



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

**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**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES

BACH. CURO FIESTAS, MILAGROS MARY LUCY

BACH. GONZÁLES VITÓN, MARLENI

ASESOR:

Mg. INOCENTE CAMONES, MIGUEL ANGEL

LIMA- PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mi esposo, José Guadalupe por su amor y apoyo incondicional desde que inicie mi carrera profesional.

A mis hijos Diego y Luciana, quienes son mi fortaleza y mi orgullo, que este ejemplo sirva para ellos como ejemplo para su futuro.

A mis padres, Marco y Yolanda por su amor y por brindarme su confianza en el transcurso de mi carrera universitaria.

Milagros Mary Lucy Curo Fiestas

A mis padres María y Absalón con todo mi amor por haberme inculcado valores en mi vida, por ser mi soporte y haber hecho posible que logre cumplir una de mis metas más anheladas.

A mis hermanos Juana, Milagros, Maritza, Laura, Miguel, Fabiola por todo su apoyo incondicional y por la motivación que me dieron en todo este tiempo.

Marleni Gonzáles Vitón

AGRADECIMIENTO

A nuestro padre celestial por ser la pieza fundamental en nuestra vida, por habernos guiado en este camino, y así cumplir nuestras metas en este trayecto de la vida.

A nuestros docentes por todos sus conocimientos brindados durante la carrera universitaria.

A la universidad María Auxiliadora por habernos dado la oportunidad de pertenecer a su prestigiosa institución.

A nuestro asesor Mg. QF. Miguel Ángel Inocente Camones por su orientación y su apoyo incondicional en el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

Índice General

| | Páginas |
|---------------------------------|----------------|
| Resumen..... | viii |
| Abstract..... | ix |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| III. RESULTADOS..... | 21 |
| IV. DISCUSIÓN..... | 31 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 34 |
| ANEXOS..... | 37 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla N° 1 Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> L. al 100%, 75% y 50%..... | 21 |
| Tabla N° 2 Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el aceite esencial de <i>Melissa officinalis</i> L. al 100%, 75% y 50%..... | 22 |
| Tabla N° 3 Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por los controles, positivo y negativo..... | 23 |
| Tabla N° 4 prueba de normalidad de Kolmogorov- Smirnov modificada por Lilliefors..... | 24 |
| Tabla N° 5 Prueba de homogeneidad de Varianzas..... | 24 |
| Tabla N° 6 Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre los grupos de trabajo..... | 26 |
| Tabla N° 7 Fórmula de la emulsión bebible con aceites esenciales de toronjil y clavo de olor..... | 28 |
| Tabla N° 8 Resultados de Sólidos Solubles de la emulsión bebible con aceites esenciales de toronjil y clavo de olor..... | 29 |
| Tabla N° 9 Resultados de pH de la emulsión bebible con aceites esenciales de toronjil y clavo de olor..... | 29 |
| Tabla N° 10 Resultados del análisis sensorial de la emulsión bebible: ASPECTO..... | 29 |
| Tabla N° 11 Resultados del análisis sensorial de la emulsión bebible: AROMA..... | 30 |
| Tabla N° 12 Resultados del análisis sensorial de la emulsión bebible: SABOR..... | 30 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 01: Estructura de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil)..... | 12 |
| Fig. 02: Fruto seco de <i>Syzygium aromaticum</i> L. (clavo de olor) | 13 |
| Fig. 03: Grafico de medias de los grupos analizados..... | 27 |

Índice de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo A Operacionalización de variables..... | 37 |
| Anexo B Clasificación taxonómica de <i>Melissa officinalis</i> L..... | 38 |
| Anexo C Clasificación taxonómica de <i>Syzygium aromaticum</i> L..... | 39 |
| Anexo D Certificación de la cepa <i>Escherichia coli</i> | 40 |
| Anexo E Fotografía de trabajo..... | 42 |

RESUMEN

Objetivo: Demostrar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (*toronjil*) y *Syzygium aromaticum* L. (*clavo de olor*) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 para establecer una formulación de emulsión bebible con ingredientes inocuos.

Método: Los aceites esenciales (AE) de ambas plantas se obtuvieron por el método de hidrodestilación con arrastre de vapor utilizando las hojas de *Melissa officinalis* L. (*toronjil*) y los botones florales de *Syzygium aromaticum* L. (*clavo de olor*), así mismo se prepararon las concentraciones de los aceites al 50%, 75%, 100%, se reactivó la cepa de *Escherichia coli*, para tal efecto se hizo la determinación por el método de discos de difusión (Kirby-Bauer), además se utilizó un control positivo ciprofloxacino (disco). A partir de los aceites esenciales se desarrolló una formulación de emulsión bebible aceptable.

Resultado: Se determinó los promedios y la desviación estándar para los halos de inhibición de AE de *Syzygium aromaticum* L. $0,367 \pm 13,69$ mm, $0,379 \pm 15,96$ mm, $0,394 \pm 17,77$ mm. AE de *Melissa officinalis* L. $0,361 \pm 8,91$ mm, $0,392 \pm 10,11$ mm, $0,364 \pm 11,99$ mm respectivamente.

Conclusión: Se concluyó que el AE de *Syzygium aromaticum* L. al 100% tiene mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* que el AE de *Melissa officinalis* L. incluso a bajas concentraciones.

Palabras Claves: Efecto antibacteriano, aceites esenciales, *Syzygium aromaticum* L., *Melissa officinalis* L., *Escherichia coli*, formulación.

ABSTRACT

Objective: To demonstrate the antibacterial effect of essential oil of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Syzygium aromaticum* L. (clove) on *Escherichia coli* ATCC 25922 To establish a drinkable emulsion formulation with harmless ingredients.

Method: The essential oils (AE) of both plants were obtained by the hydrodistillation method with steam dragging using the leaves of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and the flower buds of *Syzygium aromaticum* L. (cloves), likewise the concentrations of the oils at 50%, 75%, 100%, the *Escherichia coli* strain was reactivated, for this purpose the determination was made by the diffusion disc method (Kirby-Bauer), in addition a positive control ciprofloxacin (disc) was used. An acceptable drinkable emulsion formulation was developed from the essential oils.

Result: The means and standard deviation were determined for the AE inhibition halos of *Syzygium aromaticum* L. 0.367 ± 13.69 mm, 0.379 ± 15.96 mm, 0.394 ± 17.77 mm. *Melissa officinalis* L. AE 0.361 ± 8.91 mm, 0.392 ± 10.11 mm, 0.364 ± 11.99 mm respectively.

Conclusion: It was concluded that 100% *Syzygium aromaticum* L. AE has a greater antibacterial effect on *Escherichia coli* than *Melissa officinalis* L. AE even at low concentrations.

Key Words: Antibacterial effect, essential oil, *Syzygium aromaticum* L, *Melissa officinalis* L, *Escherichia coli*, formulation.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas causadas por *Escherichia coli* han afectado la salud de niños menores de 5 años, personas adultas y sobre todo personas inmunodeprimidas. A nivel mundial la bacteria es causante de 630 millones de casos de diarrea, y de 7,6 y 6,9 millones de muertes en el año 2016. Asimismo, está vinculado con el 50% de las infecciones del tracto urinario (ITU) intrahospitalarias y el 90% de infecciones de este tipo en pacientes ambulatorios ⁽¹⁾.

