



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

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Melissa officinalis* L.
(toronjil) FRENTE A LA CEPA DE *Pseudomonas
aeruginosa*.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES:

Bach. LOPEZ CASQUINA, CELIA JUANA
<https://orcid.org/0000-0002-9264-043X>

Bach. LUPINTA QUICAÑA, IDALIT YULIANA
<https://orcid.org/0000-0003-0796-5334>

ASESOR:

Dr. VILCHEZ CÁCEDA, HÉCTOR ALEXANDER
<https://orcid.org/0000-0001-7094-0821>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A Dios por estar presente en mis momentos difíciles, por concederme la vida, por guiarme por el buen camino y así alcanzar mis objetivos y metas. A mis queridos padres y a mis hermanos por brindarme mucho amor y estima, por motivarme a surgir; por el apoyo absoluto y por los consejos brindados para superar cada una de las dificultades en mi formación universitaria. A mis queridos amigos; en especial a José Luis y a Lupe por darme toda la confianza, el apoyo y la fortaleza para triunfar frente a las adversidades y así lograr mis metas y sueños proyectados.

Celia Juana Lopez Casquina

Quiero dedicar este trabajo a Dios que me ha dado la vida y fortaleza para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A mis padres Gabino y Yolanda; quiénes con su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, me han permitido lograr este objetivo.

A mis hermanas, por su cariño y apoyo incondicional.

A mis amigos, por sus anhelos.

Idalit Yuliana Lupinta Quicaña

AGRADECIMIENTO

A nuestra distinguida y adorada escuela profesional de farmacia y bioquímica por brindarnos momentos inolvidables; por permitirnos conocer a grandes maestros y amistades que contribuyeron a nuestra formación profesional.

A nuestro estimado asesor el Dr. Héctor Vílchez Cáceda; por la dedicación y la paciencia de guiarnos por el buen camino para formar parte de los profesionales capacitados y competitivos.

A nuestros queridos familiares y estimados amigos; por su respaldo incondicional y por empujarnos a ser mejor cada día y así persistir con nuestros sueños.

Celia Juana Lopez Casquina

Idalit Yuliana Lupinta Quicaña

Índice General

	Páginas
Resumen	ix
Abstract	x
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	17
2.2 Población, muestra y muestreo	17
2.3 Variables de investigación	18
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	19
2.5 Proceso de recolección de datos	19
2.6 Métodos de análisis estadísticos	23
2.7 Aspectos éticos	23
III. RESULTADOS	24
IV. DISCUSIÓN	32
4.1 Discusión de resultados	32
4.2 Conclusiones	34
4.3 Recomendaciones	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Determinación del índice afrosimétrico	24
Tabla 2. Determinación de pH del extracto etanólico desecado de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil)	24
Tabla 3. Solubilidades del extracto etanólico desecado de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil)	24
Tabla 4. Marcha fitoquímica del extracto etanólico desecado de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil)	25
Tabla 5. Resultados de análisis <i>in vitro</i> por el método Kirby-Bauer	26
Tabla 6. Escala Duraffourd del extracto etanólico <i>in vitro</i> de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) frente a la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Tabla 7. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) frente a la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	28
Tabla 8. Cuadro descriptivo de las medias - medida de los halos de inhibición para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	29
Tabla 9. Análisis de varianza para la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Tabla 10. Prueba de Tukey para comparaciones de subgrupos	31

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil)	14
Figura 2. Recolección de la planta de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) del distrito de Andagua, provincia de Castilla y departamento de Arequipa.	57
Figura 3. Hojas frescas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil).	57
Figura 4. Hojas secas y pulverizadas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil).	58
Figura 5. Filtración del extracto de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil).	58
Figura 6. Eliminación del solvente para obtener la melcocha del toronjil.	59
Figura 7. Obtención de la melcocha.	59
Figura 8. Ensayo para detección de flavonoides.	60
Figura 9. Ensayo para detección de ácidos fenólicos.	60
Figura 10. Ensayo para detección de alcaloides.	61
Figura 11. Ensayo para detección de taninos.	61
Figura 12. Preparación de la escala 0,5 de Mc Farland.	62
Figura 13. Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	62
Figura 14. Activación de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	63
Figura 15. Preparación de medios de cultivos.	63
Figura 16. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar Mac Conkey.	64
Figura 17. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar de tripticasa soya.	64
Figura 18. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar de cetrimide.	65
Figura 19. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar de sangre.	65
Figura 20. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar de count plate.	66
Figura 21. Preparación y esterilización de los discos de papel Whatman.	66
Figura 22. Preparación de los discos de sensibilidad con las concentraciones al 20 %, 40 % y 60 % del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil).	67

Figura 23. Preparación de la solución microbiana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ajustando a la escala de 0,5 de Mc Farland.	67
Figura 24. Inoculación de los discos embebidos con alcohol etílico al 96 %, con gentamicina 10 µg y a una concentración de 20 % del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) en el medio cultivo previamente inoculado con la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	68
Figura 25. Inoculación de los discos embebidos a una concentración de 40 % y 60 % del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) en el medio cultivo previamente inoculado con la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	68
Figura 26. Halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) del control positivo, control negativo y la concentración al 20 % frente a la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	69
Figura 27. Halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) del control positivo, control negativo y la concentración al 40 % frente a la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	69
Figura 28. Halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) del control positivo, control negativo y la concentración al 60 % frente a la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	70

Índice de Anexos

Anexo A. Operacionalización de las variables	45
Anexo B. Instrumentos de recolección de datos	46
Anexo C. Evidencias fotográficas del trabajo de campo	57

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto del etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Métodos: El recurso vegetal se recolectó en el distrito de Andagua; el extracto etanólico de las hojas de toronjil se realizó por el método de maceración, el cual sirvió para la identificación de metabolitos secundarios y para la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico a diferentes concentraciones 20 %, 40 % y 60 %; se realizó a través del método de difusión Kirby-Bauer; la cepa bacteriana utilizada fue *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; se utilizó gentamicina 10 µg como control positivo.

Resultado: El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) presentó halos de inhibición de 7,7 mm; 16,8 mm y 19,5 mm a las concentraciones del 20 %, 40 % y 60 % respectivamente.

Conclusiones: El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves: *Melissa officinalis* L., extracto etanólico, *Pseudomonas aeruginosa*, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Objective: To determine the *in vitro* antibacterial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) against the *Pseudomonas aeruginosa* strain.

Methods: The plant resource was collected in the Andagua district; the ethanolic extract of the lemon balm leaves was made by the maceration method, which served to identify secondary metabolites and to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of the ethanolic extract at different concentrations 20 %, 40 % and 60 %; it was carried out through the Kirby-Bauer diffusion method; the bacterial strain used was *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; 10 µg gentamicin was used as a positive control.

Result: The ethanolic extract of the leaves of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) showed inhibition halos of 7,7 mm; 16,8 mm and 19,5 mm at concentrations of 20 %, 40 % and 60 % respectively.

Conclusions: The ethanolic extract of the leaves of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) showed antibacterial activity *in vitro* against the *Pseudomonas aeruginosa* strain.

Key words: *Melissa officinalis* L., ethanolic extract, *Pseudomonas aeruginosa*, antibacterial activity.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la mayoría de las infecciones son causadas por bacterias; que se transmiten de forma directa o indirecta con mayor facilidad ya sea dentro o fuera de un nosocomio.

Estas infecciones conllevan a enfermedades desde agudas a crónicas; todo ello involucra gran dificultad en salud pública, aumentando el porcentaje de patologías y muertes, alargando la estancia intrahospitalaria y el incremento mayor de costos en salud^{1,2}.

Según la organización mundial de salud (OMS); informó sobre casos de infección por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos en pacientes que se sometieron a intervenciones quirúrgicas; generalmente operaciones bariátricas; se confirmaron 16 casos y 4 sospechosos. Se descubrió que no se desinfectó de forma correcta el material reutilizable representando un riesgo o también fue por transmisión hemática de infecciones entre pacientes³.

Las infecciones en los nosocomios de países desarrollados afectan el 5 al 10 % de las personas y en países subdesarrollados superan el 25 %. Por lo general el 30 % de los pacientes afectados por infecciones son los de cuidados intensivos, alcanzando una mortalidad de 44 %⁴.

Los patógenos principales que desencadenan múltiples infecciones son *Escherichia coli* con 15,2 % y *Pseudomonas aeruginosa* con 11,2 %, las cuales son causantes de distintas enfermedades: 26 % neumonías, 19 % infecciones por cirugía, 17 % infecciones urinarias y 14 % bacteriemias, estas son las responsables de prolongar la estancia hospitalaria y traen con ellas diversas complicaciones que pueden ocasionar la muerte⁵.

Las infecciones en pacientes de Perú tienen una tasa de prevalencia de 2,82 %. En la ciudad de Arequipa las infecciones alcanzan el 1,12 % de los pacientes⁶. Más del 30 % del riesgo de infecciones intrahospitalarias son causadas por bacterias gramnegativas. En un promedio de 13 % son causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y en un 22 % ocurren en las instalaciones de cuidados intensivos⁷.

Hace tiempo que la medicina tradicional nace de la aplicación de técnicas poco ortodoxas, empíricas, populares o alternativas, que se difunden de generación en generación, siendo las plantas, la principal fuente de sus preparados medicinales para la precaución y la mejoría de sus enfermedades en la población⁸.

