><b>Medium:</b>                  SBAP  <b>Method:</b>                  Gram Stain (1)</p>
<p><b>ID System:</b> MALDI-TOF (1)                  See attached ID System results document.</p>	<p><b>Other Features/ Challenges: Results</b>                  (1) Oxidase (Kovacs): negative                  Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive                  (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm                  (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm                  (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm</p> <p style="text-align: center;">                   Amanda Kuperus                  Quality Control Manager                  AUTHORIZED SIGNATURE             </p>
<p>**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.</p> <p>Note for VitEklit: Although the VitEklit 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.</p> <p>⚠️ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="236 1451 459 1608">                   REFERENCE MATERIAL PRODUCER                  CERT #0495.02             </div> <div data-bbox="247 1624 406 1691">  </div> <div data-bbox="422 1624 1428 1668"> <p>†) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. or licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="236 1702 459 1859">                   TESTING CERT #2055.01             </div> <div data-bbox="502 1848 901 1870"> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </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 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.

Run Creation Date/Time:

2020-03-27T11:51:17.542 KLH

Applied MSP Library(ies):

BDAL\_Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
C7 (+++) (A)	335-506	Escherichia coli	2.55

Comments:

closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment
---

## Anexo G. Análisis estadístico complementario de los datos

**Tabla 7. Análisis del comportamiento normal de los diámetros de inhibición**

Grupos de trabajo		Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro de inhibición	Aceite de Toronjil - 100%	0,203	15	0,097	0,914	15	0,156
	Aceite de Toronjil - 75%	0,098	15	,200*	0,972	15	0,883
	Aceite de Toronjil - 50%	0,132	15	,200*	0,961	15	0,707
	Cont. Negativo (DMS)	0,137	15	,200*	0,933	15	0,299
	Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	0,090	15	,200*	0,992	15	1,000

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Fuente: SPSS versión 26.0**

La tabla Nro. 07 muestra a aplicación de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro Wilk aplicadas mediante el programa estadístico SPSS versión 26.0 para determinar la distribución normal de cada grupo de trabajo, donde se pudo observar que luego de evaluar los 15 datos recolectados para cada grupo de trabajo, se obtiene en ambas pruebas valores de significancia superiores al nivel de significancia alfa del estudio de 0.05; por lo tanto, se muestra con esta comparación que todos los grupos de datos analizados presentan un distribución normal.

**Tabla 8. Determinación la distribución homogénea de las varianzas**

		Prueba de homogeneidad de varianzas			
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diámetro de inhibición	Se basa en la media	0,407	4	70	0,803
	Se basa en la mediana	0,337	4	70	0,852
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,337	4	67,646	0,852
	Se basa en la media recortada	0,408	4	70	0,802

Fuente: SPSS versión 26.0

La tabla Nro. 08; de la misma forma muestra la aplicación del estadístico de Levene o prueba de Levene empleado para la determinación de la distribución homogénea entre varios grupos de datos, al comparar el p-valor obtenido por el programa estadístico SPSS versión 26.0 se observa que este es superior al 0.05 de significancia establecido para el estudio; en tal sentido, se confirma que los grupos de datos analizados presentan varianzas homogéneas.

**Tabla 9. Análisis de comparaciones múltiples**

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente:						
HSD Tukey						
(I) Grupos de trabajo		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
Aceite de Toronjil - 100%	Aceite de Toronjil - 75%	,99067 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	0,5972	1,3842
	Aceite de Toronjil - 50%	2,22533 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	1,8318	2,6188
	Cont. Negativo (DMS)	7,10333 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	6,7098	7,4968
	Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	-16,42600 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-16,8195	-16,0325
Aceite de Toronjil - 75%	Aceite de Toronjil - 100%	-,99067 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-1,3842	-0,5972
	Aceite de Toronjil - 50%	1,23467 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	0,8412	1,6282
	Cont. Negativo (DMS)	6,11267 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	5,7192	6,5062
	Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	-17,41667 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-17,8102	-17,0232
Aceite de Toronjil - 50%	Aceite de Toronjil - 100%	-2,22533 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-2,6188	-1,8318
	Aceite de Toronjil - 75%	-1,23467 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-1,6282	-0,8412

	Cont. Negativo (DMS)	4,87800 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	4,4845	5,2715
	Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	-18,65133 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-19,0448	-18,2578
Cont. Negativo (DMS)	Aceite de Toronjil - 100%	-7,10333 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-7,4968	-6,7098
	Aceite de Toronjil - 75%	-6,11267 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-6,5062	-5,7192
	Aceite de Toronjil - 50%	-4,87800 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-5,2715	-4,4845
	Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	-23,52933 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	-23,9228	-23,1358
Contr. Positivo (Ciprofloxacino)	Aceite de Toronjil - 100%	16,42600 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	16,0325	16,8195
	Aceite de Toronjil - 75%	17,41667 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	17,0232	17,8102
	Aceite de Toronjil - 50%	18,65133 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	18,2578	19,0448
	Cont. Negativo (DMS)	23,52933 <sup>*</sup>	0,14052	0,000	23,1358	23,9228

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.