En la mayoría de casos la causante de la enfermedad diarreica aguda (EDA) es la bacteria *Escherichia coli* enteropatógena siendo el serotipo más relevante la cepa O157:H7, la cual afecta primordialmente a niños menores de 5 años en América Latina y además a países como África y Asia, y se asocia con un elevado índice de letalidad en niños de condición vulnerable ⁽²⁾.

La cepa de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 causa colitis hemorrágica, púrpura trombocitopénica trombótica, uremia hemolítica; generalmente la forma de contagio se debe al consumo de hamburguesas con escasa cocción, alimentos cárnicos con una cocción insuficiente y mal almacenados, además de productos fermentados, contaminación fecal de alimentos y agua, disminuida higiene, contacto de persona a persona ⁽³⁾.

En el año 2015, en el Hospital Cayetano Heredia de Lima se realizó un estudio a personas que padecían de ITU detectándose continuamente *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido en un 41% de casos, siendo una amenaza para la salud y se asocia a una mayor mortalidad ⁽⁴⁾. Asimismo, en los diferentes servicios del Hospital Regional de Lambayeque ocurren casos de ITU ocasionadas por diferentes microorganismos como la *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* BLEE, perjudicando sobre todo a pacientes inmunodeprimidos, aumentando cada vez más la letalidad ⁽⁵⁾.

La farmacorresistencia se ha convertido en un enorme problema de salud pública mundial. En la actualidad la medicina tradicional se usa como alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades, siendo estudiado el efecto antibacteriano para su posible incorporación en productos farmacéuticos ⁽⁶⁾.

Conforme a lo referido anteriormente, la pregunta de investigación es:

- ¿Cuál será la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) comparado con el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) sobre la cepa de *Escherichia coli* ATCC para su posible incorporación en una emulsión bebible?

Asimismo, se consideran las siguientes preguntas específicas:

- ¿Cuál es la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de toronjil al 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli*?
- ¿Cuál es la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de clavo de olor al 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli*?
- ¿Será comparable la actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Escherichia coli* del aceite esencial de toronjil a 50%, 75% o 100% y el aceite esencial de clavo de olor a 50%, 75% y 100%?
- ¿Será factible desarrollar una emulsión bebible elaborada con los aceites esenciales de toronjil y clavo de olor con actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Escherichia coli*?

La medicina vegetal como alternativa para la salud de las personas es una práctica que no ha disminuido su uso constante, ya que desde tiempos antiguos ha sido utilizada para diversas patologías, siendo vigente en la actualidad para prevenir y aliviar enfermedades o síntomas propios de éstas. Por tal motivo, se debe considerar que las especies vegetales contienen metabolitos secundarios con actividad farmacológica, posibles reacciones adversas, algunas interacciones medicamentosas, debido a ello se evalúa el riesgo beneficioso durante su uso ⁽⁷⁾.

La población con frecuencia sustituye el consumo de productos farmacéuticos por la acción de la medicina tradicional debido a su posible seguridad, eficacia promedio y bajo costo para el consumidor, y cada vez es más conocida y aplicada en el campo de la salud contribuyendo al bienestar de las personas ⁽⁸⁾.

En el año 1988, se integró al sistema de salud de forma gradual la medicina tradicional disponiendo de centros de atención en hospitales del Seguro Social

ESSALUD, donde aproximadamente 50.000 pacientes por año reciben tratamientos con plantas medicinales ⁽⁸⁾.

El Perú posee una enorme variedad de plantas medicinales, en la cual abre el camino para la investigación, actualmente el campo farmacéutico se ha involucrado aceleradamente con la fitoterapia, es importante valorar su uso dado que por mucho tiempo fue el principal recurso terapéutico utilizado para tratar la salud de las personas además de ser usado como base para el desarrollo de nuevos fármacos.

La especie *Melissa officinalis* L. conocida como toronjil o Lemon balm debido a que presenta olor a limón y pertenece a la familia de las Lamiaceae ⁽⁹⁾. Dentro de sus propiedades medicinales se destaca el uso para tratar trastornos gastrointestinales tales como cólicos, náuseas, flatulencias, diarrea además de tener efecto contra bacterias y virus ⁽¹⁰⁾.

La especie *Syzygium aromaticum* L. conocida como clavo, clavo de especias, también como clavo aromático, clavero ⁽¹¹⁾. y pertenece a la familia Myrtaceae ⁽¹²⁾. Dentro de sus propiedades medicinales se destaca el efecto frente a bacterias, virus y hongos, considerando el efecto antiséptico y sedante por ejemplo en odontología. También se usa para tratar enfermedades del aparato digestivo y respiratorio ⁽¹³⁾.



Figura 1. *Melissa officinalis* L. (toronjil)



Figura 2. Fruto seco de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor)

De acuerdo a lo anteriormente descrito se presentan como antecedentes:

Albines W (2020), estudió el efecto antibacteriano del aceite esencial (AE) de *Syzygium aromaticum* L. “clavo de olor” y *Origanum vulgare* “orégano” frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, así mismo, en sus resultados los halos de inhibición y la desviación estándar fueron *Syzygium aromaticum* 100% 20.09 mm \pm 1.87 mm, y para *Origanum vulgare* fue 14.74 mm \pm 0.41 mm demostrando que ambos aceites esenciales tienen efecto antibacteriano⁽¹⁴⁾.

Jacome J (2019), realizó la evaluación del efecto bactericida de aceites de canela (*Cinnamomun verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) para aplicaciones agroindustriales, siendo los resultados la inhibición para el AE de canela que produjo el halo más grande 42,33 \pm 0,95 mm, para *S. aureus*, así mismo para *E. coli* su diámetro fue 29,89 mm, seguido de *E. faecalis* 22,33 \pm 2,83 mm además el AE de *Syzygium aromaticum* mostró un halo de inhibición de 12,33 sobre *E. coli*. Se demostró que los AE presentaron efecto bactericida⁽¹⁵⁾.

Gonzales L (2018), evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del AE de *Syzygium aromaticum* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con

ciprofloxacino, siendo los promedios y desviación estándar de 19,6 mm para el AE de *Syzygium aromaticum* al 100%, 15,4 mm al 75%, 12,1 mm al 50%, 8,7 mm al 25% así mismo la medida del halo de inhibición del ciprofloxacino 29 mm demostrando que el AE de *Syzygium aromaticum* presenta dicho efecto en altas concentraciones y posee menor efecto que el ciprofloxacino ⁽¹⁶⁾.

Sánchez K (2017), estudió el efecto antibacteriano *in vitro* del AE de *Syzygium aromaticum* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, por lo cual en sus resultados se observó que la mayor medida del halo de inhibición fue de 31.8 mm al 90% se concluyó que el AE de *Syzygium aromaticum* presenta mejor efecto antibacteriano al 90% ⁽¹⁷⁾.

Ugalde M, *et al* (2016), determinó la actividad antibacteriana y antioxidante de los AE comerciales de romero, clavo, orégano y salvia, así mismo se realizó la medida de los halos de inhibición y la desviación estándar para el AE de clavo de olor en *E. coli* 16.67 mm \pm 1.15, orégano en *E. coli* 19.33 mm \pm 1.53, romero en *E. coli* 19.3 mm \pm 1.25, demostrando que los aceites esenciales presentan tal actividad con excepción de salvia ⁽¹⁸⁾.