En la diversidad de flora, existen algunas plantas que poseen propiedades terapéuticas que ayudan a contrarrestar las infecciones provocadas por diversas cepas bacterianas, las que pueden ser aplicadas como una alternativa para el complemento de asepsia, barrera de protección y prevención de infecciones; de esta manera también ayudan a evitar la propagación y el crecimiento bacteriano en múltiples superficies^{9,10}.

El toronjil es una especie vegetal con excelentes propiedades terapéuticas, que se aplican para el tratamiento de enfermedades cerebrales a nivel central, enfermedades cardiovasculares y respiratorias, diversos tipos de cáncer, potenciar la memoria, entre otras más^{11,12}. Además, muchas farmacopeas herbolarias iraní, británica y europea señalan diversas propiedades farmacológicas: neurológicas, antioxidantes, hipoglucemiantes, hipolipidémicos, antimicrobianos, anticancerígenos, antidepresivos, ansiolíticos, anticonceptivas, antiinflamatorias y espasmolíticos. En las investigaciones fitoquímicas experimentales demostraron la presencia de compuestos volátiles, triterpenos, ácidos fenólicos y flavonoides^{13,14}.

La especie vegetal del toronjil corresponde a la familia de *Lamiáceas*, por lo general crece sobre suelos ricos en materia orgánica de bosques, malezas y jardines¹⁵. Por lo general, se realizan infusiones de esta planta que es utilizado como tranquilizante natural y con su aceite esencial se elaboran perfumes¹⁶.

Según investigaciones fitoquímicas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) presenta compuestos fenólicos (taninos, ácidos fenólicos y flavonoides) y terpenos (triterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos); los principales constituyentes activos son los compuestos volátiles, triterpenos y ácidos fenólicos; así mismo el aceite esencial y los compuestos fenólicos son los que le atribuyen las actividades farmacológicas^{17,18}.

Los usos medicinales del toronjil que se conocen son: cicatrizante, estimulante, hipnótico, carminativo, sudorífico, digestivo, antidepresivo, antiviral, reconstituyente, antibacteriano, espasmolítico, colerético, febrífugo^{19,20}.

Los usos tradicionales de la especie vegetal que se conocen son:

- Como tranquilizante natural es tomada mediante una infusión²¹.
- Como antídoto lo aplican como emplastos contra la mordedura de perros rabiosos, alacranes, entre otras²².
- Para aliviar dolores gástricos de tipo cólico lo consumen realizando una maceración de las hojas en vino²².
- Para purificar las llagas, se utilizan las hojas y son aplicadas con sal²².



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

Entre los antecedentes al desarrollo del trabajo de investigación se dispusieron de los siguientes:

Echavarría A, et al (2016), evaluó la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. En los resultados se precisó gran cantidad de polifenoles y flavonoides en el extracto hidroalcohólico y consideraron que los metabolitos secundarios poseen gran poder antioxidante²³.

Vélez R, et al (2018), mencionaron acerca de las sustancias químicas, efecto antimicrobiano y letalidad del toronjil y la hierba luisa. En los resultados se

determinó que el extracto metanólico y el aceite esencial de ambas especies presentaron flavonoides, polifenoles, esteroides, taninos, glucósidos y alcaloides; así como también la ausencia de terpenos en el aceite esencial. Se determinó que el toronjil fue más sensible frente a *Escherichia coli* inhibiendo a 40 mg/mL. Mientras que la hierba luisa fue más sensible frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* con una inhibición de 20 mg/mL²⁴.

Angulo D, et al (2019), realizaron un perfil de las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) mediante el método Het - Cam. Se evidenció en la prueba de solubilidad que el extracto hidroalcohólico fue soluble en metanol y etanol. Por otro lado, en las marchas fitoquímicas analizadas observaron la presencia muy abundante de flavonoides²⁵.

Azuero A, et al. (2016), precisaron acerca de los metabolitos secundarios y la actividad antibacteriana de doce plantas: toronjil, cilantro, altamisa, borraja, moringa, diente de león, achochilla, guaviduca, ajeno, mastrante, cedrón y hierbaluisa. El extracto metanólico de toronjil presentó una mayor sensibilidad para *Escherichia coli* dando un halo de inhibición de 9,4 mm y las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* no presentaron una sensibilidad bacteriana dando un halo de inhibición de 6,3 mm y 6,5 mm respectivamente²⁶.

Lema A. (2018), evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) en *Proteus spp.* se apreció que pH del extracto hidroalcohólico de toronjil fue de 5,5 y también se observó una alta evidencia de chalconas y auronas seguido de alcaloides y flavonoides. Además, el extracto hidroalcohólico de toronjil presentó una sensibilidad intermedia contra *Proteus spp.* Se recopiló este estudio para valorar la calidad de la droga vegetal²⁷.

Moreno M. (2020), determinaron el efecto antibacteriano *in vitro* de extractos etanólicos de orégano, tomillo y salvia sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia múltiple. Los resultados obtenidos en su trabajo relacionado con los halos de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* fueron: *Salvia officinalis* (salvia) con 12,99 mm, *Thymus*

vulgaris (tomillo) con 11,11 mm y *Origanum vulgare* (orégano) con 9,77 mm; donde se aprecia que la salvia posee mejor efecto antibacteriano. Sin embargo, la cepa más susceptible fue *Staphylococcus aureus* en comparación a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*²⁸.

La justificación de este estudio es que en la actualidad los casos con mayor incidencia a infecciones intrahospitalaria se están incrementado, lo que conlleva a un consumo exorbitante de fármacos antibacterianos ocasionando una resistencia bacteriana^{29,30}. Por tal motivo se investiga recursos naturales con propiedades farmacológicas frente a microorganismos oportunistas, resultando ser una opción con información validada de manera científica que disminuya significativamente a microorganismos farmacorresistentes; lo que beneficiaría a toda la población dando a conocer sobre la importancia, la utilidad y el empleo terapéutico de las plantas³⁰.

El objetivo general del estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

La hipótesis general del estudio fue:

- El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

- **Enfoque:** Cuantitativo³¹.
- **Experimental:** Porque se manipuló la variable independiente³².
- **Correlacional:** Porque se determinó si las dos variables estuvieron relacionadas³³.
- **Explicativo:** Se buscó interpretar porque ocurre un fenómeno³³.
- **Prospectivo:** Porque se recolectó datos después de iniciada la investigación³⁴.
- **Transversal:** Porque la variable independiente fue medida en un solo momento³⁴.

2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

La población botánica fue conformada por la especie vegetal de *Melissa officinalis* L. (toronjil) provenientes del distrito de Andagua, provincia de Castilla y departamento de Arequipa; ubicada a una altura de 3585 m.s.n.m.; de donde se obtuvo una muestra de ocho kilogramos de las hojas frescas de la especie vegetal en mención. La población microbiológica estuvo conformada por la especie de *Pseudomonas aeruginosa*, de la que se obtuvo la cepa ATCC 27853 como muestra.

El muestreo fue no probabilístico, considerando las hojas en buen estado, no deterioradas, frescas y libres de microorganismos³⁵.

Para la recolección de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) se utilizaron guantes desechables, mascarilla quirúrgica y gorro desechable; luego fueron depositadas en bolsas de papel Kraft para ser almacenadas en una caja de tecnopor³⁶. Se llevó el recurso natural al *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín, ubicado en la ciudad de Arequipa, donde se realizó su identificación taxonómica. (VER ANEXO C)

La caja de tecnopor fue llevada al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Alas Peruanas de Arequipa, se seleccionaron las hojas frescas de la especie con características homogéneas, libres de daño físico y sin

contaminación microbiológica; para la limpieza del material vegetal se realizó un enjuague con agua destilada, luego se procedió a llevar a un horno a 40°C por 5 días y se realizó la molienda de las hojas desecadas mediante el uso de un mortero³⁶.

Para el proceso de extracción etanólica, se empleó la técnica de maceración; utilizando un envase ámbar con tapa rosca estéril, donde se agregó los dos kilogramos de las hojas pulverizadas más 4 litros de alcohol etílico al 96 %; se realizó el macerado por 10 días y cada 12 horas se realizó agitación con la finalidad de homogenizar la muestra^{36,37}.

Luego se procedió al filtrado con papel Whatman N° 40; el filtrado se recibió tres fuentes de vidrio para luego trasladarlo al horno a 40 °C, se mantuvo en el horno hasta alcanzar peso constante, de esta forma se obtuvo el extracto seco de la planta denominado también melcocha³⁸.

En cuanto a la unidad de análisis se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 que fue adquirida de la empresa GenLab del Perú S.A.C. (VER ANEXO B)

2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

En el siguiente estudio se presentó como variable principal nuevas oportunidades de tratamiento, es una variable cuantitativa y su escala de medición es transversal.

2.3.1 Variable independiente: Extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil).

- Definición conceptual: Producto obtenido mediante métodos o técnicas de extracción con alcohol etílico al 96 % por maceración³⁹.
- Definición operacional: El solvente en relación con la planta medicinal arrastrará metabolitos secundarios solubles por maceración y eliminación del solvente mediante su secado en el horno; será utilizado en la elaboración de las soluciones a diferentes concentraciones³⁹.

2.3.2 Variable dependiente: Actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

- Definición conceptual: Conjunto de compuestos que eliminan o reducen el crecimiento microbiano⁴⁰.
- Definición operacional: La actividad antibacteriana realizada por el Método Kirby-Bauer es un procedimiento que sirve para enfrentar un disco embebido de extractos de plantas con una cepa bacteriana y así determinar su sensibilidad bacteriana⁴⁰.