## Anexo H. Evidencias del trabajo de campo

Figura 2. Recolección y preparación de la muestra vegetal para extracción del aceite





Figura 3. Instalación del equipo de destilación por arrastre con vapor y obtención del aceite

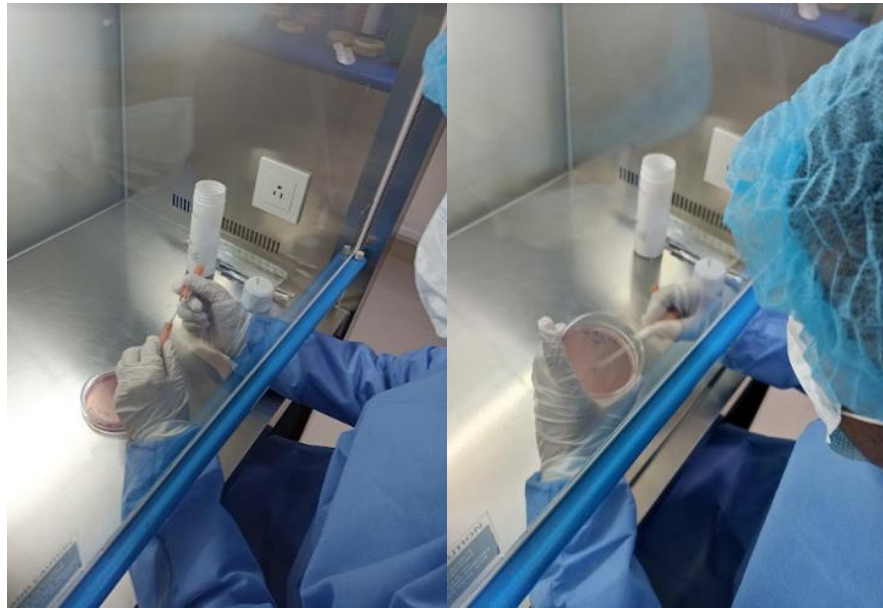




**Figura 4. Preparación del aceite esencial de toronjil a diferentes concentraciones**

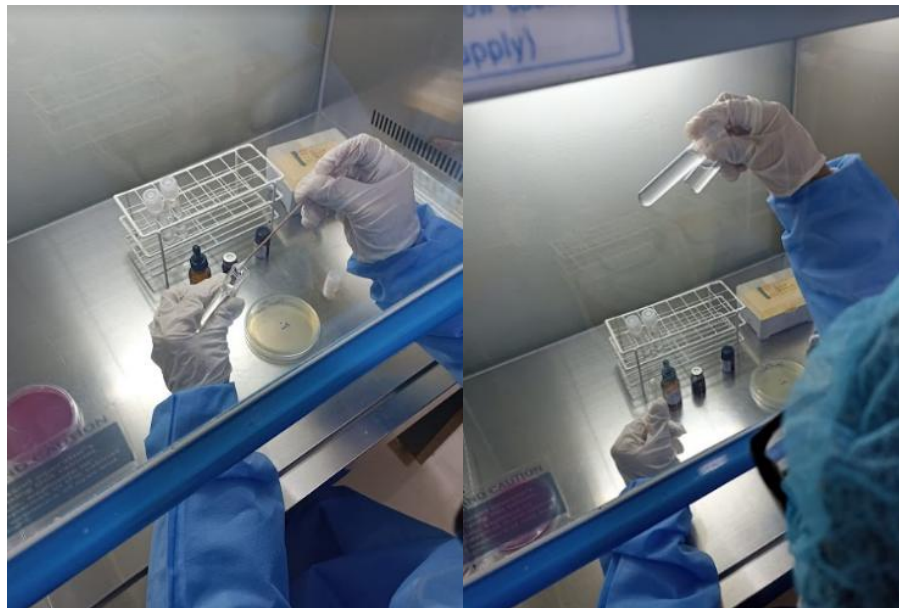
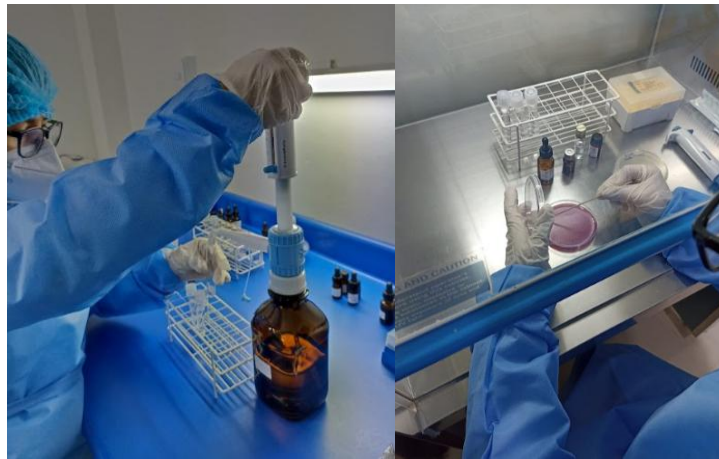