Deza F (2015), evaluó la eficacia antimicrobiana del AE de *Origanum vulgare* comparado con el AE de *Melissa officinalis* contra *Escherichia coli* ATCC 25922, por lo tanto, sus resultados mostraron los halos de inhibición del AE de *Origanum vulgare* 14,20 mm, *Melissa officinalis* 7,69mm y el grupo de control gentamicina 18,95 mm, por consiguiente, se concluye que el AE de *Origanum vulgare* presenta mayor eficacia antibacteriana sobre *E. coli* ⁽¹⁹⁾.

Cava R, estudió el efecto antimicrobiano de vainilla y de aceites esenciales de canela y clavo en leche de vaca pasteurizada se concluye que el AE de eugenol presenta actividad bacteriana considerable frente a *E. coli* O157: H7, seguido por el AE de clavo, el AE de hojas de canela, el cinamaldehído y el AE de corteza de canela ⁽²⁰⁾.

Se justifica el estudio debido a que el uso de las plantas medicinales proviene de las culturas ancestrales y han sido aprovechadas por sus diversas propiedades, actualmente constituye un amplio campo en la investigación, así como de beneficio

para la atención primaria de salud. *Escherichia coli* es una bacteria patógena peligrosa que podría causar la muerte del paciente infectado, el aceite esencial de toronjil y clavo de olor posee propiedades antibacterianas contra la bacteria *Escherichia coli*. Por ello, se realizó la investigación con la finalidad proyectista de generar un producto farmacéutico que contenga el AE con mayor actividad antibacteriana y dosificado para el tratamiento como coadyuvante, preventivo o erradicar infecciones ocasionadas por *E. coli*, contribuyendo a mejorar la salud de los pacientes infectados.

De acuerdo al planteamiento del problema, el objetivo del estudio es comparar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) con el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) sobre *Escherichia coli*, para su posible incorporación en una emulsión bebible

Siendo sus objetivos específicos los siguientes:

- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) sobre *Escherichia coli*.
- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. sobre *Escherichia coli*.
- Desarrollar una formulación de una emulsión bebible con la mezcla de los aceites esenciales de toronjil y clavo de olor.

De acuerdo con los objetivos se considera como hipótesis de estudio lo siguiente:

- El aceite esencial de toronjil presenta actividad antibacteriana mayor que el ciprofloxacino frente a *Escherichia coli*.
- El aceite esencial de clavo de olor presenta una actividad antibacteriana mayor que el ciprofloxacino frente a *Escherichia coli*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente estudio tiene un enfoque cuantitativo, se empleará un diseño experimental porque el investigador va manipular intencionalmente la variable independiente para obtener efecto sobre la variable dependiente

Analítico: nos va demostrar la relación que existe entre las variables.

Deductivo: porque el estudio va de lo general a lo específico.

Prospectivo: se va recolectar los datos correspondientes a los hechos que ocurren después de iniciada la investigación.

Transversal: se va recopilar los datos en un solo momento y en un tiempo único.

2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

La población estará compuesta por las especies vegetales de toronjil y clavo de olor colectados mediante muestreo no aleatorizado, de las cuales se obtuvo la muestra de aceite esencial de toronjil y aceite esencial de clavo de olor mediante extracción por arrastre de vapor en un equipo semi-industrial de la empresa Proyectos GP EIRL.

Se llevó el material vegetal para realizar su evaluación taxonómica en el Herbario de la Universidad Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque.

Luego, se procedió a deshojar la muestra vegetal de toronjil desechando los tallos y aquellas hojas que estuvieran en malas condiciones como rotas o con insectos, luego se procedió a pesar en la cual se obtuvo 5 kg de planta. Se procedió a revisar los botones florales de clavo de olor en la cual se encontró en buen estado y se procedió a pesar 1 kg.

Por separado se inició lavando adecuadamente la materia vegetal para eliminar todos los contaminantes externos que tuviera el vegetal con agua potable al inicio y luego con agua destilada, luego son dirigidas al equipo hidroddestilador de modo que

forme un estrato firme y comprimido, su estado puede ser planta completa, triturada, recortada, o la combinación de estos. El vapor de agua es administrado por medio de un repartidor interno cerca de su base y con la presión apta para aventajar la resistencia hidráulica del estrato. Cuando el vapor tiene contacto con el estrato, la materia se calienta y va librando el aceite esencial y este, a su vez, dado a que es muy volátil se va disipando. Al mezclarse el vapor saturado y aceite esencial, discurre a un condensador, luego es condensado y enfriado, a temperatura ambiente. Por último, a la salida del condensador, extraemos una solución líquida inconstante para luego ser separada por un embudo de decantación.

Otra unidad de análisis es la cepa de *Escherichia Coli* ATCC 25922 obtenida del laboratorio viable cultivada por 24 horas y se excluyó cepas que estuvieron contaminadas.

2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación presenta como variables principales a los aceites esenciales considerando que son variables cualitativas y su escala es nominal.

Variable independiente: Aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor).

Variable Dependiente: actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.4 TÉCNICA E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

En cuanto al instrumento que se va utilizar para la extracción del aceite esencial es la ficha de recolección de datos y el uso de un vernier que medirá el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano para cada una de las concentraciones de aceite esencial de *Melissa officinalis* L y *Syzygium aromaticum* L. ⁽¹⁶⁾ ⁽²¹⁾.

2.5 PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

2.5.1 Determinación de la actividad anti *Escherichia coli*

El estudio microbiológico se realizó en el laboratorio MICROCLIN.

a) Dilución del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

Se empezó diluyendo el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 100%, para obtener la concentración al 75% se colocó en una fiola 1.5 ml de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) con 0.5 ml de dimetilsulfóxido. Así mismo para la concentración de 50% de aceite esencial se utilizó 1.0 ml de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) con 1.0 ml de dimetilsulfóxido.

b) Dilución del aceite esencial de *Melissa officinalis*

Se empezó diluyendo el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. al 100%, para obtener la concentración al 75% se colocó 1.5 ml de aceite esencial de *Melissa Officinalis* L. (toronjil) con 0.5 ml de dimetilsulfóxido, así mismo para la concentración de 50% de aceite esencial se utilizó 1.0 ml de aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) con 1.0 ml de dimetilsulfóxido.

c) Activación de la cepa

Para la activación de la cepa *Escherichia coli*, se empezó esterilizando el ambiente de laboratorio, cogemos el tubo plástico en la cual contiene la cepa, liberamos el fluido de hidratación presionando la parte superior hacemos un aplastamiento con acción de pellizcos con la finalidad que el fluido contenido en el tubo fluya hacia la parte inferior del eje del hisopo y haya una homogenización con los líofilos de la cepa para así poder activarlas, luego giramos el hisopo e inoculamos en el medio de cultivo.

d) Preparación del Agar Müller Hinton

En 1 litro de agua purificada fundir 37 g del agar, se deja absorber de 10 a 15 minutos. Luego se coloca en Baño María, hervimos durante 1 minuto para su completa dilución. Se esterilizó en autoclave a 121° C durante 15 minutos, Enfriar 30 minutos verter en placas petri estériles, en espesor de 4mm almacenamos de 2°C a 8°C, puede conservarse hasta por dos semanas.

