



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

TESIS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Melissa officinalis* L. (TORONJIL) Y *Piper aduncum* (Matico) Frente A *Fusobacterium nucleatum*, EN LOS LABORATORIOS FORENSE LAMBAYEQUE Y MICROCLIN TRUJILLO, 2021

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

AUTORES

**BACH. GUERRERO RUIDIAS, SAYRA ESTHER
BACH. SANTAMARÍA INOÑAN, MILAGROS**

ASESOR

DR. OSCAR FAVIO ROJAS WISA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Recursos Naturales

Huancayo – Perú

2021

DEDICATORIA

Dedico con gran orgullo mi tesis a la mujer más valiente de este mundo a mi madre, María Inoñan Sánchez que lucha día a día con gran esfuerzo sin importar las horas de cansancio y sacrificio; y por haberme formado con buenos valores y principios, sobre todo apoyarme incondicionalmente para realizar uno de mis más grandes anhelos en mi vida culminar mi carrera profesional

A mis hermanas, Marianela y Maribel por sus palabras de motivación y consejos positivos que me han brindado durante mi proceso de estudios, las quiero mucho.

Milagros

Dedico este trabajo a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, de igual manera a mis padres Flodoardo y Elsa quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades.

Dedico esta tesis a mis grandes amores: mi esposo Miguel mi gran compañero quien ha estado conmigo en todo momento alentándome y motivándome sin desmayar siendo, mi gran soporte y apoyo en todo momento, también a mis hijos Luciana, Saymi y Keyler quienes entendieron y apoyaron todo mi proceso.

Sayra Esther

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Franklin Roosevelt por permitirnos ser parte de ella y culminar nuestra carrera de Farmacia y Bioquímica.

A nuestro asesor Dr. Rojas Wisa Oscar Favio, por sus orientaciones y aporte para poder culminar nuestra tesis.

A nuestro profesor DR. Martin Silva Romero, por brindarnos su apoyo incondicional en la elaboración de nuestro proyecto.

Milagros y Sayra

JURADOS

PRESIDENTE

Mg Lopez Calderon, Rocio Jeronima

MIEMBRO SECRETARIA

Mg Diaz Uribe, Julio Luis

MIEMBRO VOCAL

Dr Rojas Wisa, Oscar Favio

MIEMBRO SUPLENTE

Mg Quezada Reyes, Antonio Fernando

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo **Sayra Esther Guerrero Ruidias**, de Nacionalidad Peruana, identificada con, DNI N° 47498342, Tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, domiciliada en calle santos Chocano 212 PJ. Santa Rosa Chiclayo, Lambayeque. DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACIÓN PRESENTADA ES AUTÉNTICA Y VERAZ. Me afirmo y me ratifico en lo expresado en señal de lo cual firmo el presente documento a los 05 días del mes de setiembre del 2021.



.....
Sayra Esther Guerrero Ruidias
DNI: 47498342



DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **Milagros Santamaría Inoñan**, de Nacionalidad Peruana, identificada con, DNI N° 46242232, Tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, domiciliada en la Calle Libertad N° 215 Illimo, Lambayeque. DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACIÓN PRESENTADA ES AUTÉNTICA Y VERAZ. Me afirmo y me ratifico en lo expresado en señal de lo cual firmo el presente documento a los 05 días del mes de agosto del 2021.



.....
Milagros Santamaría Inoñan
DNI: 46242232



ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. MÉTODO.....	19
2.1. Tipo y diseño de investigación.....	19
2.2. Operacionalización de las variables.....	20
2.3. Población, muestra y muestreo.....	21
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	21
2.5. Procedimiento.....	22
2.6. Método de Análisis de datos.....	24
2.7. Aspectos éticos.....	24
III. RESULTADOS.....	25
III. DISCUSIÓN.....	32
IV. CONCLUSIONES.....	34
V. RECOMENDACIONES.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXOS.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico realizado al extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (matico).....	25
Tabla 2. Análisis de los diámetros de los halos de inhibición para los extractos etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (Matico) y grupos control sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> (anexo 6):.....	26
Tabla 3. Análisis de la distribución normal de los halos de inhibición para los extractos etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (Matico) y grupos control sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>	28
Tabla 4. Análisis de la homogeneidad de varianzas para los extractos etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (Matico) y grupos control sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>	29
Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) para los extractos etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (Matico) y grupos control sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>	29
Tabla 6. Análisis por subgrupos homogéneos de la prueba de TUKEY para los extractos etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (Matico) y grupos control sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>	30
Tabla 7. Valoración de la actividad antibacteriana para los extractos etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (Matico) y grupos control sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de medias de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos por los extractos etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (Matico) y grupos control sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>	27
Figura 2. Lavado, desinfección y secado de las muestras	46
Figura 3. Recolección de la muestra.....	46
Figura 4. <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil)	47
Figura 5. <i>Piper aduncum</i> (matico)	47
Figura 6. Secado y deshidratación de la muestra en estufa	48
Figura 7. Trituración, pulverizado, tamizado y maceración de las muestras	48
Figura 8. Evaporación del solvente en estufa	49
Figura 9. Filtración de los macerados de ambas muestras	49
Figura 10. Reacción positiva para $FeCl_3$ y Dragendorff.....	50
Figura 11. Reacciones de coloración del estudio fitoquímico.....	50
Figura 12. Activación de la cepa, preparación del inóculo y sembrado en placa.....	51
Figura 13. Preparación de los discos e incubación	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia	38
Anexo 2. Operacionalización de las variables.....	39
Anexo 3. Identificación taxonómica de las especies vegetales.....	40
Anexo 5. Certificado de análisis de la cepa	43
Anexo 6. Recolección de datos	45
Anexo 7. Evidencias del trabajo de campo.....	46

RESUMEN

Las infecciones se han convertido en un grave problema de salud que requieren de inmediata atención, por otra parte, las plantas medicinales han sido fuentes de tratamientos de muchas enfermedades, toronjil y matico son plantas reconocidas por sus propiedades medicinales y *Fusobacterium nucleatum* es una bacteria común en la cavidad bucal que provoca infecciones comunes en esta zona y puede extenderse a otras partes del cuerpo.