**Figura 5. Activación de Escherichia coli**

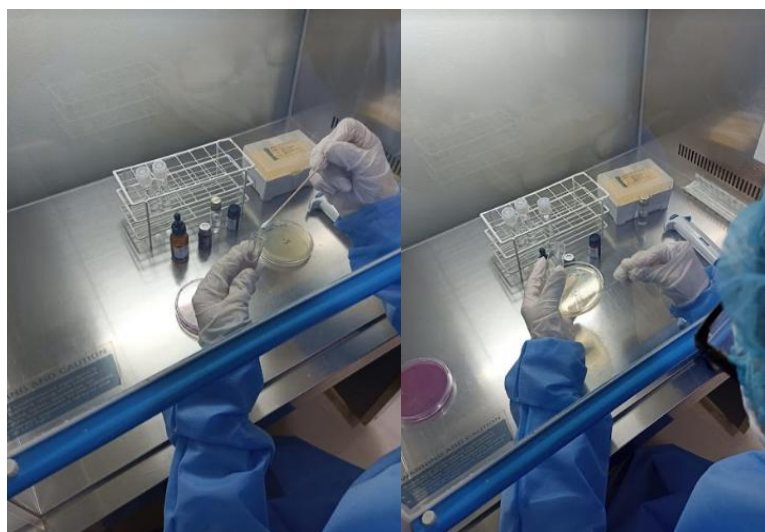


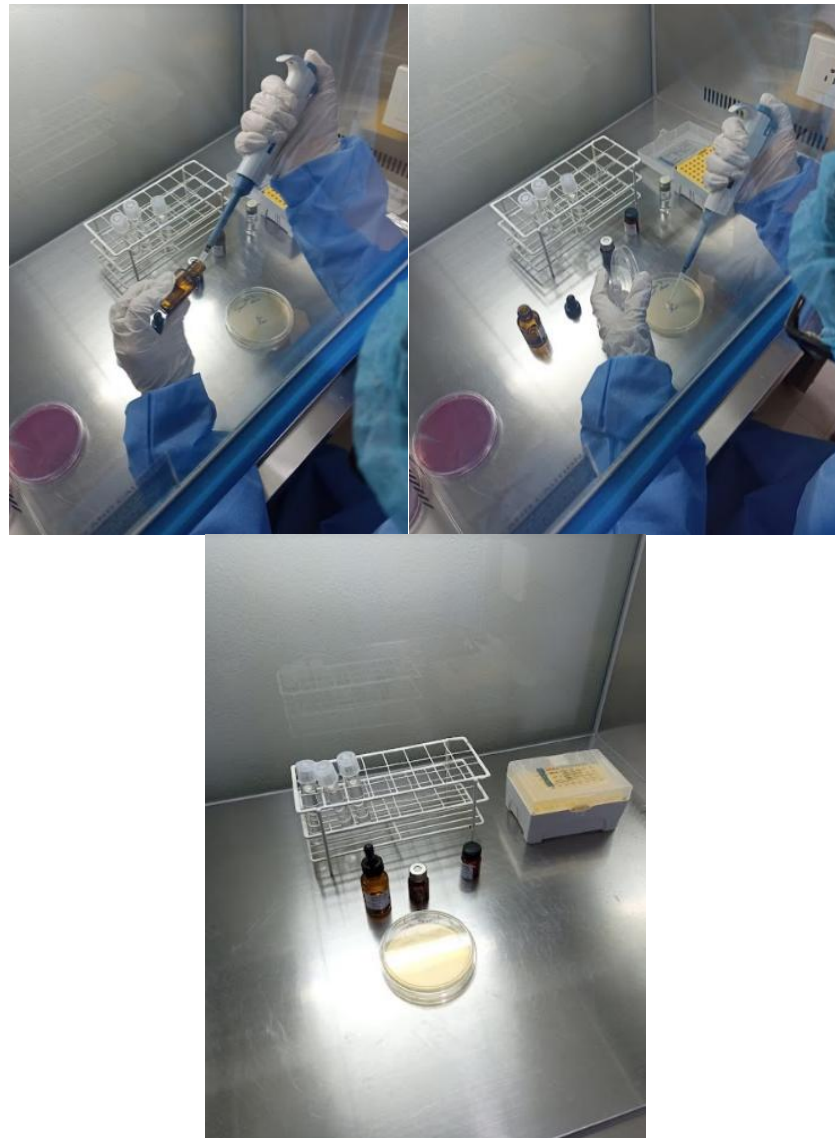
**Figura 6. Preparación de la carga bacteriana**





**Figura 7. Aplicación de la bacteria en los medios de cultivo**





**Figura: 8. Incubación de placas con medio de cultivo**