e) Preparación del inóculo

Se seleccionó las colonias en estudio, en las cuales habían sido incubadas de 18 a 24 horas. Así mismo se transfirió en un tubo de ensayo con 5 ml de cloruro de sodio, con la finalidad de obtener una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mac Farland. (1.5×10^8 UFC/mL), luego se procedió con el sembrado, además de distribuir las cepas correctamente.

f) Siembra de la muestra

Con un hisopo estéril se inoculó la suspensión del microorganismo en estudio sobre la superficie de la placa agar, eliminando el exceso girando por la pared interna del tubo. Luego se frota el hisopo sobre el cultivo, se realiza por tres veces. Se tapa la placa y dejamos secar de 5 a 20 minutos. Después de la siembra se impregna 5 discos en la periferia y 1 en el centro sobre la superficie de la placa agar mediante pinzas estériles con una distancia de 2 cm de disco a disco para un buen contacto con el medio de cultivo.

g) Incubación

Las placas se incuban en posición invertidas de 16 -18 horas de 35 a 37° C. después de la incubación y se mide el diámetro de la zona de inhibición.

2.5.2 Formulación de la emulsión bebible

La formulación se elaboró en el Instituto de Investigación Traslacional y Biotransversal Ayru SAC.

2.5.3 Análisis sensorial de la emulsión bebible

En el análisis sensorial se evaluó aspecto, aroma y sabor.

2.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para la realización de los análisis estadísticos del presente estudio se realizará mediante software estadístico SPSS ver.24 (2020); por lo cual nos permitirá elaborar los promedios y la desviación estándar de las diferentes concentraciones del

material a trabajar como también de los controles positivo y negativo, además de la prueba de normalidad de kolmogorow-smirnow modificada por Lilliefors, prueba de homogeneidad de varianzas (Levene), prueba de tukey para comparaciones múltiples entre grupos de trabajo y el gráfico de medias de los grupos analizados.

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

Los principios éticos que se consideraron en el desarrollo de este trabajo son los siguientes:

- Cuidar del bienestar de las personas que se han comprometido a formar parte de la investigación de *Melissa officinalis L.* y *Syzygium aromaticum L.*
- El investigador debe tomar las precauciones que sean necesarias para trabajar con seguridad y honestidad en el laboratorio.
- La responsabilidad será primordial en toda actividad científica, el aplicarlo ayudará en el ejercicio de nuestra profesión.
- El laboratorio cuenta con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

III. RESULTADOS

3.1 De la determinación de la actividad anti *Escherichia coli*

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) al 100%, 75% y 50%

| Muestra | <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) Concentración de Porcentaje | | |
|----------------------------|--|-------|-------|
| | 100% | 75% | 50% |
| 1 | 17,2 | 15,2 | 13,0 |
| 2 | 17,2 | 15,3 | 13,2 |
| 3 | 17,3 | 15,5 | 13,4 |
| 4 | 17,5 | 15,8 | 13,5 |
| 5 | 17,5 | 15,9 | 13,5 |
| 6 | 17,6 | 15,9 | 13,6 |
| 7 | 17,6 | 16,0 | 13,6 |
| 8 | 17,8 | 16,0 | 13,7 |
| 9 | 17,8 | 16,1 | 13,7 |
| 10 | 17,9 | 16,1 | 13,8 |
| 11 | 18,1 | 16,2 | 13,8 |
| 12 | 18,1 | 16,2 | 13,9 |
| 13 | 18,2 | 16,3 | 14,1 |
| 14 | 18,3 | 16,4 | 14,2 |
| 15 | 18,4 | 16,5 | 14,4 |
| Promedio | 17,77 | 15,96 | 13,69 |
| Desviación Estándar | 0,394 | 0,379 | 0,367 |

En la tabla 1 se muestra el diámetro de los halos de inhibición medidos en milímetros al someter el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) a las diferentes concentraciones del 100%, 75% y 50% sobre cultivos en placa Petri de *Escherichia coli*, nótese que el tamaño de los halos de inhibición formados se relaciona directamente proporcional a la concentración del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor). Se muestra el promedio de los halos de inhibición y la desviación estándar.

Tabla 2. Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) al 100%, 75% y 50% sobre *Escherichia coli*

| Muestra | <i>Melissa officinalis</i> (Toronjil) Concentracion en Porcentaje | | |
|----------------------------|---|-------|-------|
| | 100% | 75% | 50% |
| 1 | 11,4 | 9,5 | 8,3 |
| 2 | 11,5 | 9,6 | 8,4 |
| 3 | 11,6 | 9,7 | 8,5 |
| 4 | 11,7 | 9,8 | 8,6 |
| 5 | 11,8 | 9,9 | 8,7 |
| 6 | 11,8 | 9,9 | 8,8 |
| 7 | 11,9 | 10,0 | 8,9 |
| 8 | 12,0 | 10,0 | 8,9 |
| 9 | 12,0 | 10,1 | 9,0 |
| 10 | 12,1 | 10,3 | 9,0 |
| 11 | 12,2 | 10,4 | 9,1 |
| 12 | 12,3 | 10,5 | 9,2 |
| 13 | 12,4 | 10,5 | 9,3 |
| 14 | 12,5 | 10,6 | 9,4 |
| 15 | 12,6 | 10,8 | 9,5 |
| Promedio | 11,99 | 10,11 | 8,91 |
| Desviación Estándar | 0,364 | 0,392 | 0,361 |

En la tabla 2 se muestra el diámetro de los halos de inhibición medidos en milímetros al someter el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) a las diferentes concentraciones del 100%, 75% y 50% sobre cultivos en placa Petri de *Escherichia Coli* nótese que el tamaño de los halos de inhibición formados también se relaciona directamente proporcional a la concentración como el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) pero en menor escala. Se muestra el promedio de los halos de inhibición y la desviación estándar.

Tabla 3. Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por los controles, positivo (ciprofloxacino) y negativo (etanol) sobre *Escherichia coli*

| Muestra | Controles | |
|----------------------------|-------------|-------------|
| | Control (+) | Control (-) |
| 1 | 26,7 | 6,0 |
| 2 | 26,9 | 6,0 |
| 3 | 27,0 | 6,2 |
| 4 | 27,1 | 6,3 |
| 5 | 27,2 | 6,4 |
| 6 | 27,3 | 6,4 |
| 7 | 27,4 | 6,5 |
| 8 | 27,4 | 6,5 |
| 9 | 27,4 | 6,6 |
| 10 | 27,5 | 6,8 |
| 11 | 27,5 | 6,9 |
| 12 | 27,7 | 7,0 |
| 13 | 27,8 | 7,0 |
| 14 | 27,9 | 7,1 |
| 15 | 28,0 | 7,2 |
| Promedio | 27,39 | 6,59 |
| Desviación Estándar | 0,370 | 0,390 |

En la tabla 3 se muestra el diámetro de los halos de inhibición medidos en milímetros al someter cultivos de *Escherichia coli* a discos de ciprofloxacino empleado como control positivo y discos con etanol de 96° empleado como control negativo. Se muestra el promedio de los halos de inhibición y la desviación estándar.