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis L.* (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum*.

Metodología: La investigación es de tipo analítica, transversal, prospectiva con diseño experimental. Se trabajó con 2 kg de hojas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) y se elaboró el extracto mediante maceración en etanol de 96° preparando dos concentraciones de 100% y 50% para cada planta, los extractos enfrentaron a cepas de *Fusobacterium nucleatum* mediante la técnica de Kirby Bauer para determinar su actividad antibacteriana.

Resultados: Los halos de inhibición obtenidos para el extracto etanólico de toronjil al 100% fue de 15,99mm \pm 0,32 y de 11,42mm \pm 0,23 para el 50%, así mismo el extracto etanólico de matico obtuvo halos de inhibición promedio de 12,97mm \pm 0,30 y 10,06mm \pm 0,31 para la concentración al 100% y 50% respectivamente, con respecto al control negativo (etanol) obtuvo un halo promedio de 6,05mm \pm 0,28 y el control positivo (ciprofloxacino) de 21,93mm \pm 0,37.

Conclusión: Los extractos etanólicos de *Melissa officinalis L.* (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) presentaron actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum*.

Palabras clave: *Fusobacterium nucleatum*, *Melissa officinalis*, *Piper aduncum*, toronjil, matico, extracto etanólico.

ABSTRACT

Infections have become a serious health problem that requires immediate attention, on the other hand, medicinal plants have been sources of treatments for many diseases, lemon balm and matico are plants recognized for their medicinal properties and *Fusobacterium nucleatum* is a common bacterium in the oral cavity that causes common infections in this area and can spread to other parts of the body.

Objective: To determine the antibacterial activity of the ethanolic extract of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Piper aduncum* (matico) against *Fusobacterium nucleatum*.

Methodology: The research is analytical, cross-sectional, prospective with experimental design, work with 2 kg of leaves of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Piper aduncum* (matico) and the extract was elaborated by maceration in 96 ° ethanol and prepared two concentrations of 100% and 50% for each plant, the extracts faced *Fusobacterium nucleatum* strains using the Kirby Bauer technique to determine their antibacterial activity.

Results: The inhibition halos obtained for the 100% lemon balm ethanolic extract was 15.99mm + 0.32 and 11.42mm + 0.23 for 50%, likewise the matico ethanolic extract obtained inhibition halos average of 12.97mm + 0.30 and 10.06mm + 0.31 for the concentration at 100% and 50% respectively, with respect to the negative control (ethanol) it obtained an average halo of 6.05mm + 0.28 and the positive control (ciprofloxacin) of 21.93mm + 0.37.

Conclusion: The ethanolic extracts of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Piper aduncum* (matico) showed antibacterial activity against *Fusobacterium nucleatum*.

Key words: *Fusobacterium nucleatum*, *Melissa officinalis*, *Piper aduncum*, lemon balm, matico, ethanolic extract.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos decenios, muchas investigaciones señalan la importancia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum* en la implicancia de enfermedades bucales que afectan el tejido periodontal. Estas bacterias patógenas en su mayoría son bacilos Gram negativos que se caracterizan por su capacidad de colonizar, para evadir mecanismos de defensa y producir sustancias que destruyen el tejido ocasionando pérdidas dentales que afectan la autoestima de las personas. Además, *Fusobacterium nucleatum* forma parte de la microbiota oral en las personas y es el segundo microorganismo más aislado en enfermedades infecciosas de la cavidad oral.¹ *Fusobacterium nucleatum*, es una cepa bacteriana que habita en la boca de las personas, constituye un factor clave en los procesos infecciosos periodontales, debido a su elevada capacidad de colonización y facilidad para unirse con otros microorganismos, además esta bacteria pertenece a la microbiota natural placentaria.² En algunas literaturas se han reportado que las enfermedades periodontales producidas por *F. nucleatum* están relacionadas con los nacimientos prematuros en las mujeres, debido a que se han encontrado y aislado células de dicho microorganismo en la placenta y líquido amniótico. Además, algunos laboratorios de investigación han realizado bioensayos en animales inoculando a su organismo *F. nucleatum*, como resultado tuvieron partos con prematuridad al igual que en las mujeres. Estos hechos evidencian una posible relación causal de las enfermedades periodontales ocasionadas por *F. nucleatum* y en algunos casos de parto prematuro. Adicionalmente, esta bacteria también ha sido aislada de la cavidad vaginal, específicamente en mujeres con infecciones vaginales y se encuentra relacionada con la prematuridad e infecciones uterinas.³ Por otro lado, *Fusobacterium nucleatum* está asociada al cáncer de colon y ha sido descrito el mecanismo que utiliza este patógeno para inducir el crecimiento de células cancerígenas, produciendo una inflamación e irritación en el tejido del colon; sugiriendo carcinogénesis directa.⁴ Por ello, la presente investigación tiene como propósito determinar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos por las plantas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum* para de esa manera brindar una alternativa fitoquímica en el tratamiento de infecciones ocasionados por dicha bacteria con precios accesibles para la población. Al respecto de los estudios de estas dos plantas *Melissa officinalis* L. (toronjil) y