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica que se utilizó fue la observación y el instrumento para la recolección de datos fue anotado en fichas de registro de los resultados de tamizaje fitoquímico, la prueba de solubilidad y el ensayo microbiológico^{41,42}.

2.5 PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

El procedimiento para la recolección de datos fue basado en el tipo de observación no participativa, realizando el seguimiento a los siguientes procesos:

2.5.1 Análisis previo del extracto etanólico

El análisis previo se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Alas Peruanas en Arequipa. Se realizaron las siguientes pruebas:

- a) **Índice afrosimétrico**: En un tubo de ensayo se colocó 1 g de extracto seco con 7 mL de agua destilada y se agitó por un lapso de 2 minutos y se observó si hay formación de espuma esto es debido a la presencia de saponinas⁴³.
- b) **Determinación de pH a 25°C**: En un tubo de ensayo se hizo una dilución con 0,5 g de extracto seco y 6 mL de etanol al 96 %; se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea y se procedió a medir el pH utilizando potenciómetro⁴⁴ marca Thermo Scientific Orion 3 Star Benchtop pH meter.
- c) **Prueba de solubilidad**: se colocó en distintos tubos 0,1 g del extracto seco y se adicionaron 2 mL de solventes de diferente polaridad⁴⁵,

como: agua estéril, glicerina, metanol, alcohol etílico al 96 % y cloroformo.

2.5.2 Marcha fitoquímica

Según la metodología de Olga Lock, se identificó los metabolitos secundarios de forma cualitativa, los cuales se evidenciaron de acuerdo a las reacciones químicas tanto por coloración o precipitación^{46,47}; las técnicas químicas utilizadas son las siguientes:

Ensayo de Shinoda (flavonoides), prueba del reactivo de cloruro férrico (compuestos fenólicos), prueba del reactivo gelatina – sal (taninos), ensayo de Mayer (alcaloides), la reacción de Bornträger (antraquinonas), ensayo de Lieberman - Burchard (esteroides y triterpenoides), prueba de espuma (saponinas), prueba de Legal y Baljet (sesquiterpenlactonas)^{46,47,48}.

2.5.3 Actividad antibacteriana método Kirby-Bauer o antibiograma

Se realizó en los laboratorios de Microbiología de la Universidad Alas Peruanas en Arequipa por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) con este método permitió la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

a) Preparación de los extractos a ensayar

Se procedió a colocar en fioles de 25 mL; 5 g, 10 g y 15 g del extracto seco, luego se completó con alcohol etílico al 96 % c.s.p. 25 mL de esta forma obtuvimos concentraciones de 20 %, 40 % y 60 %⁴⁹.

b) Activación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

La reactivación de la cepa liofilizada de *Pseudomonas aeruginosa* se activó según el manual del fabricante. (VER ANEXO B)

c) Preparación del inóculo

Se hizo una diseminación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en agar tripticasa de soya, se hizo incubar por un lapso de 18 horas a 37 °C de temperatura para conseguir cultivos jóvenes; en un tubo estéril de vidrio se preparó la solución bacteriana con cloruro de sodio al 0,9 %, ajustando a la turbidez del tubo de 0,5 de Mc Farland⁵⁰.

d) Preparación de los medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fue el agar Tripticasa de Soya y Mueller Hinton; se siguió las instrucciones del fabricante para su respectiva preparación; utilizando placas Petri de 90 mm de diámetro⁵¹. (VER ANEXO B)

e) Inoculación de las placas

Con un hisopo estéril se introdujo a la suspensión bacteriana para hacer varias rotaciones y se presionó firmemente por la superficie de las paredes para la eliminación del inóculo sobrante; con el hisopo embebido de la suspensión necesaria, se procedió al sembrado realizando estrías en tres sentidos sobre la superficie de la placa del agar de Mueller Hinton; se dejó la placa inoculada a temperatura del ambiente durante 15 minutos con el fin que se elimine el exceso de la humedad^{51,53,54}.

f) Grupos a ensayar

La preparación de discos de sensibilidad se utilizó un perforador convencional para obtener los discos de papel Whatman N° 3, con un diámetro de 6 mm y fueron esterilizados a 121 °C por un lapso de 30 minutos; estos discos se sumergieron en cuatro tubos de ensayo con tapas herméticas completamente cerradas; luego se adiciona a cada tubo: los extractos al 20 %, 40 % y 60 % y alcohol etílico al 96 % para empapar los discos durante 24 horas y cada cierto tiempo se realizó agitaciones por dos minutos⁵⁵. Según el método de Kirby-Bauer^{56,57}; se consideró a los discos de gentamicina 10 µg y los discos embebidos con el extracto de toronjil al 20 %, 40 %, 60 % y con alcohol etílico al 96 %⁵⁸.

Luego se procedió a colocarlos sobre la superficie del medio inoculado previamente con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853⁵⁸.

- **Grupo I:** Discos embebidos con alcohol etílico al 96 %.
- **Grupo II:** Discos embebidos con extracto etanólico de las hojas de toronjil al 20 %.
- **Grupo III:** Discos embebidos con extracto etanólico de las hojas de toronjil al 40 %.
- **Grupo IV:** Discos embebidos con extracto etanólico de las hojas de toronjil al 60 %.
- **Grupo V:** Discos embebidos con gentamicina 10 µg.

Seguidamente se invirtieron las placas inoculadas y fueron colocadas a la incubadora a 37 °C de temperatura por 24 horas. Cada ensayo se efectuó por triplicado⁵⁹.

g) Interpretación de los resultados

La lectura de los halos de inhibición se efectuó con la ayuda de un vernier donde se procedió a medir los diámetros que se formaron sobre las superficies del medio de cultivo y los resultados obtenidos fueron promediados y se consideraron en milímetros como unidad de medida^{60,61}.

Los resultados de los porcentajes de inhibición bacteriana se calcularon a través la siguiente fórmula:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = (\text{DM} - \text{DCN}) / (\text{DCP} - \text{DCN}) * 100$$

DM: Diámetro de la muestra

DCN: Diámetro del control negativo

DCP: Diámetro del control positivo

2.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Luego de la obtención de resultados de los análisis mencionados en la investigación, se hicieron las evaluaciones mediante estadística descriptiva utilizando el paquete informático Microsoft Excel versión 2016 para realizar pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey⁶².

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

En la presente investigación se utilizó una cepa bacteriana y muchos medios de cultivo; donde se cumplieron las normativas éticas de buenas prácticas de laboratorio y de bioseguridad tanto dentro como fuera de los ambientes donde se realizó los experimentos y ensayos de ética; establecida en la Declaración de Helsinki⁶³.

III. RESULTADOS

3.1 De las pruebas de análisis del extracto etanólico

Tabla 1. Determinación del índice afrosimétrico

Índice afrosimétrico	Resultados
Prueba de la espuma (Saponinas)	++

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

En la tabla 1, se puede apreciar el resultado del índice afrosimétrico, donde se evidencia una moderada presencia de espuma (saponinas).

Tabla 2. Determinación de pH del extracto etanólico desecado de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil)

Determinación del pH	Temperatura (°C)	Resultado
	25	6,44

Dónde: Ácido: < 7

Neutro: = 7

Básico: > 7

En la tabla 2, se puede observar que el extracto etanólico desecado de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil), presentó un pH de 6,44; lo que quiere decir que el extracto es de naturaleza ácida.

Tabla 3. Solubilidades del extracto etanólico desecado de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil)

SOLVENTES	RESULTADOS
Agua estéril	+
Glicerina	+
Metanol	++
Alcohol etílico al 96 %	+++
Cloroformo	-

Donde: Insoluble (-) Poco soluble (+) Soluble (++) Muy soluble (+++)

En la tabla 3, se puede apreciar que el extracto etanólico desecado de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil), presentó una alta solubilidad en el solvente de alcohol etílico al 96 %, seguido del metanol.

3.2 De la marcha fitoquímica

Tabla 4. Marcha fitoquímica del extracto etanólico desecado de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil)

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

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

En la tabla 4, se puede apreciar que en el extracto etanólico de las hojas de toronjil, se detectó abundantes compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides moderada presencia de saponinas, leve presencia de taninos, esteroides y triterpenoides, ausencia de sesquiterpenlactonas y antraquinonas.

3.3 De la actividad antibacteriana método Kirby-Bauer o antibiograma

Tabla 5. Resultados de análisis *in vitro* por el método Kirby-Bauer

CEPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			
Concentración del extracto etanólico (%)	Halos de inhibición (mm)			
	N			X
	1	2	3	
60	19,1	20,0	19,5	19,5
40	16,8	17,0	16,7	16,8
20	6,5	9,1	7,5	7,7
Alcohol etílico al 96 %	6,0	6,0	6,0	6,0
Gentamicina 10 µg	25,5	25,3	25,4	25,4

En la tabla 4, se puede apreciar los diámetros de halos de inhibición con las concentraciones de 20 %, 40 % y 60 % del extracto etanólico de las hojas del toronjil, del alcohol al 96 % como control negativo y de la gentamicina como control positivo.