Tabla 4. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov modificada por Lilliefors.

| Grupos de Trabajo | | Kolmogorv-Smirnov ^a | | |
|---------------------------------|--|--------------------------------|----|--------|
| | | Estadístico | gl | Sig |
| Diámetro del halo de inhibición | Aceite -esencial de clavo de olor (100%) | 0,135 | 15 | 0,200* |
| | Aceite -esencial de clavo de olor (75%) | 0,171 | 15 | 0,200* |
| | Aceite -esencial de clavo de olor (50%) | 0,119 | 15 | 0,200* |
| | Aceite - esencial de toronjil (100%) | 0,096 | 15 | 0,200* |
| | Aceite esencial de toronjil (75%) | 0,141 | 15 | 0,200* |
| | Aceite – esencial de toronjil (50%) | 0,093 | 15 | 0,200* |
| | Control positivo (ciprofloxacino) | 0,114 | 15 | 0,200* |
| | Control negativo (etanol) | 0,128 | 15 | 0,200* |

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

a. Corrección de significación de Lilliefors.

En la tabla 4 se muestra el análisis estadístico para demostrar la normalidad de las medias de los datos obtenidos en cada grupo en relación al tamaño del halo de inhibición obtenido mediante la aplicación de la prueba de Kolmogorov- Smirnov modificada por Lilliefors, se observa un límite inferior de la significación verdadera de 0,20 superior al nivel de significancia establecido en el estudio que es de 0,05 por lo tanto, se confirma que los datos corresponden a una distribución normal.

Tabla 5. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)

| Diámetro del halo de inhibición | | | |
|---------------------------------|-------|---------|-------|
| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig |
| 0,173 | 7,000 | 112,000 | 0,990 |

En la tabla 5 se muestra el análisis estadístico para demostrar la normalidad de las varianzas mediante la prueba de homogeneidad de varianzas o prueba de Levene,

mediante la aplicación de esta prueba demostramos que si existe normalidad en los datos a obtener un nivel de significancia de 0.99 superior al 0.05 establecido, por lo tanto, se considera que los datos corresponden a una distribución normal.

En la tabla 6: se muestra el analisis estadistico mediante el software spss version 24 aplicando la prueba de tukey para los datos correspondientes a una distribución normal, se observa que los grupos de datos tanto de *Melissa officinalis L.* (toronjil), *Syzygium aromaticum L.* (clavo de olor) y los controles positivo y negativo no presentan ninguna correspondencia entre ellos por lo que sus efectos antibacterianos no son iguales.

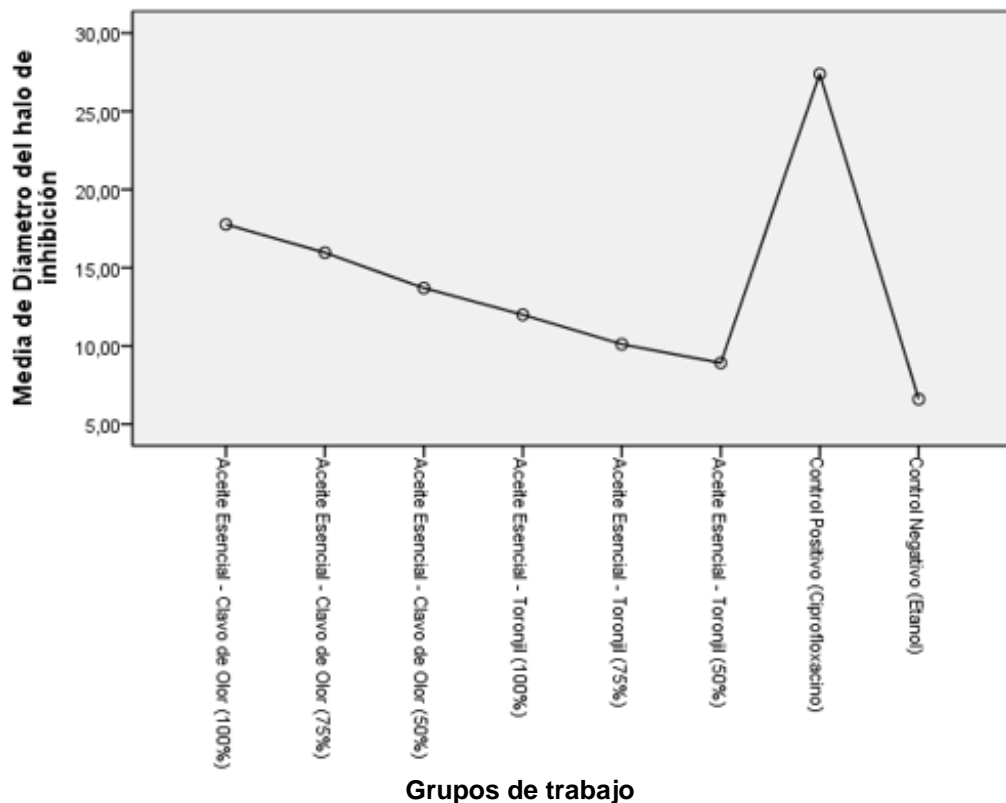
Tabla 6. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre los grupos

| Diámetro del Halo de Inhibición | | | | | | | | | |
|---|--------|------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| HSD Tukey ^a | | | | | | | | | |
| Grupos de Trabajo | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Control negativo (Etanol) | 1 5 | 6,593 3 | | | | | | | |
| Aceite Esencial de Toronjil (50%) | 1 5 | | 8,906 7 | | | | | | |
| Aceite Esencial de Toronjil (75%) | 1 5 | | | 10,10 67 | | | | | |
| Aceite Esencial de Toronjil (100%) | 1 5 | | | | 11,98 67 | | | | |
| Aceite Esencial de Clavo de Olor (50%) | 1 5 | | | | | 13,69 33 | | | |
| Aceite Esencial de Clavo de Olor (75%) | 1 5 | | | | | | 15,96 00 | | |
| Aceite Esencial de Clavo de Olor (100%) | 1 5 | | | | | | | 17,76 67 | |
| Control Positivo (Ciprofloxacino) | 1 5 | | | | | | | | 27,38 67 |
| Sig | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

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

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

Figura 3. Gráfico de medias de los grupos analizados



En la figura 3 se observa el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil), *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) a distintas concentraciones y los controles positivo y negativo sobre cultivos de *Escherichia coli*, podemos apreciar que ninguna concentración y control presentan el mismo efecto, del mismo modo existe una relación lineal creciente del efecto antibacteriano de *Melissa officinalis* L. (toronjil), *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) sobre cultivos de *Escherichia coli*, en relación a su concentración, así mismo se observa que *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) presenta mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* que *Melissa officinalis* L. (toronjil), incluso a bajas concentraciones.