Piper aduncum (matico) presentan estudios con efecto bactericida. Como **Antecedentes Nacionales** tenemos a **Mendoza M. (2019)** en su investigación “Efecto antibacteriano del aceite esencial de Piper aduncum “matico” sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923 comparado con Oxacilina, estudio in vitro”, evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial de P. aduncum “matico” sobre S. aureus. Para la ejecución se prepararon las siguientes concentraciones del aceite esencial de matico 100, 75, 50 y 25% y para la actividad antibacteriana se aplicó el método difusión en disco. El matico formo halos inhibitorios a partir de la concentración de 75% (13.70mm) y 100% (16.50mm), pero no supero al control positivo (oxacilina). Se concluye que el aceite esencial de Piper aduncum presenta efecto antibacteriano sobre S. aureus, aunque no supera al fármaco Oxacilina.⁵ **Ingaroca S., Castro A. y Ramos N. (2019)**, elaboraron un estudio del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” con el objetivo de determinar su composición química, actividad antioxidante y efecto fungistático. El aceite se obtuvo de las hojas de matico por destilación, la composición fitoquímica se analizó en el cromatógrafo de gases, la capacidad antioxidante se evaluó por DPPH y ABTS y el efecto fungistático por microdilución en caldo. Los componentes principales fueron metileugenol, germacreno D, biciclogermacreno, β -cariofileno, δ - cadineno y β -ocimeno; su actividad antioxidante fue mínima y el efecto fungistático sobre *Cándida albicans* también. Se concluyó que la acción del aceite esencial de matico sobre *C. albicans* es minima.⁶ **Angulo D. y Dionisio A. (2019)**, en su estudio titulado “Perfil de seguridad de formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) mediante el método Het-Cam” se evaluó la confiabilidad de las formulaciones magistrales elaboradas a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis*. El estudio fue experimental y para evaluar el índice de irritabilidad se aplicó el método de HET-CAM, para lo cual se adquirieron 50 huevos de gallina fértil; el extracto hidroalcohólico se elaboró con las hojas secas. Se elaboró la formulación magistral de crema base (Lannett) con extractos al 5%, 10%, 50%. Se concluyó que la crema base elaborada con extracto hidroalcohólico de toronjil es segura y pueden aplicarse en alergias, quemaduras o heridas.⁷ De igual manera, **Antecedentes Internacional** también se muestra el estudio de **Guayas J. y Lazo P. (2020)**, evaluaron la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*, *Piper aduncum*, *Artemisa absinthium* frente a *E. coli*. Se prepararon extractos etanólicos por maceración en 3 días y la actividad antibacteriana se evaluó por el método de microdilución en placa

estandarizado. En los resultados se observó que el extracto etanólico de *U. tomentosa* presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) a los 625µL y los extractos de *Piper aduncum* y *A. absinthium* no presentaron efecto bactericida, se visualizó inhibición en el crecimiento bacteriano, deduciendo por los resultados que presenta un efecto bacteriostático. Se concluye que *Piper aduncum* presenta un ligero efecto inhibitor en el crecimiento bacteriano.⁸ **Derradji L., Saidi O. y Hadeff Y. (2020)**, publicaron un artículo cuyo objetivo consistió en evaluar la actividad antibacteriana de tres aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas como *S. officinalis* L., *Melissa officinalis* L. y *O. vulgare* L. El aceite esencial con respecto a la especie *Melissa officinalis* fue obtenido a partir de los tallos y hojas secas por el método de destilación por arrastre con vapor y para evaluar su actividad antibacteriana se aplicó el antibiograma de difusión en disco de 6mm, los mismos que fueron embebidos con el aceite esencial al 100% y 50% y se expusieron sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*; la dilución del aceite se realizó con DMSO. Los resultados con respecto al aceite de *Melissa officinalis* al 100% presentó un halo de inhibición promedio 27mm frente a *S. aureus* y 21mm para *E. coli*, al 50% formó halos de 10.5mm y 8.5mm para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Se concluyó que el aceite esencial al ser diluido pierde su actividad antibacteriana sobre las cepas trabajadas, sin embargo al 100% si presentó actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.³ **Abdel W., Fahim J., Fouad M. y Kamel M. (2019)**, realizaron un trabajo “Estudios antibacterianos, antifúngicos y análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) de *Melissa officinalis*”, este estudio se llevó a cabo para evaluar el potencial antimicrobiano del extracto etanólico de *M. officinalis* sobre microorganismos patógenos humanos. Las muestras analizadas demostraron potencias inhibitoras contra *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa* con concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) que oscilan entre 1,65 y 191,40 µg / ml; el extracto mostró actividad contra *C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata*. Se caracterizaron varios metabolitos con propiedades antimicrobianas bien conocidas, en su mayoría dominados por ácidos grasos y terpenoides siendo el metilcommate A, el ácido palmítico y el fitol los principales componentes identificados. Se concluyó que los extractos etanólicos de *M. officinalis*, presenta actividad antibacteriana y antifúngica.⁹ Con respecto a las bases teóricas del estudio tenemos que ***Piper aduncum* (matico)**, la siguiente clasificación taxonómica Reino: Plantae; División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida; Orden: Piperales; Familia: Piperaceae; Género: *Piper*;

Especie: *Piper adunculum*.⁹ Se caracteriza por ser un árbol de 2-8 m de altura con hoja perenne, también se puede encontrar como arbusto, sus hojas son en lámina oblongo-elíptica a lanceolada, miden aproximadamente 12-20 cm de largo por 3-9 cm de ancho, el tronco tiene alrededor de 7 cm de diámetro la superficie superior es escabrosa, su inflorescencia es a menudo bisexual, de hojas arqueadas, brácteas florales redondeadas subtriangulares, de 0,4 a 0,7 mm de ancho, ciliadas densamente de color amarillo-blancas.¹¹ La flor masculina tiene de 2 a 3 estambres; la flor femenina sésil, no presenta pedúnculo. Su fruto es una baya, obovoide, de 0,8 a 1 mm de diámetro. *P. aduncum* crece en áreas abiertas o perturbadas, en bordes del camino y a lo largo de arroyos, hasta 1500 m de altitud.¹² El *P. aduncum* es una planta oriunda del Perú que crece en los valles interandinos de Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, México y en el Asia. En Estados Unidos su uso es como condimento y en Europa la aplicación es por su poder aromatizante, estimulante, astringente, también por su poder para disminuir las cicatrices, inflamación y hemorragia.¹³ Las hojas el aceite esencial de matico presenta en su composición asarona y coneol. También, es usado para matar mosquitos y moluscos. Contiene safrol, que se viene utilizando con éxito en la industria de la perfumería y en la elaboración de desinfectantes.¹⁴ El aceite esencial contiene 5-metoxi-6 (2'-propen) – benzodioxole, etoxidillapiol y piperitona. Los frutos contienen: ácido 4-metoxi-3, 5-bis (3'-metil-but-2'-en-1')-benzoico. Sus hojas presentan: dillapiol y alcanfor, taninos, saponinas y flavonoides.¹⁵ Por otro lado, ***Melissa Officinalis* (toronjil)** tiene la siguiente clasificación taxonómica, Reino Plantae; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Orden: Lamiales; Familia: Lamiaceae; Género: Melissa; Especie: *Melissa officinalis* L. Es originaria del sur de Europa, norte de África y Asia, donde se ubica en zonas húmedas cerca de ríos o lagos. En Marruecos crece en forma silvestre en la región de Sefrou, donde se consume como té, por sus propiedades beneficiosas para la salud.¹⁵ Se caracteriza por contener ácidos hydroxycinamicos (rosmarinico, p-coumarico, clorogénico) y aceites esenciales, donde destacan en mayor proporción los terpenoides como el citral (mezcla de neral y geranial), nerol, geraniol, citronelal y linalol. Además, la planta también contiene flavonoides y taninos.¹⁴ Contiene también ácido ursólico, ácido cafeico, quercitrósido, monoterpenos, oxido de cariofileno y farnesol.¹⁶ Entre sus usos terapéuticos se menciona que actúa como estimulante del sistema digestivo, antibacteriano, antiviral y antifúngico, sedante, antiespasmódico, antiulceroso, anticonvulsivo, diaforético, en el tratamiento del insomnio y alteraciones del sueño, en la ansiedad y depresión, en el tratamiento del Alzheimer, migraña y