Tabla 6. Escala Duraffourd del extracto etanólico *in vitro* de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

GRUPOS	Escala Duraffourd del extracto etanólico*
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Alcohol etílico al 96 %	-
60 %	++
40 %	++
20 %	-
Gentamicina 10 µg	+++

* De la media del halo de inhibición de 03 discos por grupo (triplicado)
 Donde la sensibilidad es: Alta (+++) Media (++) Baja (+) Nula (-)

En la tabla 6, se puede apreciar que el extracto etanólico de las hojas de toronjil, presentó una sensibilidad alta con gentamicina 10 µg, una sensibilidad media a las concentraciones del 40 % y del 60 % y una sensibilidad nula a la concentración del 20 % y con el alcohol etílico al 96 % frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; se utilizó como control positivo a gentamicina 10 µg y control negativo al alcohol etílico al 96 %

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

GRUPOS	Porcentajes de la actividad antibacteriana*
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Alcohol etílico al 96 %	0,0 %
60 %	69,6 %
40 %	55,7 %
20 %	9,0 %
Gentamicina 10 µg	100,0 %

* De la media del halo de inhibición de 03 discos por grupo (triplicado)

Donde: Buena actividad: > 76 %
 Poco activo: 40 - 50 %

Moderadamente activo: 51 - 35 %
 Inactivo: < 40 %

En la tabla 7, se puede apreciar los porcentajes de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de toronjil; se detectó una moderada actividad al 40 % y 60 % del extracto con un 69,6 % y 55,7 % y fue inactivo al 20 % del extracto con un 9,0 % frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; se utilizó como control positivo a gentamicina 10 µg y control negativo al alcohol etílico al 96 %.

Tabla 8. Cuadro descriptivo de las medias - medida de los halos de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

DESCRIPTION

Alpha 0,05

Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
ALCOHOL ETÍLICO 96 %	3	18	6	0	0,00	0,3611 7094	5,1952 6101	6,8047 3899
60 %	3	58,6	19,53 33333	0,203333 333	0,41	0,3611 7094	18,728 5943	20,338 0723
40 %	3	50,5	16,83 33333	0,023333 333	0,05	0,3611 7094	16,028 5943	17,638 0723
20 %	3	23,1	7,7	1,72	3,44	0,3611 7094	6,8952 6101	8,5047 3899
GENTAMICINA 10 µ/mL	3	76,2	25,4	0,01	0,02	0,3611 7094	24,595 261	26,204 739

En la tabla 8, se puede apreciar de forma general los grupos utilizados durante el ensayo de sensibilidad bacteriana frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, el número de placas utilizadas para cada ensayo y la media aritmética de los diámetros de los halos de inhibición.

Tabla 9. Análisis de varianza para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	798,956	4	199,739	510,406 3032	0,00	0,9951 2582	13,0435 974	0,9926922 9
Within Groups	3,913333	10	0,391333					

Ho: El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) no presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

H1: El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la tabla 9, se puede apreciar el análisis de varianza (ANOVA), donde P valor salió 0,00 entre los grupos, resultando ser menor que el nivel de significancia ($p < 0,05$), esto indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, corroborando que el extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 10. Prueba de Tukey para comparaciones de subgrupos

TUKEY HSD/KRAMER

alpha

0,05

group	mean	n	ss	df	q-crit
ALCOHOL ETÍLICO 96 %	6	3	0		
60 %	19,53333333	3	0,40666667		
40 %	16,83333333	3	0,04666667		
20 %	7,7	3	3,44		
GENTAMICINA 10 µ/mL	25,4	3	0,02		
		15	3,91333333	10	4,654

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
ALCOHOL ETÍLICO 96 %	60 %	13,53333333	0,36117094	37,4707154	11,8524438	15,2142229	0,00	1,68088953	21,6337276
ALCOHOL ETÍLICO 96 %	40 %	10,83333333	0,36117094	29,9950308	9,1524438	12,5142229	0,00	1,68088953	17,3176391
ALCOHOL ETÍLICO 96 %	20 %	1,7	0,36117094	4,70691253	0,01911047	3,38088953	0,05	1,68088953	2,71753722
ALCOHOL ETÍLICO 96 %	GENTAMICINA 10 µ/mL	19,4	0,36117094	53,7141783	17,7191105	21,0808895	0,00	1,68088953	31,0118953
60 %	40 %	2,7	0,36117094	7,4756846	1,01911047	4,38088953	0,00	1,68088953	4,31608852
60 %	20 %	11,83333333	0,36117094	32,7638029	10,1524438	13,5142229	0,00	1,68088953	18,9161904
60 %	GENTAMICINA 10 µ/mL	5,86666667	0,36117094	16,2434628	4,18577713	7,5475562	0,00	1,68088953	9,37816765
40 %	20 %	9,13333333	0,36117094	25,2881183	7,4524438	10,8142229	0,00	1,68088953	14,6001019
40 %	GENTAMICINA 10 µ/mL	8,56666667	0,36117094	23,7191474	6,88577713	10,2475562	0,00	1,68088953	13,6942562
20 %	GENTAMICINA 10 µ/mL	17,7	0,36117094	49,0072657	16,0191105	19,3808895	0,00	1,68088953	28,2943581

En la tabla 10, se puede apreciar el análisis de las comparaciones múltiples entre los grupos mediante la prueba del HSD de Tukey se confirmó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$); con excepción del alcohol etílico al 96 % y el extracto etanólico al 20 % ($p = 0,05$).

IV. DISCUSIÓN

4.1 Discusión de resultados

Al realizar la determinación del índice afrosimétrico se observó una moderada presencia de espuma lo cual indica que el extracto etanólico de toronjil presenta saponinas en comparación con el trabajo realizado por Echevarría A, et al. (2016) en el cual no se observó presencia de saponinas.

El pH encontrado en el extracto etanólico del toronjil fue de naturaleza ácida con un valor de 6,44; el cual corrobora con el pH hallado en el extracto acuoso trabajado por Zambrano A. (2015)⁶⁴. Sin embargo, Lema A. (2018) el pH que encontró fue 5,5 en el extracto hidroalcohólico.

Mientras que en las pruebas de solubilidad resultó ser muy soluble en alcohol etílico al 96 %, en comparación con el trabajo de investigación realizado por Ángulo D, et al. (2019) el cual presentó en sus resultados ser sólo soluble en etanol en el extracto hidroalcohólico.

A partir de los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica se demuestra que el extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) presenta abundantes compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides, moderada presencia de saponinas, leve presencia de taninos, esteroides y triterpenoides, ausencia de sesquiterpenlactonas y antraquinonas, nuestro resultado nos permite corroborar con lo trabajado por Buendía J. (2015)⁶⁵, quién precisó la existencia de abundantes compuestos fenólicos; también existe una relación de los resultados hallados en este estudio con Lema A. (2018), donde determinó la presencia de alcaloides, saponinas, compuestos fenólicos y flavonoides. Asimismo es muy importante mencionar los estudios investigativos que fueron realizados por Vélez R, et al. (2018); quienes precisaron los mismos compuestos químicos encontrados en este estudio con la diferencia que utilizaron el extracto metanólico y el aceite esencial; además en el trabajo realizado por Abdellatif F, et al. (2014)⁶⁶ utilizaron el aceite esencial del toronjil donde precisaron compuestos químicos similares a lo encontrado en este trabajo pero con gran existencia de geranial, neral y citronelal. Algunos de los resultados hallados por otros autores difieren con

este trabajo debido a diferentes factores como lo mencionado en el estudio de Sánchez E. (2010)⁶⁷ quien señala que las hojas de toronjil que serían recolectados en el mes de abril y al ser secadas por cualquier método tendrían muy buena calidad.

Los resultados hallados en este trabajo se determinaron según la escala de Duraffourd donde el extracto etanólico de las hojas de toronjil a las concentraciones del 40 % y 60 % demostraron una sensibilidad media con un halo de inhibición de 16,8 mm y 19,5 mm respectivamente; mientras que la concentración del 20 % y el alcohol etílico al 96 % se evidenciaron una sensibilidad nula con un halo de 7,7 mm y 6,0 mm respectivamente y la gentamicina 10 µg se verificó una sensibilidad alta con un halo de inhibición de 25,4 mm frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; nuestro resultado corrobora con lo trabajado por Armas H, et al. (2015)⁶⁸ quienes señalan que el extracto hexánico de toronjil de la solución de 20 mg/mL y 40 mg/mL mostraron una sensibilidad media con halos inhibitorios de 17 mm y 15 mm respectivamente, pero difiere con otros trabajos debido a la concentración del extracto y diferentes solventes utilizados así como los resultados hallados por Armas H, et al. (2015) y Vélez R, et al. (2018), quienes utilizaron el extracto metanólico en las mismas soluciones demostraron una sensibilidad baja con halos de inhibición de 12 mm y 13 mm respectivamente; mientras que lo trabajado por Azuero A, et al. (2016) quienes demostraron que el extracto metanólico dio una sensibilidad nula con un halo de inhibición de 6,3 mm y por otra parte el Abdellatif F, et al. (2014) utilizaron el aceite esencial presentando una sensibilidad media con un halo de inhibición de 19 mm. En su mayoría los estudios mencionados utilizaron como control positivo al ciprofloxacino dando una sensibilidad alta frente a la cepa estudiada.

Los halos de inhibición a la concentración al 40% y 60 % fueron de 16,8 y 19,5 mm respectivamente, siendo mucho menor al control positivo gentamicina 10 µg esto debido al sinergismo que existe entre sus metabolitos secundarios que concuerda con los estudios planteados por los autores mencionados con anterioridad corroborando la existencia de una actividad antibacteriana frente a la cepa estudiada.