Tabla 7. Fórmula de la emulsión bebible con AE de toronjil y clavo

| Insumos | Concentración (%) | | |
|----------------------------------|-------------------|--------|--------|
| | E101 | E102 | E103 |
| Esencia acuosa de toronjil | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Aceite esencial de clavo de olor | 1.00 | 1.50 | 2.00 |
| Sorbitol al 70% | 1.50 | 1.50 | 1.50 |
| Sacarosa | 4.50 | 5.50 | 6.50 |
| Tween 20 | 0.65 | 0.65 | 0.65 |
| Ácido cítrico | 1.25 | 1.25 | 1.25 |
| Citrato de sodio | 0.55 | 0.55 | 0.55 |
| Sacarina sódica | 0.60 | 0.70 | 0.80 |
| Esencia de cereza | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| Sorbato de potasio | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| Agua desionizada csp. | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

Método operativo

- a) En un beacker A de 250 mL se adiciona 50 mL de agua desionizada y sacarosa y se calienta a 70°C.
- b) Luego se adiciona sorbato de potasio, sacarina sódica, ácido cítrico y citrato de sodio en constante agitación.
- c) En otro beacker B se mezcla el sorbitol al 70%, tween 20 y aceite esencial de clavo de olor, y se calienta a 50°C en Baño María.
- d) Luego se adiciona el contenido del beacker B al beacker A en agitación constante.
- e) En agitación constante se adiciona la esencia de cereza y la esencia acuosa de toronjil.
- f) Se envasa la emulsión bebible.

Tabla 8. Resultados de Sólidos Solubles (°Brix) (g/100 g de muestra original) de la emulsión bebible con aceites esenciales de toronjil y clavo de olor

| MUESTRA | Sólidos solubles (°Brix) (g/100 g muestra) | | |
|---------|--|--------------|--------------|
| | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 |
| E101 | 8.5 | 8.3 | 8.3 |
| E102 | 11.8 | 11.7 | 11.7 |
| E103 | 12.4 | 12.3 | 12.6 |

Tabla 9 Resultados de pH de la emulsión bebible con aceites esenciales de toronjil y clavo de olor

| MUESTRA | pH | | |
|---------|--------------|--------------|--------------|
| | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 |
| E101 | 5.77 | 5.68 | 5.78 |
| E102 | 5.41 | 5.37 | 5.49 |
| E103 | 6.32 | 6.36 | 6.31 |

Tabla 10: Resultados del análisis sensorial de la emulsión bebible: ASPECTO

| ASPECTO | | N | % |
|--------------|----------------------------|-----------|----------------|
| E101 | Me disgusta mucho | 0 | 0.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 1 | 10.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 2 | 20.00% |
| | Me gusta moderadamente | 4 | 40.00% |
| | Me gusta mucho | 3 | 30.00% |
| E102 | Me disgusta mucho | 3 | 30.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 6 | 60.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 0 | 0.00% |
| | Me gusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | Me gusta mucho | 1 | 10.00% |
| E103 | Me disgusta mucho | 2 | 20.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 1 | 10.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 6 | 60.00% |
| | Me gusta moderadamente | 1 | 10.00% |
| | Me gusta mucho | 0 | 0.00% |
| TOTAL | | 10 | 100.00% |

Tabla11: Resultados del análisis sensorial de la emulsión bebible: AROMA

| AROMA | | N | % |
|--------------|----------------------------|-----------|----------------|
| E101 | Me disgusta mucho | 1 | 10.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 0 | 0.00% |
| | Me gusta moderadamente | 1 | 10.00% |
| | Me gusta mucho | 8 | 80.00% |
| E102 | Me disgusta mucho | 0 | 0.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 1 | 10.00% |
| | Me gusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | Me gusta mucho | 9 | 90.00% |
| E103 | Me disgusta mucho | 0 | 0.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 1 | 10.00% |
| | Me gusta moderadamente | 2 | 20.00% |
| | Me gusta mucho | 7 | 70.00% |
| Total | | 10 | 100.00% |

Tabla 12: Resultados del análisis sensorial de la emulsión bebible: SABOR

| SABOR | | N | % |
|--------------|----------------------------|-----------|----------------|
| E101 | Me disgusta mucho | 0 | 0.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 2 | 20.00% |
| | Me gusta moderadamente | 2 | 20.00% |
| | Me gusta mucho | 6 | 60.00% |
| E102 | Me disgusta mucho | 0 | 0.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 1 | 10.00% |
| | Me gusta moderadamente | 1 | 10.00% |
| | Me gusta mucho | 8 | 80.00% |
| E103 | Me disgusta mucho | 0 | 0.00% |
| | Me disgusta moderadamente | 0 | 0.00% |
| | No me gusta ni me disgusta | 1 | 10.00% |
| | Me gusta moderadamente | 3 | 30.00% |
| | Me gusta mucho | 6 | 60.00% |
| Total | | 10 | 100.00% |

IV. DISCUSIÓN

4.1 Discusión

En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor), sobre *Escherichia coli* por lo cual se observa que el mayor halo de inhibición presentó *Syzygium aromaticum* L. (100%) con un promedio de $17,77 \text{ mm} \pm 0,394$ a diferencia de *Melissa officinalis* L. (100%) que obtuvo un promedio de $11,99 \pm 0,364$ en la cual presentan una diferencia significativa.

Esto demuestra que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) y el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. (toronjil) inhiben el crecimiento de cepas bacterianas de *Escherichia coli*, siendo el AE de *Syzygium aromaticum* L. el que presenta el mayor efecto. Estos datos son comparables con los de Ugalde M et al⁽¹⁸⁾. Quien demostró la actividad antibacteriana de clavo de olor sobre *E. coli* identificando compuestos como el eugenol en 89,58% presentando un promedio de $16.67 \text{ mm} \pm 1.15$; sin embargo, ambos estudios tienen resultados favorables.

Por lo tanto, Jacome J⁽¹⁵⁾, quien al estudiar la actividad antibacteriana del AE de *Syzygium aromaticum* L. obtenido por el método de hidrodestilación demostró su actividad inhibitoria de 12,33 mm sobre *E. coli* de la misma manera estos estudios tienen relación con los estudios de Cava R⁽²⁰⁾, quien determinó que el aceite esencial de clavo de olor presenta efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli*.

Jacome J⁽¹⁵⁾, afirma que el clavo de olor en su composición presenta alcaloides y oxhidrilos fenólicos en la cual le atribuyen el efecto antimicrobiano siendo el eugenol el mayor compuesto que le da esta acción.

Por otro lado, Sánchez K⁽¹⁷⁾, demostró el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. a diferentes concentraciones 50%, 70%, 90% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 presentando la mayor medida del halo al 90% con 31.8 mm concluyendo que a elevadas concentraciones de AE de *Syzygium aromaticum* L. es más eficaz contra *S. mutans*.

De igual manera Deza F ⁽¹⁹⁾. Evaluó la actividad antimicrobiana del AE de *Melissa officinalis* L. (toronjil) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 en la cual la medida del halo de inhibición fue de 7,69 mm demostrando que presenta efecto inhibitorio sobre la misma.

El estudio de investigación encontró que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. y *Melissa officinalis* L. al 100% causo mayor sensibilidad a *Escherichia coli* a diferencia del 50% y 75% cabe indicar que a mayores concentraciones el efecto antibacteriano es más eficaz.

Además, se realizaron comparaciones utilizando un control positivo ciprofloxacino en la cual presentó un máximo diámetro del halo de inhibición y su desviación estándar de 27,39 mm \pm 0,370 y como control negativo etanol al 96% su promedio fue de 6,59 mm \pm 0,390 lo que indica la sensibilidad de *Escherichia coli* frente a ciprofloxacino, demostrando también que el etanol tiene poder antiséptico sobre *E. coli*.