cambios de humor, la menstruación irregular y dolor de muelas¹⁶ Con respecto al Tamizaje fitoquímico se puede realizar mediante los siguientes ensayos: El ensayo de Mayer y el de Wagner, permite la identificación de alcaloides, su procedimiento se realizad de acuerdo al ensayo de Dragendorff, hasta la obtención de una solución ácida. Con el reactivo de Mayer o Wagner se aprecia opalescencia, turbidez definida, precipitado (alcaloides). Para alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, presentes generalmente en extractos acuosos confirmatorio mediante turbidez o un precipitado.¹⁷ El ensayo de Baljet, permite determinar cumarinas (lactonas), no obstante, otros componentes láctónicos la reacción positiva da una coloración y un precipitado.¹⁸ La identificación de quinonas se realiza mediante el ensayo de Borntrager, en la fase acuosa alcalina cambia de rosado a rojo entonces se considera reacción positiva. La identificación de triterpenos y/o esteroides, se realiza mediante el ensayo de Liebermann - Burchard.¹⁹ Para determinar la presencia de aminoácidos libres o de aminas se procede como el ensayo de Ninhidrina. El ensayo se considera positivo cuando se torna en un tono violáceo. La identificación de flavonoides en extractos vegetales se realiza mediante el ensayo de Shinoda, la cual se considera positivo cuando el alcohol amílico vira de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los escenarios. Dentro de este grupo de flavonoides se encuentran las antocianidinas para identificarlos en los extractos la aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es sinónimo de un ensayo positivo. Por otro lado, la presencia de estructuras tipo polisacárido indica la presencia de mucílagos.²⁰ El ensayo de espuma nos permite identificar saponinas en todas sus estructuras, el ensayo de Fehling identifica azúcares reductores y se considera positivo si la solución vira de rojo o aparece un precipitado rojo.²⁰ Con respecto al **planteamiento del problema**, ¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum*?, a partir de este problema general se formularon los **problemas específicos** ¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) al 100% y 50% frente a *Fusobacterium nucleatum*?, ¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) al 100% y 50% frente a *Fusobacterium nucleatum*? y ¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum* comparado con ciprofloxacino?

El estudio presenta justificación teórica, en el sentido que los resultados servirán de base y sustento para respaldar futuras investigaciones, así mismo, presenta justificación práctica ya que a partir de estos extractos se puede elaborar formulaciones farmacéuticas que servirán para el tratamiento de enfermedades en las personas, así mismo, muestra una reducción en el costo de tratamiento al servir como complementario al farmacológico sobre este tipo y otros tipos de bacterias además de servir como piedra angular para elaborar la investigación validando la metodología empleada. El **objetivo general** planteado de la investigación es Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum*, de igual manera se formularon los **objetivos específicos** Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) al 100% y 50% frente a *Fusobacterium nucleatum*, Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) al 100% y 50% frente a *Fusobacterium nucleatum* y Comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum* con ciprofloxacino. En el mismo sentido se formula la **hipótesis general** que da respuesta al problema del estudio: El extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) presenta actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum*, y como **hipótesis específicos** los siguientes: El extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) al 100% y 50% presenta actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum*, El extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) al 100% y 50% presentan actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum* y El extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) presentan actividad antibacteriana mayor frente a *Fusobacterium nucleatum* que el ciprofloxacino.

II. MÉTODO

2.1. Tipo y diseño de investigación

2.1.1 Tipo de investigación

- Analítica:
Busca analizar las variables en estudios y establecer sus diferencias y similitudes.
- Transversal:
La recolección, identificación y análisis de las variables y su respuesta se realiza en un solo momento.
- Prospectiva:
Los resultados serán estudiados posterior a la toma recolección de los datos.

2.1.2. Diseño de investigación

Es experimental, el experimentador buscará mediante la manipulación de la variable independiente el efecto sobre producido sobre la variable dependiente.