4.2 Conclusiones

Los estudios realizados en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- Se detectó en el extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) la presencia de abundantes alcaloides, flavonoides y los compuestos fenólicos los que serían responsables del sinergismo entre ellos que atribuyen una actividad antibacteriana a la especie vegetal.
- El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 utilizando el método de Kirby-Bauer, se evidenció una sensibilidad media en las concentraciones de 40 % y 60 % y sensibilidad nula a la concentración de 20 % según la escala de Duraffourd.
- El extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) a la concentración de 60 % presentó una menor actividad antibacteriana *in vitro* que la gentamicina 10 µg frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Concluimos que el extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.3 Recomendaciones

- Realizar investigaciones de citotoxicidad *in vivo* de los extractos para promover su uso.
- Complementar investigaciones con otras cepas bacterianas.
- Realizar estudios comparativos de la actividad antibacteriana utilizando diferentes partes del recurso vegetal y según su zona geográfica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Llerena L, Yucra J. Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cándida albicans*, 2017. [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2017.
2. Organización Mundial de la Salud. Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. OMS; 2021. [acceso: 21/04/2021]. Disponible en: https://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/
3. Organización Mundial de la Salud. Infección por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos. México; 2019. [acceso: 28/04/2021]. Disponible en: <https://www.who.int/csr/don/5-march-2019-carbapenem-resistant-p-aeruginosa-mex/es/>
4. Quispe Z. El abordaje de las infecciones intrahospitalarias. Perú: Centro nacional de epidemiología, prevención y control de enfermedades. MINSA; 2016 [acceso: 21/04/2021]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/renace/Jornadacientifica/miercoles21/Elabordaje-IIAS.pdf>
5. Alonso J. Infecciones nosocomiales: *Pseudomonas aeruginosa* y su importancia, sus características y su resistencia a antimicrobianos. [Trabajo de Fin de Grado]. Madrid: Universidad Complutense; 2015.
6. Quispe Z. Situación de las infecciones asociada a la atención en salud. Perú: Centro nacional de epidemiología, prevención y control de enfermedades. MINSA; 2016 [acceso: 15/04/2021]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/SE102017/02.pdf>
7. Cueva A. Infecciones intrahospitalarias por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes adultos Hospital José Cayetano Heredia [Tesis para optar al Título Profesional de Médico Cirujano]. Piura: Universidad Nacional de Piura; 2015.
8. Zhang X. Medicina tradicional, medicamentos esenciales y política farmacéutica. Medicina tradicional: Definiciones. Ginebra: Organización

- Mundial de la Salud. 2017 [acceso: 24/04/2021]. Disponible en: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
9. Arango M. Plantas medicinales de interés médico. 1 ed. Colombia: Editorial Medicina indígena colombiana según cronistas y viajeros; 2006.
 10. Gallegos Zurita, M. Las plantas medicinales: Principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo. Ecuador; 2016 [acceso: 28/04/2021]; 77(4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002
 11. Dastmalchi K, et al. Chemical composition an *in vitro* antioxidative of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. Rev. Food Sci Technol. 2008. [acceso: 28/04/2021]; 41(3): 391-400. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643807001247?via%3Dihub>
 12. Navarro Y, Salazar B. Extracción y fraccionamiento simultáneo del aceite esencial de Toronjil (*Melissa officinalis* L.) para la obtención de los destilados de composición diferenciada. [Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Químico]. Callao: Universidad Nacional del Callao; 2017.
 13. Mencherini T, et al. Triterpene, antioxidant and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. Rev J Nat Prod. 2007. [acceso: 20/04/2021]. 70(12): 1884-94. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np070351s>
 14. Shakeri A, Javadi B, Sahebkar A. *Melissa officinalis* L. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Rev J Ethnopharmacol. 2016. [acceso: 25/04/2021]. 188: 204-128. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27167460/>
 15. Martínez V. Propiedades de Melissa Botanical. Editorial Botanical-online; 2021. [acceso: 27/04/2021]. Disponible en: <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/melisa-propiedades>
 16. Aguaded S. Diario de flores, fracasos, olvidos y simulacros. 1 ed. España: Editorial Agilice digital; 2014.
 17. Waheed K, et al. Lemon Balm. Medicinal Plants of South Asia. 1 ed. Nigeria: editorial Elsevier; 2018.
 18. Quer P. Plantas medicinales. 1 ed. Barcelona: Editorial Labor S.A.; 2013. 133-135 p.

19. Miraj S, Kopaei R, Kiani S. *Melissa officinalis* L: A Review Study with an Antioxidant Prospective. Rev. J Evid Based Complementary Altern Med. 2016. [acceso: 30/04/2021]. 22(3): 384-394. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871149/>
20. Roig J. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2 ed. Cuba: Editorial Científico - Técnica; 2012. 662 p.
21. Ara A. 40 Plantas Medicinales más Populares. 3 ed. Madrid: Editorial EDAF S.A.; 2003. 136 p.
22. Saz P. Fitoterapia y medicina naturista: *Melissa officinalis* L. 2009. [acceso: 2/05/2021]. Disponible en: http://www.unizar.es/med_naturista/plantas/plantas%20y%20mn.pdf
23. Echevarría A, et al. Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de los extractos de dieciséis plantas medicinales. Rev UNEMI. 2016. [acceso: 20/04/2021]. 9(20): 29-35. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/344/297>
24. Vélez R, D' Armas H, Jaramillo C, Vélez E. Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil) [Tesis para optar al Título de Grado de Bioquímica Farmacéutica]. Machala: Universidad de Machala; 2018.
25. Ángulo D, Dionisio A. Perfil de seguridad de las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas *Melissa officinalis* L. (toronjil) mediante el método het-cam [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico]. Perú: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
26. Azuero A, et al. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Rev Univ Estatal Milagro. 2016. [acceso: 22/04/2021]. 9 (20): 11-18. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342>
27. Lema A. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) en *Proteus spp.* [Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacia Clínica y Hospitalaria]. Ecuador: Universidad Regional de los Andes; 2018.

28. Vílchez H. Evaluación del efecto antibacteriano sinérgico de rifampicina en propóleos sobre bacterias grampositivas. Rev cub. med. mil. 2021. [acceso: 20/09/2021]. Disponible en: <http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/133>
29. Moreno M. Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos etanólicos de orégano, tomillo y salvia sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia múltiple [Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias con mención en Microbiología]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2020.
30. Pintado V. Fármacos Antiguos y nuevos en el tratamiento de la infección por bacterias multirresistentes. Rev esp quimioter. 2016. [acceso: 30/04/2021] 29(supl.1): 39-42 Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-155919>
31. Alonso J. Infecciones nosocomiales: *Pseudomonas aeruginosa* y su importancia, sus características y su resistencia a antimicrobianos. Rev Esp Quimioter. 2018. [acceso: 02/05/2021]. 31(2): 123.130. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159385/>
32. Hernández R, Mendoza P. Metodología de la Investigación. México: Editorial Mc Graw Hill; 2018.
33. Baena G. Metodología de la Investigación. 3 ed. México: Editorial Patria; 2017.
34. Palomino J, et al. Metodología de la Investigación. Lima: Editorial San Marcos; 2016.
35. Arispe C, et al. La investigación científica: Una aproximación para los estudios de posgrado. 1 ed. Ecuador: Editorial Departamento de Investigación Internacional; 2020.
36. Ñaupas H, Mejía E, Novoa E, Villagómez A. Metodología de la investigación científica y elaboración de tesis. 3 ed. Lima, Perú: Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
37. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 1 ed. Lima, Perú: Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial; 1988.

38. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1 ed. España: Editorial Omega S.A.; 2003.
39. Bagué A, Álvarez N. Tecnología Farmacéutica. 1 ed. Cuba: Editorial Club Universitario; 2012.
40. Rivas C, Oranday M, Verde M. Investigación en plantas de importancia médica. 1 ed. México: OmniaSciencie; 2016.
41. Goodman G. Terapéutica: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 12 ed. México: McGraw Hill/Interamericana; 2014.
42. Arispe C, et al. La investigación científica: Una aproximación para los estudios de posgrado. 1 ed. Ecuador: Editorial Departamento de Investigación Internacional; 2020.
43. Ñaupas H, Mejía E, Novoa E, Villagómez A. Metodología de la investigación científica y elaboración de tesis. 3 ed. Lima, Perú: Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
44. Valencia E. Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. Rev. Biotiempo. 2005. [acceso: 36/06/2021]. Disponible en: <https://www.urp.edu.pe/pdf/id/2225/n/pdf#:~:text=Se%20efectu%C3%B3%20el%20%C3%8Dndice%20Afrosim%C3%A9trico,espuma%20que%20tiene%20las%20saponinas.>
45. Amaguaña F, Churuchumbi E. Estandarización fitoquímica del extracto de Caléndula (*Caléndula officinalis*) [Tesis para optar al Grado Académico de Farmacia y Bioquímica]
46. Márquez C. Actividad antifúngica de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Melissa officinalis* (toronjil) contra especies del género *Cándida*, aisladas de pacientes con vulvovaginitis [Tesis para optar al Grado Académico de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales]. Quito: Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito; 2018.
47. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 1 ed. Lima, Perú: Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial; 1988.
48. Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. 1 ed. La Habana, Cuba: Editorial Félix Varela; 2001.