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* tiene entre sus compuestos al eugenol, fenoles, taninos ⁽²²⁾. *Melissa officinalis* L. presenta monoterpenos, sesquiterpenos, además de ácido cinámico, flavonoides y taninos ⁽²³⁾. los componentes en conjunto que contiene cada planta medicinal le atribuyen el efecto antibacteriano, siendo el *Syzygium aromaticum* L. quien presenta el mayor efecto.

Al hacer las comparaciones con las diferentes investigaciones de *Syzygium aromaticum* L. se demuestra que la diferencia es mínima esto puede deberse a los diferentes factores como los compuestos químicos, así como la calidad de los aceites esenciales podrían verse perjudicados por la recolección, lugar de origen presentando inconvenientes en la elaboración del aceite esencial.

4.2 Conclusiones

- Se demostró que el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. y *Syzygium aromaticum* L. presenta efecto antibacteriano a concentraciones de 50%, 75% y 100% sobre cepas de *Escherichia coli*.

- El aceite esencial de *Melissa officinalis* L. al 50%, 75% y 100% presenta efecto antibacteriano con halos de inhibición promedio de 11.99 mm; 10,11 mm; 8,91mm.
- El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. al 50%, 75% y 100% presenta efecto antibacteriano con halos de inhibición promedio de 17,77mm; 15,96 mm; 13,69 mm.
- El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. al 100% presentó mayor efecto antibacteriano en comparación con *Melissa officinalis* L. al 100% sobre *Escherichia coli* en la cual la diferencia fue significativa donde el halo de mayor inhibición fue de *Syzygium aromaticum* L. 17,77 mm.

4.3 Recomendaciones

- Realizar estudios donde se evalúe el efecto sinérgico de los aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) con el aceite esencial de diferentes plantas.
- Incrementar las investigaciones de *Syzygium aromaticum* L. y *Melissa officinalis* L. evaluando su eficacia, sus beneficios que nos brinda para el mantenimiento de la salud de las personas.
- Fomentar a realizar más investigaciones de plantas medicinales ya que son más accesibles, y con menos efectos adversos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farfán García E, et al. Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. Revista Chilena Infectología. 2016 Julio; 33(04).
2. Gómez Duarte OG. Enfermedad Diarreica Aguda Por Escherichia Coli Patógenas en Colombia. Rev Chilena Infectol. 2016 Junio; 31(5).
3. Oderiz S, et al.. Detección y caracterización De Escherichia coli productor De toxina Shiga en niños atendidos en hospital pediátrico interzonal De la ciudad De la Plata. Revista Argentina de Microbiología. 2018 enero; 50(4).
4. Valdez Fernandez Baca M. Escherichia Coli Productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), un Problema Creciente en Nuestros Pacientes. Revista Medica Herediana. 2017 Julio; 28(03).
5. Díaz Maldonado C, et al. Caracterización Molecular Mediante ERIC-PCR y REP-PCR De Escherichia Coli y Klebsiella Pneumoniae Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido Aisladas de Pacientes con Infecciones Urinarias Intrahospitalarias. Hospital Regional Lambayeque. Junio -. 2017. Tesis para optar el título profesional de licenciado en: Biología – Microbiología y Parasitología] Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque, 2017.
6. Nolasco Maylle A, et al.. Efecto Antibacteriano In Vitro del Jarabe con Extracto Hidroalcohólico De Las Hojas de Passiflora Ligularis Juss. "granadilla" Frente a la Cepa de Staphylococcus Aureus ATCC 2593. 2020. tesis para optar el título de químico farmacéutico.
7. Rodríguez N, et al.. Actualidad De Las Plantas Medicinales en Terapéutica. Acta Farmacéutica Portuguesa. 2015; 4(01).
8. Villar López , et al.. Conocimiento, aceptación y uso de la medicina tradicional, alternativa y/o complementaria por médicos del seguro social de salud. Revista peruana de medicina integrativa. 2016 febrero; 1(1).

9. Acevedo D, et al.. Composición química del aceite esencial de las hojas de toronjil (*melissa officinalis*). Información Tecnológica. 2013 Febrero; 24(4).
10. Buendía Ochoa JP. Efecto sedante del extracto alcohólico de las hojas y flores de *melissa officinalis* “toronjil” mas *matricaria chamomilla* “manzanilla” sobre la ansiedad inducida en ratones albinos. 2015. Para optar al Grado Académico de Magister en Farmacología con mención en Farmacología Experimental.
11. Enrrich M. Botanical on Line. [Online]. Piura; 2020 [cited 2020 agosto 15. Available from: <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/clavo-olor-propiedades-caracteristicas>.
12. González Castro D. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la especia clavo de olor (*syzygium spp.*) En aceite esencial en un producto cárnico maduro frente a microorganismos criterio microbiológico según la ntc 1325. 2018. Proyecto de Investigación Presentado Como Requisito Para Optar al Título de: Bacterióloga.
13. Dávila martel bc. Eficacia del *syzygium aromaticum* frente a la benzocaína al 2% como anestésico tópico de la mucosa oral en adultos huánuco 2016. 2017. Tesis Para Optar el Título Profesional de : Cirujano Dentista.
14. Albines Nizama WA. efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *syzygium aromaticum* "y *origanum Vulgare* "oregano" frente a *streptococcus mutans atcc 25175*. 2020. Su Tesis Fue Para Opatr el Título de Estomatólogo.
15. Jacome Jurado JA. Evaluacion del efecto bactericida de aceites de canela (*cinnamomun verum*), jengibre (*zingiber officinale*) y clavo de olor (*syzygium aromaticum*) para aplicaciones agroindustriales”. 2019. Tesis Para Optar el Título de Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos.
16. Gonzales Deza LB. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *syzygium aromaticum* sobre cepas de *staphylococcus aureus atcc25923* comparado

con ciprofloxacino, estudio in vitro. 2018. Tesis Para Optar el Título de Médico.

17. Sanchez Arevalo KL. "Efecto antibacteriano, in vitro, del aceite esencial de *syzygium aromaticum* sobre *streptococcus mutans* atcc 25175, trujillo 2017". 2017. Su Tesis Fue Para Optar el Título de cirujano dentista.
18. M U, et al.. Actividad antibacteriana y antioxidante de los aceites esenciales comerciales de romero, clavo de oregano y salvia. Rec y T. 2016 mayo; 54(25).
19. Deza Arrestegui FR. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *origanum vulgare* comparado con el aceite esencial de *melissa officinalis* contra *escherichia coli* atcc 25922, estudio in vitro. 2015. Tesis Para Optar el Título de Médico Cirujano.
20. Cava Roda RM. "Efecto antimicrobiano de vainilla y de aceites esenciales de canela y clavo en leche de vaca pasteurizada". 2013. Tesis Para Obtener el Grado de Doctor.
21. Quichca Mendoza. "Grado de eficacia del aceite esencial de *minthostachys mollis* (muña) y clorhexidina al 0,12% en la inhibición del crecimiento de *porphyromonas gingivalis*. Estudio comparativo in vitro. Lima 2016". 2017. Tesis para optar al título de cirujano dentista.
22. Garcia Valladolid A. 2016. Tesis Para Optar el Título de Ingeniero Agroindustrial e Industrias Alimentarias.
23. Castillo Garcia E. Manual de fitoterapia. 2nd ed. El sevier , editor. Barcelona: DRK edición; 2017.