G ₁	-----	X ₁	-----	O ₁
G ₂	-----	X ₂	-----	O ₂
G ₃	-----	(-)	-----	O ₃
G ₄	-----	(+)	-----	O ₄

G: Grupo de cepas de *Fusobacterium nucleatum*

X₁: Tratamiento con extracto etanólico de hojas *Melissa officinalis L.*

X₂: Tratamiento con extracto etanólico de hojas *Piper aduncum*

(-): Tratamiento con control negativo (Etanol)

(+): Tratamiento con control positivo (ciprofloxacino)

2.2. Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Extracto etanólico de hojas <i>Melissa officinalis</i> L	Sustancias activas obtenidas por medio de maceración con etanol	Controles	Positivo (ciprofloxacino)	milímetros
			Negativo (etanol)	
Extracto etanólico de hojas de <i>Piper aduncum</i>	Sustancias activas obtenidas por medio de maceración con etanol	Marcha fitoquímica	Alcaloides (Dragendorf)	Positivo: Naranja/rojo
			Compuestos Fenólicos (Tricloruro Férrico)	Positivo: Rojo vino
			Taninos (Acetato de plomo)	Positivo: Precipitado blanco
			Cumarinas (Baljet)	Positivo: Rojo
			Aminoácidos (Ninhidrina)	Positivo: Violeta
			Flavonoides (Shinoda)	Positivo: Rojo-anaranjado
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Efecto antibacteriano frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Inhibición en el crecimiento bacteriano de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Tamaño del halo de inhibición	$\leq 8\text{mm}$ 8mm a 14mm 15mm a 20mm > a 20mm	Nula Sensible Medio Muy sensible

2.3. Población, muestra y muestreo

2.2.1. Población

- *Melissa officinalis L* y *Piper aduncum* recolectadas en el distrito de Niepos, San Miguel, departamento de Cajamarca.

2.2.2. Muestra

- Extracto etanólico de *Melissa officinalis L* y *Piper aduncum*

Criterios de inclusión

- Identificadas taxonómicamente de las plantas en estudio
- Muestras sin infecciones
- Muestras frescas
- Muestras procedentes del distrito de Niepos, San Miguel, departamento de Cajamarca
- Recolectadas durante Julio a Setiembre

Criterios de exclusión

- Muestras marchitas o deterioradas
- Hojas y frutos en descomposición
- Muestra de diferente especie vegetal

2.2.3. Muestreo

No probabilístico por conveniencia.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.3.1. Técnicas^{4,5}

Extracción etanólica

Técnica que permite obtener mediante la **maceración con etanol de 96°** los metabolitos secundarios de la planta.

Difusión en agar (Kirby - Bauer)

Técnica que permite obtener información mediante la aplicación de discos sumergidos con la sustancia a analizar su antibiograma.

2.3.2. Instrumentos de recolección de datos

Vernier digital: Instrumento que permitirá determinar el tamaño del halo de inhibición.

Registro de datos: Los datos serán registrados en un formato (ver anexo 02) de manera ordenada y sencilla con la finalidad de evitar errores.

Bases de datos: Los datos finalmente se ingresarán a la hoja de cálculo Excel de Microsoft Office 2016, para obtener el análisis inicial de la estadística experimental.

2.5. Procedimiento

Recolección y preparación de la muestra

Las muestras vegetales serán recolectadas en el distrito de Niepos, San Miguel, departamento de Cajamarca, para lo cual se coordinó con el propietario de terreno agrícola para la adquisición de la muestra vegetal

Se adquirió una cantidad de aproximadamente 2Kg de hojas de cada especie seleccionadas según criterios de inclusión y exclusión. Las muestras presentaron similares características con respecto al peso, madurez y conservación.

Una vez adquirida las muestras, fueron lavadas con lejía al 1% y luego con agua abundante de grifo por un periodo de 10 minutos, posteriormente fueron extendidas en una mesa sobre papel kraft, a corriente de aire directa por 3 días y llevadas luego a estufa a 45°C por 7 horas.

Obtención del extracto etanólico

Las hojas secas de cada especie vegetal fueron trituradas y separadas de las nervaduras de las hojas, luego fueron pulverizadas en molino eléctrico de cuchillas y llevadas a través de un tamiz ASTM 30 para uniformizar la muestra, luego se colocó en envases 2.5 L donde se agregó 1 litro de etanol de 96° por cada 500 gr. de muestra, se dejó macerar por 7 días con agitación por 10 minutos 2 veces al día, posteriormente se filtró. Este procedimiento se realizó para cada especie botánica por separado.

El filtrado de cada muestra vegetal obtenido se llevó a estufa a 60°C hasta eliminar completamente el etanol, obteniendo de esta manera el extracto etanólico de ambas muestras.

Reactivación de la cepa de *Fusobacterium nucleatum*:

Se trabaja con *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586TM la que son activadas según la especificación del proveedor de la cepa.

Se coloca el liofilizado en un medio nutritivo en agar sangre de cordero al 5% y se lleva a incubación a 35°C ± 1 por un periodo de 24 horas en un medio anaeróbico.

Sembrado en placa de la cepa *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586TM:

De las cepas reactivadas se toman dos asadas de la placa con el cultivo y realiza diluciones en solución salina fisiológica hasta llegar a la concentración similar del nefelómetro de McFarland de 0.5.

Una vez obtenida el 0.5 en la escala de **Mc Farland** se toma con un hisopo el inóculo y se presiona por las paredes para eliminar el exceso para luego aplicar mediante la técnica de sembrado en estrías en Agar Triptona-Soja (TSA).

Se prepararán 15 placas con *Fusobacterium nucleatum* las que son distribuidas equitativamente entre los grupos problema y control.

Evaluación del efecto de los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L y *Piper aduncum*

- a) Con pinzas estériles se coloca en cada placa seis (6) discos de papel de filtro de la manera siguiente:
 - 01 disco con 10 uL de etanol 96° (control negativo).
 - 01 disco con 10 uL de ciprofloxacino (control positivo)
 - 4 discos con 10 ul de extracto etanólico de las hojas *Melissa officinalis* L y *Piper aduncum* al 50% y 100% los que serán colocados en todas las placas.
- b) Las placas se incuban por 24 horas a 35°C
- c) Luego de esto se procederá a tomar las medidas de los halos de inhibición formados mediante un pie de rey digital, se registran las mediciones en el formato de registro.

2.6. Método de Análisis de datos

Los datos se ingresaron a una hoja de cálculo en Excel donde se obtuvo la estadística descriptiva con respecto a la media y desviación estándar, luego son exportados al programa estadístico SPSS versión 26 donde se realizan pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianza, luego se aplica la prueba inferencial de Tukey para determinar el grado de correspondencia de los grupos y controles con un nivel de confianza del 95%.