49. Macedo R, et al. Actividad antibacteriana de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*; por el método de macrodilución y difusión en agar. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2016.
50. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009.
51. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 7 ed. España: Elsevier; 2013.
52. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009.
53. Picazo J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Rev SEIMC. 2000. [acceso: 02/05/2021]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
54. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica; 2006. [acceso: 02/05/2021]. 36: 663. Disponible en: <http://higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
55. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 7 ed. España: Editorial Elsevier; 2013.
56. Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto nacional de salud. Lima - Perú; 2002. [acceso: 02/05/2021]. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
57. Ministerio de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco en difusión. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2002. [acceso: 9/05/2021]. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
58. Manual de procedimientos para antimicrobianos y control de calidad en microbiología. Panamá: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Microbiología Clínica; 2009 [acceso: 05/05/2021]. Disponible en: <http://www.gorgas.gob.pa/wp-content/uploads/2015/06/Manual-de-Antibiograma-y-Calidad-LCRSP.pdf>

59. Organización mundial de la salud. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. OMS - Ginebra. 2002 [acceso: 02/05/2021]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js4930s/>
60. Koneman E, et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. 6 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008.
61. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009.
62. Blanco M. Introducción a la probabilidad y a la estadística. 1 ed. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Económicas; 2018.
63. Ministerio de Salud de Perú. Compendio de normativa ética para uso por los comités de ética en investigación. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú; 2011.
64. Zambrano A. Estudio farmacognóstico y composición proximal de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Lippia citriodora* (cedrón) provenientes de las provincias de Oro y Azuay, Ecuador [Tesis para optar al Grado Académico de Bioquímica farmacéutica]. Ecuador: Universidad Técnica de Machala; 2015.
65. Buendía J. Efecto sedante del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "toronjil" más *Matricaria chamomilla* "manzanilla" sobre la ansiedad inducida en ratones albinos [Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental]. Lima, Perú: Universidad Nacional de San Marcos; 2015.
66. Abdellatif F, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. Rev Experimental and Clinical Sciences Journal. 2014. [acceso: 27/04/2021]. 13: 772-781. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464394/>
67. Sánchez E, et al. Caracterización farmacognóstica de *Melissa officinalis* L. (toronjil). Rev Cuba Plantas Med. 2010. [acceso: 27/04/2021]. 15 (4):11. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000400003

68. Armas H, Vélez R. Evaluación comparativa de metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de extractos orgánicos de *Cymbopogon citratus* (hierba Luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil) [Tesis para optar al Título de Grado de Bioquímica Farmacéutica]. Ecuador: Universidad Técnica de Machala; 2015.

ANEXOS

Anexo A. Operacionalización de las variables

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	OPERACIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	N° ITEMS	VALOR FINAL	CRITERIOS
VARIABLE INDEPENDIENTE el extracto etanólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil)	Cualitativo y transversal	Producto obtenido mediante métodos o técnicas de extracción con alcohol etílico al 96 % por maceración	El solvente en relación con la planta medicinal arrastrará metabolitos secundarios solubles por maceración y eliminación del solvente mediante su secado en el horno; será utilizado en la elaboración de las soluciones a diferentes concentraciones	Tamizaje fitoquímico	Presencia de metabolitos secundarios	5	++++ Abundante +++ Moderado ++ Leve + Leve - Ausencia	Rango de presencia o ausencia
				Diluciones del extracto etanólico	Concentraciones específicas	3	60 % 40 % 20 %	Porcentaje
VARIABLE DEPENDIENTES Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> frente a la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Cuantitativo y Transversal	Conjunto de compuestos que eliminan o reducen el crecimiento microbiano.	La actividad antibacteriana realizada por el Método Kirby-Bauer es un procedimiento que sirve para enfrentar un disco embebido de extractos de plantas con una cepa bacteriana y así determinar su sensibilidad bacteriana.	Inhibición del crecimiento bacteriano	Halo de inhibición (mm)	3	Sensibilidad alta: > 20 mm (+++) Sensibilidad media: 14 - 20 mm (++) Sensibilidad baja: 8 - 14 mm (+) Sensibilidad nula: < 8 mm (-)	Evidencia de inhibición del crecimiento

Anexo B. Instrumentos de recolección de datos

De las pruebas de los análisis del extracto

Determinación del índice afrosimétrico

Índice afrosimétrico	Resultados
Prueba de la espuma (Saponinas)	

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

Determinación de pH del extracto etanólico desecado de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil)

Determinación del pH	Temperatura (°C)	Resultado
	25	

Dónde: Ácido: < 7

Neutro: = 7

Básico: > 7

Solubilidades del extracto etanólico desecado de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil)

SOLVENTES	RESULTADOS
Agua estéril	
Glicerina	
Metanol	
Alcohol etílico al 96 %	
Cloroformo	

Donde: Insoluble (-) Poco soluble (+) Soluble (++) Muy soluble (+++)

De la marcha fitoquímica del extracto etanólico

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

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

De la actividad antibacteriana del extracto etanólico

CEPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			
Concentración del extracto etanólico (%)	Halos de inhibición (mm)			
	N			X
	1	2	3	
60				
40				
20				
Alcohol etílico al 96 %				
Gentamicina 10 µg				

Donde:

X: Media de los halos de inhibición

N: Número de repeticiones

Parámetros de la Escala de Duraffourd

SENSIBILIDAD BACTERIANA	MEDIDA DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
	-	+	++	+++
Sensibilidad nula	< 8 mm			
Sensibilidad baja		9 - 14 mm		
Sensibilidad media			14 - 20 mm	
Sensibilidad alta				> 20 mm

Donde la sensibilidad es: Alta (+++) Media (++) Baja (+) Nula (-)

Porcentaje de inhibición del extracto etanólico

GRUPOS	Porcentajes de la actividad antibacteriana*
Concentración del extracto etanólico (%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Alcohol etílico al 96 %	
20	
40	
60	
Gentamicina 10 µg	

* De la media del halo de inhibición de 03 discos por grupo (triplicado)

Donde: Buena actividad: > 76 %

Moderadamente activo: 51 - 35 %

Poco activo: 40 - 50 %

Inactivo: < 40 %

Identificación taxonómica de *Melissa officinalis* L. (toronjil)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA 26- 2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca de planta completa traída al laboratorio por la Srta: CELIA JUANA LOPEZ CASQUINA con DNI Nro. 45064325 para el análisis botánico corresponde a la especie *Melissa officinalis* L. "toronjil" de la Familia Lamiaceae obtenida de la localidad de Andagua. Dicha muestra fue obtenida de cultivo en chacras y jardines en la provincia de Castilla. Departamento de Arequipa. Para la Tesis titulada: "DETERMINACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LAS HOJAS DE TORONJIL FRENTE A CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC- 27853. para obtener el título profesional de Químico Farmacéutico de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas. Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE: ASTERIDAE
ORDEN: LAMIALES
FAMILIA: LAMIACEAE
GENERO: *Melissa*
ESPECIE: *Melissa officinalis* L.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 29 de Noviembre del 2017




Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

Certificado de análisis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa Catalog Number: 0353 Lot Number: 353-286 Reference Number: ATCC® 27853™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/5/15
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen(98%); And small and compact Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 21 mm  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

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 this certificate is the actual base lot number.

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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



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

TESTING CERT #2655.01

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 the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Pseudomonas aeruginosa
 Sample Description: 0353
 Sample ID: 353-286
 Sample Creation Date/Time: 2017-05-10T13:27:18.252 CC
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A6 (+++)(A)	353-286	Pseudomonas aeruginosa	2.27

Comments:

N/A

Activación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

KWIKSTIK™

KWIKSTIK™
plus

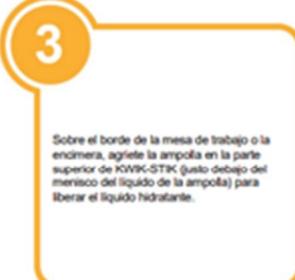
INSTRUCCIONES CON ILUSTRACIONES

- 

1

Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.
- 

2

Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquese a la placa de cultivo principal o al registro de CC. No desame el dispositivo durante la hidratación.
- 

3

Sobre el borde de la mesa de trabajo o la encimera, agriete la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- 

4

Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- 

5

Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- 

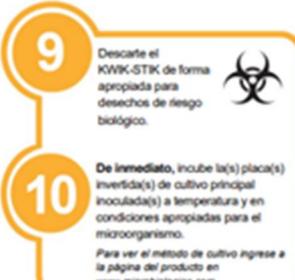
6

De inmediato, sature el hisopo abundantemente con el material hidratado y transféralo al medio con agar correspondiente o utilícelo según el procedimiento operativo estándar del laboratorio.
- 

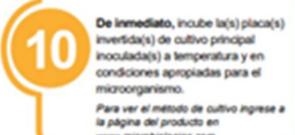
7

Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
- 

8

Por medio de un asa esterilizada, haga estrias para facilitar el aislamiento de la colonia.
- 

9

Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
- 

10

De inmediato, incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.
Para ver el método de cultivo ingrese a la página del producto en www.microbiologics.com.

Preparación del medio de cultivo del agar Mueller Hinton

Britanla[▲]

REF B0413784 REF B0413792 REF B2313731

Mueller Hinton Agar

IVD

USO

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

FUNDAMENTO

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0413784: 6 frascos x 50 ml.
Código B0413792: 12 frascos x 100 ml.
Código B2313731: envase x 10 placas.