Anexo A: Operacionalización de variables

| Variables | Tipo de variable según su naturaleza y escala de medición | Definición conceptual | Dimensiones | indicadores | Valor final | Crterios para asignar valores |
|---|--|---|--|--------------------|-------------------------------|--|
| Variable Independiente Aceite esencial de Melissa officinalis L. (toronjil), Aceite esencial de Syzygium aromaticum L. (clavo de olor) | Cualitativo nominal | Líquidos de alta volatilidad, muy aromáticos que se extraen de los vegetales. | Porcentaje de concentración del aceite esencial de Melissa officinalis (toronjil) y Syzygium aromaticum (clavo de olor). | % p/p %p/p | 50% 75% 100% | Concentración final después de la dilución |
| Variable dependiente actividad antibacteriana | Cuantitativo ordinal | Sustancias que eliminan bacterias o impiden que se desarrollen pueden causar una enfermedad | Inhibición del crecimiento bacteriano | Halo de inhibición | Crecimiento o sin crecimiento | Evidencia de inhibición o crecimiento |

Anexo B: Clasificación taxonómica de *Melissa officinalis* L.



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIO PEDRO RUIZ GALLO



"Año de la universalización de la salud"

CONSTANCIA N°023-PRG-2020

LA DIRECTORA DEL HERBARIO PRG DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO, QUE SUSCRIBE,

Hace constar:

Que, la señorita: **Marleni Gonzales Vitón**, egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, de la Universidad Privada Alas Peruanas de Chiclayo, hizo llegar al Herbario PRG 02 muestras botánicas, las que han sido estudiadas e identificadas como *Melissa officinalis* L. (Toronjil), clasificadas según el sistema de clasificación APG III (Angiosperm Phylogeny Group)

Clase: Equisetopsida
Orden: Lamiales Bromhead
Familia: Lamiaceae Martinov.
Género: *Melissa* L.
Especie: *Melissa officinalis* L.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que considere pertinente.

Lambayeque, 14 de febrero del 2020

MSc. Josefina Escurra Puicón
Directora del Herbario Pedro Ruiz Gallo
(PRG)



Anexo C: Clasificación taxonómica de *Syzygium aromaticum* L.



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIO PEDRO RUIZ GALLO



"Año de la universalización de la salud"

CONSTANCIA N°024-PRG-2020

LA DIRECTORA DEL HERBARIO PRG DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO, QUE SUSCRIBE,

Hace constar:

Que, la señorita: **Marleni Gonzales Vitón**, egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, de la Universidad Privada Alas Peruanas de Chiclayo, hizo llegar al Herbario PRG-02 muestras botánicas, las que han sido estudiadas e identificada como *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (Clavo de olor), clasificada según el sistema de clasificación APG III (Angiosperm Phylogeny Group).

Clase: Equisetopsida
Orden: Myrtales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia: Myrtaceae Juss.
Género: *Syzygium* P. Browne ex Gaertn.
Especie: *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que considere pertinente.

Lambayeque, 14 de febrero del 2020


MSc. Josefina Ecurra Puicón
Directora del Herbario Pedro Ruiz Gallo
(PRG)



Anexo D: Certificación de la cepa *Escherichia coli*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| | |
|---|--|
| Specifications Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-505™ Reference Number: ATCC® 25922™ Purity: Pure Passage from Reference: 3 | Expiration Date: 2022/3/31 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L. Bowman Release Date: 2021/4/6 |
| Performance | |
| Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly raised edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, raised edge & rough Microscopic Features: Gram negative straight rod | Medium: SBAP Method: Gram Stain (1) |
| ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document. | Other Feature/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovack): negative Beta-glucuronidase (<i>E. coli</i> strain #MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 28 mm (1) SXT [1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm  Amanda Kupar Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE |
| <p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip (in many 2 packaging events) number. The lot number displayed on this certificate is the actual case lot number.</p> <p>Note for Users: Although the WebS portal 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="383 1265 558 1388">  <p>ATCC Accredited Reference Material Program CERT # 0255.01</p> </div> <div data-bbox="598 1388 1348 1444"> <p>(1) The ATCC Licensed Delineating Emblem, the ATCC Licensed Derivat as well as the ATCC logo, are trademarks of ATCC, Microbiologica, Inc. or 504560 to use these trademarks and to sell products derived from ATCC cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="383 1400 510 1444">  <p>ATCC Licensed Derivat</p> </div> <div data-bbox="598 1456 925 1489"> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="383 1467 558 1590">  <p>ATCC Accredited Testing Certificate #2633.01</p> </div> </div> | |

Certificación de la cepa *Escherichia coli*

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

Run Creation Date/Time: 2020-03-27T11:51:17.542 KLH
 Applied MSP Library(es): BDAL_Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

| Sample Name | Sample ID | Organism (best match) | Score Value |
|-------------|-----------|-------------------------|-------------|
| C7 (++) (A) | 330-506 | <i>Escherichia coli</i> | 2.55 |

Comments:

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

ANEXO E: FOTOGRAFÍAS DE TRABAJO

Selección de la Materia Prima



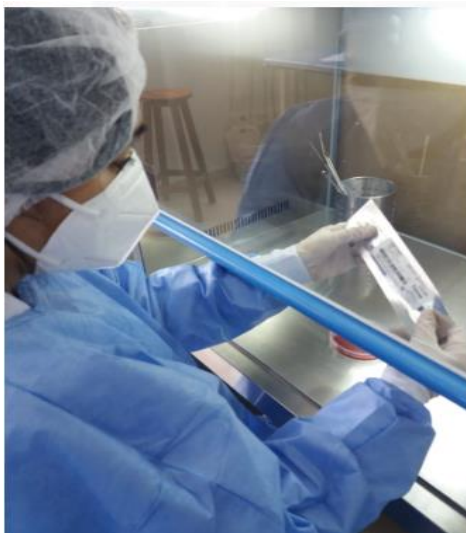
Extracción de los Aceites Esenciales



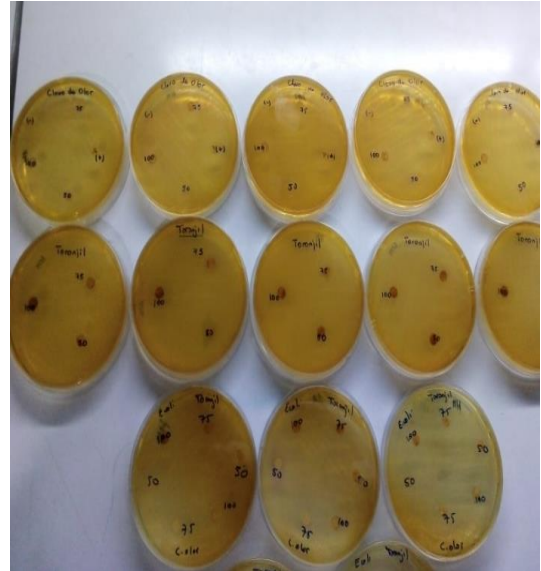
Extracción de los Aceites Esenciales



Activación de la cepa Escherichia coli



Siembra de la cepa Escherichia coli



Culminando la siembra de la cepa