2.7. Aspectos éticos

El presente trabajo de investigación no presenta ningún riesgo en personas o animales debido a que no se trabaja ni manipulará con estos, sin embargo, el manejo de microorganismos patógenos amerita el debido cuidado en la manipulación y eliminación de los desechos, por lo que se cumplirá las normas de bioseguridad en los laboratorios analíticos y principios de ética y deontología.⁶

III. RESULTADOS

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico realizado al extracto etanólico de *Melissa officinalis L.* (toronjil) y *Piper aduncum* (matico)

Ensayo o Reactivo	Identificación	<i>Melissa officinalis L.</i> (toronjil)	<i>Piper aduncum</i> (matico)
Dragendorff	Alcaloides	++	+
Shinoda	Flavonoides	-	+
H ₂ SO ₄		+	+
FeCl ₃	Compuestos Fenólicos	+	++
Acetato de plomo	Taninos	-	-
Ninhidrina	Aminoácidos	-	-
Baljet	Glucósidos	+	+

La tabla 1 muestra el resultado obtenido del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etanólicos de *Melissa officinalis L.* (toronjil) y *Piper aduncum* (matico), donde se observa la presencia de Alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y glucósidos, no se observó presencia de taninos y aminoácidos.

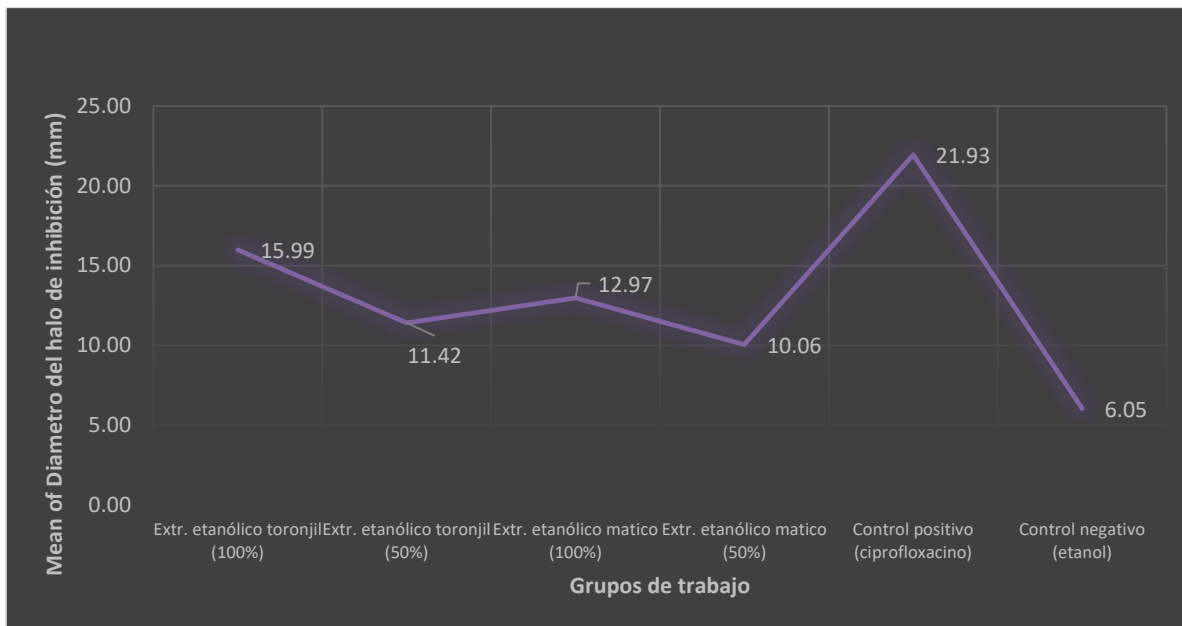
Tabla 2. Análisis de los diámetros de los halos de inhibición para los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Piper aduncum* (Matico) y grupos control sobre *Fusobacterium nucleatum* (anexo 6):

Grupos	N	Media	Desv. Estándar	Error Estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Extr. etanólico toronjil (100%)	15	15,99	0,32	0,08	15,81	16,17	15,50	16,60
Extr. etanólico toronjil (50%)	15	11,42	0,23	0,06	11,29	11,55	11,10	11,90
Extr. etanólico matico (100%)	15	12,97	0,30	0,08	12,81	13,14	12,50	13,70
Extr. etanólico matico (50%)	15	10,06	0,31	0,08	9,89	10,23	9,50	10,70
Control positivo (ciprofloxacino)	15	21,93	0,37	0,10	21,73	22,14	21,30	22,50
Control negativo (etanol)	15	6,05	0,28	0,07	5,89	6,20	5,60	6,60

Fuente: SPSS ver. 26

En la tabla 2 se puede apreciar el análisis realizado a los grupos de datos con respecto a sus parámetros de media, desviación estándar, intervalos de confianza y valores máximo y mínimo empleando el programa SPSS versión 26, se observa que el valor promedio de los halos de inhibición obtenidos para el extracto etanólico de toronjil al 100% fue de 15,99mm \pm 0,32 y de 11,42mm \pm 0,23 para el 50%, así mismo el extracto etanólico de matico obtuvo halos de inhibición promedio de 12,97mm \pm 0,30 y 10,06mm \pm 0,31 para la concentración al 100% y 50% respectivamente, con respecto al control negativo obtuvo un halo promedio de 6,05mm \pm 0,28 y el control positivo de 21,93mm \pm 0,37.

Figura 1. Gráfico de medias de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos por los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Piper aduncum* (Matico) y grupos control sobre *Fusobacterium nucleatum* sobre *Fusobacterium nucleatum*.



Fuente: SPSS ver. 26

En la figura 1, se observa los valores promedio de los halos de inhibición obtenidos por cada grupo de tratamiento; así mismo, se muestra de manera comparativa el comportamiento en relación al efecto antibacteriano, el ciprofloxacino muestra el mayor efecto antibacteriano (21,93mm), seguido por el extracto etanólico al 100% de toronjil (15,99mm), el control negativo muestra el menor halo de inhibición con promedio de 6,05mm, no se observan halos similares a este último.