FÓRMULA

INFUSIÓN DE CARNE	3000 g
PEPTONA ÁCIDA DE CASEÍNA	175 g
ALMIDÓN	15 g
AGAR	150 g
AGUA PURIFICADA	1000 ml
pH FINAL:	7,3 ± 0,1

Nota: la infusión de carne es equivalente a 3 g de polvo.

INSTRUCCIONES

Medio de cultivo listo para usar en frascos.

Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos.

Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar.

Cuando alcanzan temperatura 45-50 °C, abrirlos y distribuir en placas de Petri estériles en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal (25 a 30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

Preparación de Mueller Hinton Sangre Agar: agregar 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril (REF Britasheep) al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C. Homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

Placas listas para usar.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo color ámbar claro.

En caso de ser suplementado con sangre ovina: color rojo cereza.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo listo para usar en frascos a 10-35 °C

Medio de cultivo listo para usar en placas a 2-8 °C

PROCEDIMIENTO

Previo al uso, eliminar la humedad que pudiera existir en la superficie del medio de cultivo, ya sea mediante secado a 35-37 °C o bajo flujo laminar durante 10 - 30 minutos.

Siembra

Hisopado en superficie.

El inóculo microbiano dependerá del grupo microbiano o microorganismo en estudio.

INCUBACIÓN

La atmósfera, el tiempo y temperatura de incubación dependerán del grupo microbiano o microorganismo en estudio.

Preparación del medio de cultivo del agar Tripticasa de Soya

britanla[▲]

REF B0410284 REF B2310231

Tripteína Soya Agar

IND

USO

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

Al ser suplementado con sangre permite el crecimiento de microorganismos exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis.

Su fórmula cumple con los requerimientos de la Americanization of Pharmacopoeias Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimidínicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya además es fuente de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de diversos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Puede ser utilizado como base a la cual se suplementa con nutrientes o con antimicrobianos, lográndose un medio enriquecido o selectivo de acuerdo al aditivo.

El agregado de 5-10 % sangre ovina defibrada estéril (REF Britasheep) promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

El agregado de extracto de levadura en concentración 0,6 % favorece el crecimiento de especies de *Listeria*.

Es un medio adecuado para cultivar y mantener cepas de *Aeromonas*, y aumentando el porcentaje de cloruro de sodio, para mantener cepas de algunos *Vibrios* (excepto *V. cholerae*).

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0410284: 6 frascos x 50 ml.

Código B2310231: envase x 10 placas.

FÓRMULA

TRIPTEÍNA.....	150 g
PEPTONA DE SOYA.....	50 g
CLORURO DE SODIO.....	50 g
AGAR.....	150 g
AGUA PURIFICADA.....	1000 ml
pH FINAL: 7,3 a 7,2	

INSTRUCCIONES

Medio de cultivo listo para usar en frascos

Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo adido contenido en los mismos.

Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar.

Cuando alcanzan temperatura 45-50 °C, abrirlos y distribuir aproximadamente 15 ml en placas de Petri estériles.

Preparación de Agar Sangre: agregar 5-10 % de sangre ovina defibrada estéril (REF Britasheep) al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C. Homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

Placas listas para usar.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo color ámbar claro.

En caso de ser suplementado con sangre ovina: color rojo cereza.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo listo para usar en frascos: a 10-35 °C.

Medio de cultivo listo para usar en placas: a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Previo al uso, eliminar la humedad que pudiera existir en la superficie del medio de cultivo, ya sea mediante secado a 35-37°C o bajo flujo laminar durante 10 - 30 minutos.

Siembra

Por inoculación directa del material en estudio, sobre la superficie del medio de cultivo.

Incubación

El tiempo, la temperatura, y la atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

En general se recomienda:

Bacterias de fácil crecimiento: en aerobiosis, a 35-37° C durante 18 a 24 horas.

Bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales: en atmósfera con 5 % de CO₂, a 35-37 °C durante 24-48 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Observar las características de las colonias.

Para el medio de cultivo conteniendo sangre, observar las reacciones de hemólisis:

Anexo C. evidencias fotográficas del trabajo de campo



Figura 2. Recolección de la planta de *Melissa officinalis* L. (toronjil) del distrito de Andagua, provincia de Castilla y departamento de Arequipa.



Figura 3. Hojas frescas de *Melissa officinalis* L. (toronjil).



Figura 4. Hojas secas y pulverizadas de *Melissa officinalis* L. (toronjil).



Figura 5. Filtración del extracto de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil).



Figura 6. Eliminación del solvente para obtener la melcocha del toronjil.



Figura 7. Obtención de la melcocha.



Figura 8. Ensayo para detección de flavonoides.



Figura 9. Ensayo para detección de ácidos fenólicos.



Figura 10. Ensayo para detección de alcaloides.



Figura 11. Ensayo para detección de taninos.



Figura 12. Preparación de la escala 0,5 de Mc Farland.



Figura 13. Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



Figura 14. Activación de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*.



Figura 15. Preparación de medios de cultivos.



Figura 16. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Mac Conkey.

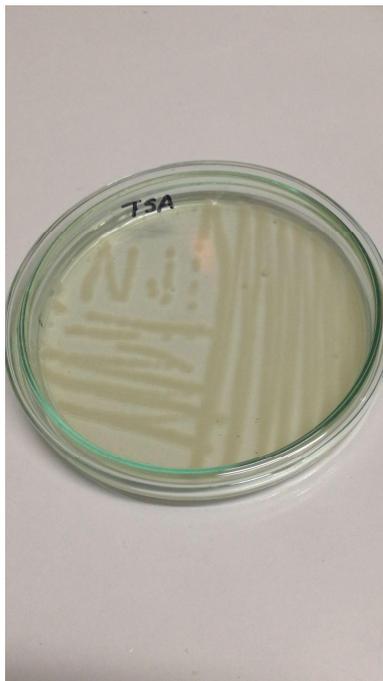


Figura 17. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar de tripticasa soya.

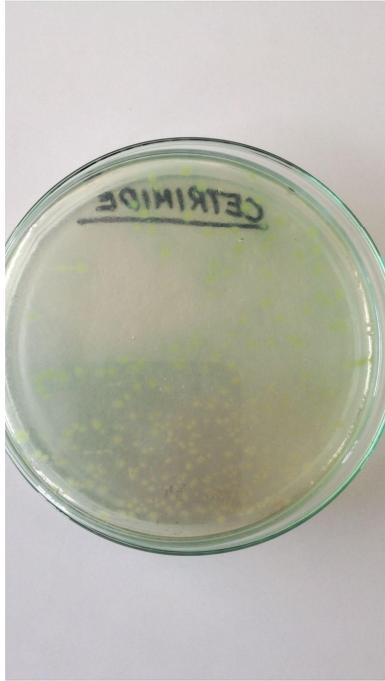


Figura 18. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar de cetrimide.



Figura 19. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar de sangre.



Figura 20. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar de count plate.



Figura 21. Preparación y esterilización de los discos de papel Whatman.



Figura 22. Preparación de los discos de sensibilidad con las concentraciones al 20 %, 40 % y 60 % del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil).



Figura 23. Preparación de la solución microbiana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ajustando a la escala de 0,5 de Mc Farland.

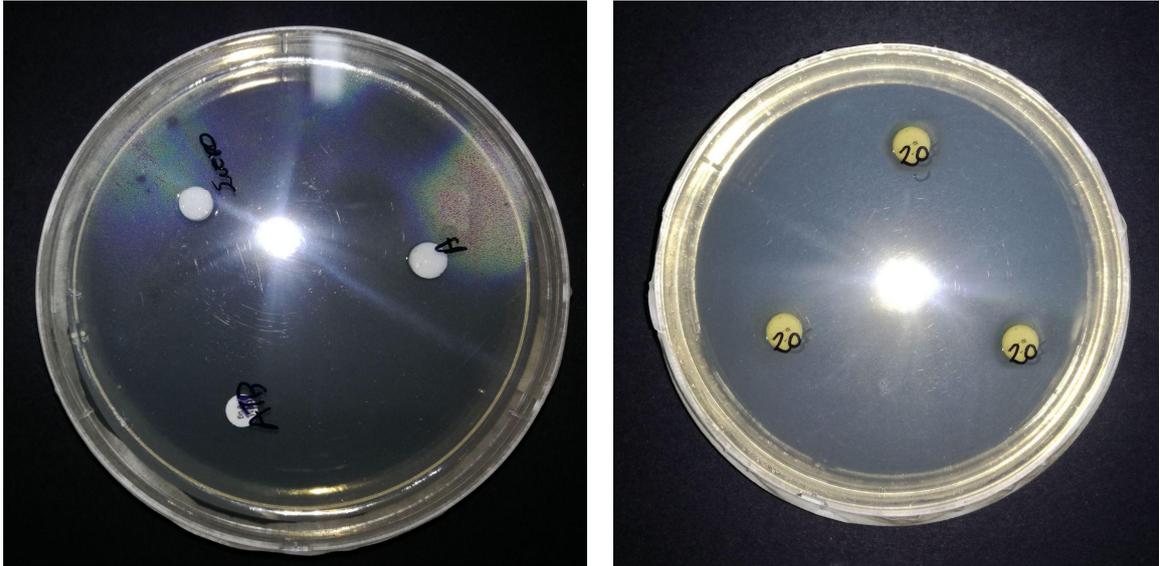


Figura 24. Inoculación de los discos embebidos con alcohol etílico al 96 %, con gentamicina 10 µg y a una concentración de 20 % del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) en el medio cultivo previamente inoculado con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

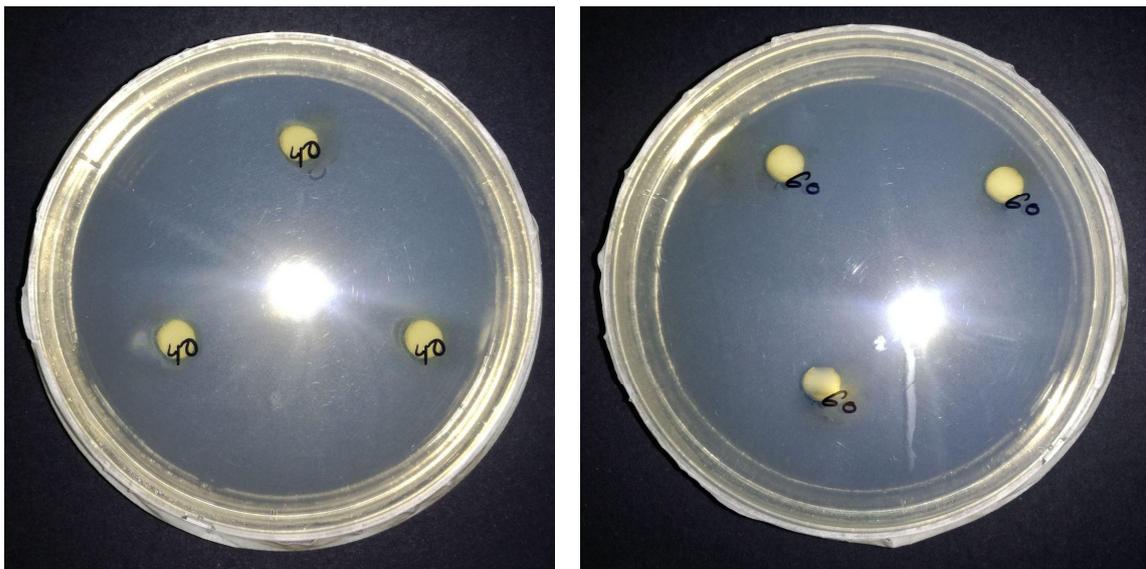


Figura 25. Inoculación de los discos embebidos a una concentración de 40 % y 60 % del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) en el medio cultivo previamente inoculado con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

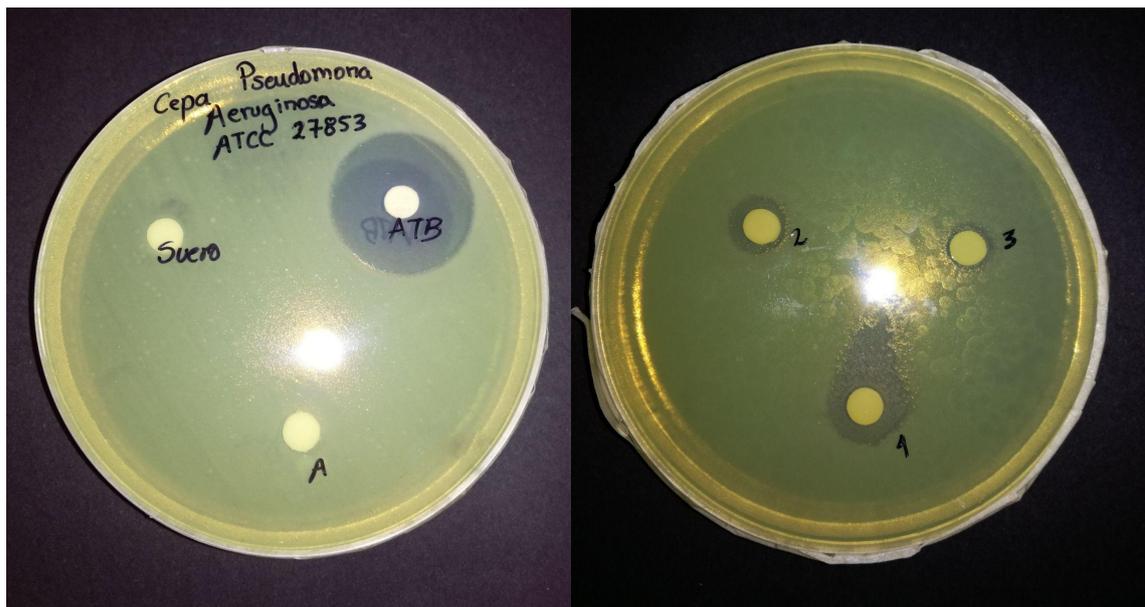


Figura 26. Halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) del control positivo, control negativo y la concentración al 20 % frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

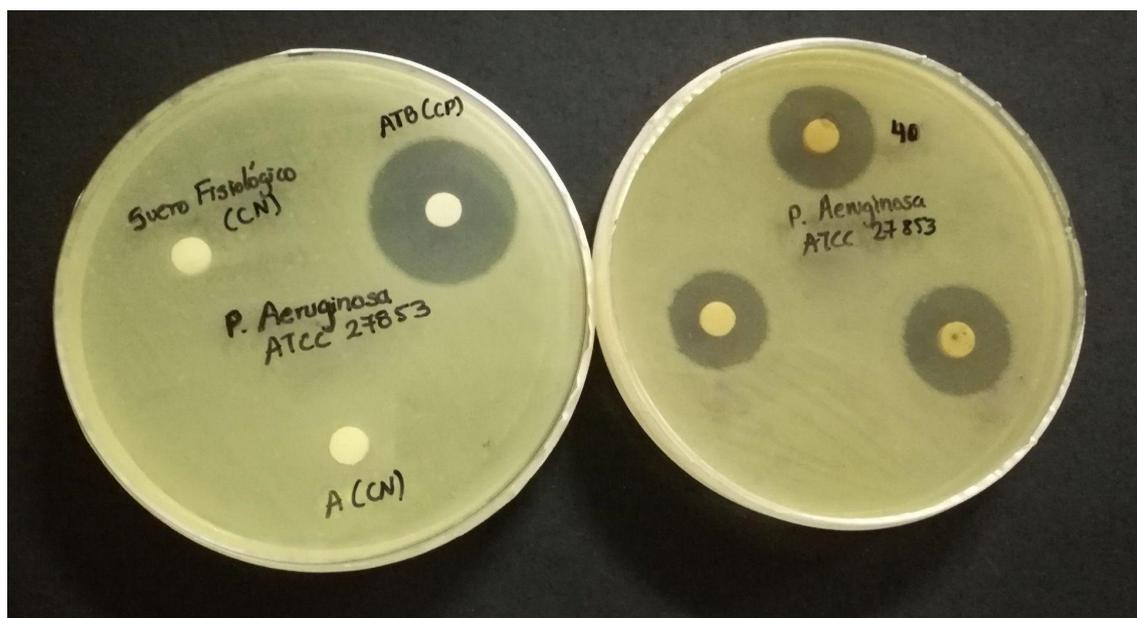


Figura 27. Halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) del control positivo, control negativo y la concentración al 40 % frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

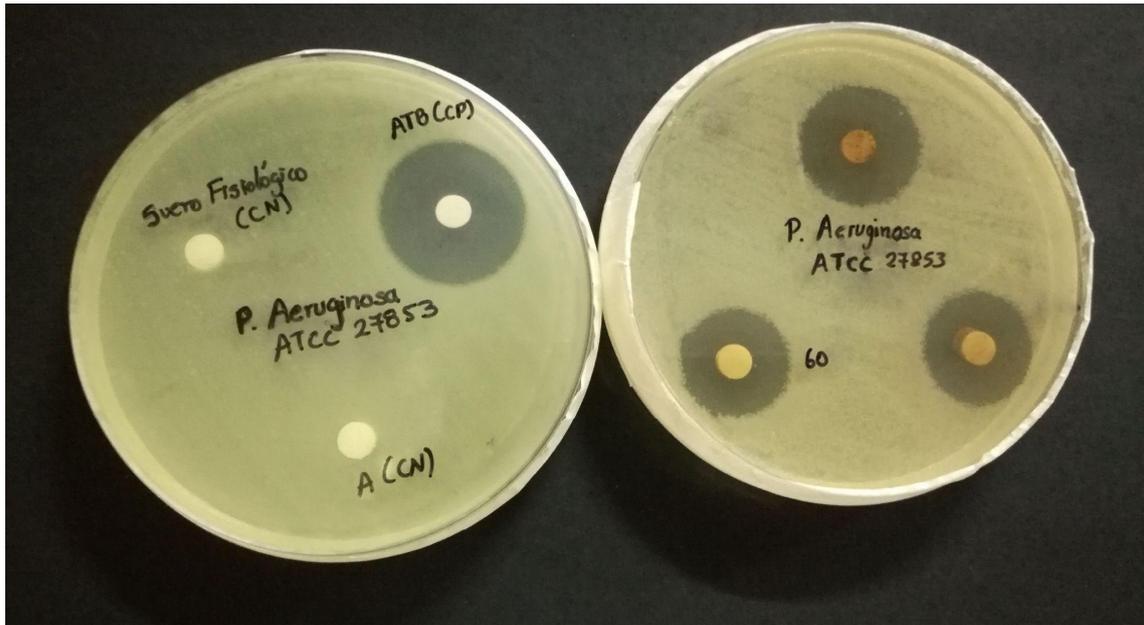


Figura 28. Halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) del control positivo, control negativo y la concentración al 60 % frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.