Tabla 3. Análisis de la distribución normal de los halos de inhibición para los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Piper aduncum* (Matico) y grupos control sobre *Fusobacterium nucleatum*

Pruebas de normalidad							
	Grupos de trabajo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	df	Sig.	Estadístico	df	Sig.
Diámetro del halo de inhibición (mm)	Extr. etanólico toronjil (100%)	0,108	15	0,200*	0,965	15	0,779
	Extr. etanólico toronjil (50%)	0,165	15	0,200*	0,936	15	0,331
	Extr. etanólico matico (100%)	0,198	15	0,118	0,920	15	0,195
	Extr. etanólico matico (50%)	0,126	15	0,200*	0,982	15	0,980
	Control positivo (ciprofloxacino)	0,171	15	0,200*	0,946	15	0,459
	Control negativo (etanol)	0,176	15	0,200*	0,953	15	0,575
	*Este es un límite inferior del verdadero significado.						
a. Corrección de la significancia de Lilliefors							

Fuente: SPSS ver. 26

Se observa en la tabla 3, el análisis realizado para la determinación de la distribución normal de los datos mediante dos pruebas estadísticas Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, de los valores obtenidos con respecto al nivel de significancia y el valor de significancia alfa de 0.05, se puede concluir que todos los datos presentan distribución normal con respecto a la media.

Tabla 4. Análisis de la homogeneidad de varianzas para los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Piper aduncum* (Matico) y grupos control sobre *Fusobacterium nucleatum*

		Levene Statistic	df1	df2	p-valor
Diámetro del halo de inhibición	Basado en la media	0,605	5	84	0,696
	Basado en la mediana	0,456	5	84	0,808
	Basado en la media y ajustado con df	0,456	5	76,330	0,808
	Basado en la media recortada	0,613	5	84	0,690

Fuente: SPSS ver. 26

La tabla 4, se observa el análisis de la prueba de Levene o de homogeneidad de varianzas para los grupos de datos de los tratamientos experimental y control, se observa un p-valor superior al 0.05, por lo tanto, se confirma que existe distribución homogénea en todos los grupos tratados.

Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) para los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Piper aduncum* (Matico) y grupos control sobre *Fusobacterium nucleatum*

Diámetro del halo de inhibición					
	Suma de cuadrados	df	Media al cuadrado	F	p-valor.
Entre grupos	2223,356	5	444,671	4783,043	0,000
Dentro de los grupos	7,809	84	0,093		
Total	2231,165	89			

Fuente: SPSS ver. 26

La tabla 5 se muestra el análisis de la varianza o prueba de ANOVA realizada a cada tratamiento, por medio, este análisis permite determinar si existe diferencia significativa en las medias de los

grupos analizados. De los resultados de la tabla se observa que existe al menos un grupo que muestra diferencias significativas comparado con los demás.

Tabla 6. Análisis por subgrupos homogéneos de la prueba de TUKEY para los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Piper aduncum* (Matico) y grupos control sobre *Fusobacterium nucleatum*

Diámetro del halo de inhibición (mm)							
Tukey HSD ^a							
Grupos de trabajo	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Control negativo (etanol)	15	6,0467					
Extr. etanólico matico (50%)	15		10,0600				
Extr. etanólico toronjil (50%)	15			11,4200			
Extr. etanólico matico (100%)	15				12,9733		
Extr. etanólico toronjil (100%)	15					15,9933	
Control positivo (ciprofloxacino)	15						21,9333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Medias para muestras en subconjuntos homogéneos							
a. Uso del tamaño de la media armónica= 15,000.							

Fuente: SPSS ver. 26

La tabla 6 muestra el análisis realizado mediante la prueba de Tukey para sub grupos homogéneos, en la cual se puede observar que todos los grupos de tratamiento tanto experimental como control, presentan diferencias significativas en cuanto al tamaño del halo de inhibición, existiendo en todos actividad antibacteriana diferente, el control positivo de ciprofloxacino muestra el mayor efecto antibacteriano seguido por el extracto etanólico de toronjil, el efecto antibacteriano menor fue observado en el extracto etanólico de matico.

Tabla 7. Valoración de la actividad antibacteriana para los extractos etanólicos de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Piper aduncum* (Matico) y grupos control sobre *Fusobacterium nucleatum*

Tratamiento	Sensibilidad nula ≤ 8 mm	Sensible 9–14 mm	Muy sensible 15-19 mm	Sumamente sensible ≥ 20 mm
Extr. etanólico toronjil (100%)			15,99	
Extr. etanólico toronjil (50%)		11,42		
Extr. etanólico matico (100%)		12,97		
Extr. etanólico matico (50%)		10,06		
Control positivo (ciprofloxacino)				21,93
Control negativo (etanol)	6,05			

En la tabla 7, se muestra la escala valorativa de Duraffourd para la determinación de la sensibilidad del *Fusobacterium nucleatum* frente a los extractos etanólicos de toronjil y matico, nótese que esta bacteria es sumamente sensible al ciprofloxacino, muy sensible al extracto etanólico de toronjil al 100% y sensible para el resto de los extractos, no mostro sensibilidad al control negativo empleado.

III. DISCUSIÓN

Las plantas poseen muchos principios activos denominados metabolitos secundarios, estos les brindan distintas propiedades que han sido aplicadas en el campo de la salud, los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de toronjil y maticos han mostrado contener Alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y glucósidos.

El efecto antibacteriano de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) fue puesto a prueba mediante la elaboración de extractos etanólicos al 100% y 50% empleando como control positivo Ciprofloxacino y como control negativo etanol, los que fueron aplicados mediante la técnica de Kirby-Bauer frente a *Fusobacterium nucleatum*.

Los resultados de las pruebas fueron sometidos a análisis estadísticos mediante pruebas inferenciales de ANOVA y Tukey demostrando efectividad antibacteriana de ambas especies botánicas sobre *Fusobacterium nucleatum* en las concentraciones del 100% y 50%, el extracto etanólico de *Melissa officinalis* L. (toronjil) al 100% formó un halo de inhibición promedio de 15,99mm + 0,32 y al 50% de 11,42mm + 0,23 presentando mejor efecto antibacteriano que el extracto de *Piper aduncum* (matico) al 100% y 50% el cual formó halos de inhibición promedio de 12,97mm + 0,30 y 10,06mm + 0,31 respectivamente, pero no fue mejor que el control positivo (ciprofloxacino), debido a que este formó un halo de inhibición promedio de 21,93mm + 0,37. Es importante mencionar que el control negativo no presentó efecto antibacteriano ya que su halo corresponde a 6,05mm + 0,28 que es la medida del tamaño del disco, por lo que podemos asegurar que el efecto de los extractos les corresponde a ellos.

Derradji L., Saidi O. y Hadeff Y. (2020) evaluó la actividad antibacteriana de tres aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas como *S. officinalis* L., *Melissa officinalis* L. y *O. vulgare* L, el aceite esencial de *Melissa officinalis* L. preparados al 100% y 50% obtuvieron halos de inhibición al 100% de 27mm frente a *S. aureus* y de 21mm para *E. coli*, al 50% formó halos de 10.5mm y 8.5mm para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente, estos resultados difieren de nuestro estudio donde se encontró halos de inhibición de 15,99mm y 11,42mm para *Fusobacterium nucleatum*, esto demostraría que el aceite tienen mayor poder antibacteriano que el extracto o que *Fusobacterium nucleatum* no sea tan sensible a los extractos etanólicos.

Nuestros resultados comparados con Mendoza M., (2019), difieren con respecto al extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) debido a que estos obtuvieron halos inhibición para el 50%, 75% y 100% de 6,01mm, 13.70mm y 16.50mm respectivamente, comparados con los obtenidos en nuestro estudio de 12,97mm y 10,06mm para las concentraciones del 100% y 50% respectivamente, así mismo, debemos tomar en cuenta que se utilizó aceite esencial y no extracto etanólico.

El estudio de Guayas J. y Lazo P. (2020), marca una diferencia con nuestro estudio, quien obtuvo que el extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) no presenta efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*, a pesar de ser gran negativo como lo es *Fusobacterium nucleatum*, sin embargo, hay que tener en cuenta que este estudio lo realizó utilizando un macerado de 3 días, días y nuestro estudio utilizó un tiempo de maceración de 7 días dando como resultado por lo que se puede inferir que variables como el tiempo de maceración o tal vez el solvente utilizado influye directamente en la cantidad de metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana. Obteniendo que el extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) si presentó antibacteriano sobre *Fusobacterium nucleatum*.

Los estudios revisados demuestran el efecto antibacteriano de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) sobre diferentes microorganismos patógenos, aunque existen pocos estudios de la acción de estas plantas sobre *Fusobacterium nucleatum*; sin embargo, la actividad antibacteriana encontrada en estos estudios respalda nuestros resultados al mostrar el efecto antibacteriano de las especies *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Piper aduncum* (matico).

Estudios han identificado en las plantas principios activos como el dillapiol y alcanfor, taninos, saponinas y flavonoides para el caso del matico y citronelal, geraniol, nerol y linalol, taninos, flavonoides, entre otros, principios que les brindan muchas propiedades entre ellas antibacterianas.

IV. CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos de *Melissa officinalis L.* (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) presentaron actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum*, comparado con el control negativo.
2. El extracto etanólico de *Melissa officinalis L.* (toronjil) al 100% y 50% presentó actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum* con halos de inhibición promedio de $15,99\text{mm} \pm 0,32$ para el 100% y $11,42\text{mm} \pm 0,23$ para el 50%.
3. El extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) al 100% y 50% presentó actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum* con halos de inhibición promedio de $12,97\text{mm} \pm 0,30$ y $10,06\text{mm} \pm 0,31$ para el 100% y 50% respectivamente.
4. La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Melissa officinalis L.* (toronjil) y *Piper aduncum* (matico) frente a *Fusobacterium nucleatum* resultaron ser menor que el ciprofloxacino.

V. RECOMENDACIONES

1. Las plantas han demostrado contener principios activos con propiedades medicinales como el toronjil y matico, por tal razón, se recomienda seguir investigando las propiedades de las plantas y profundizar los estudios especialmente en estas dos especies vegetales.
2. Se recomienda a la población el uso de plantas medicinales en el tratamiento de infecciones leves, y evitar recurrir a la automedicación.
3. Las instituciones de salud deben implementar programas de medicina alternativa y promover la investigación de estas fuentes naturales de principios activos
4. Se recomienda, así mismo, evaluar los efectos antibacterianos de las plantas en formulaciones galénicas para determinar la aplicabilidad de estas y reducir costos de tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Jao V. y Avila M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum* en biopelículas subgingivales de pacientes brasileños con y sin enfermedad periodontal: comparación de dos métodos de detección. *Odontol Sanmarquina* [Internet]. 2018;21(4):268. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1010080/15554-texto-del-articulo-53367-3-10-20181210.pdf>
2. Ramos D, Maita L, Piscoche C. *Fusobacterium nucleatum* un comensal puente con otros microorganismos patógenos de la periodontitis. *KIRU* [Internet]. 2020;17(4):230-6. Disponible en: <https://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/Rev-Kiru0/article/view/2022/2188>
3. Derradji L, Saidi O, Hadeff Y. Evaluation of the antibacterial activity of three essential oils extracted from plants used in traditional medicine in Algeria (*Salvia officinalis* L, *Melissa officinalis* L and *Origanum vulgare* L). *GSC Biol Pharm Sci* [Internet]. 2020;12(1):181-8. Disponible en: <https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/sites/default/files/GSCBPS-2020-0183.pdf>
4. Benítez R., Sarria R., Gallo J., Pérez N. ÁJ y GC. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Rev Fac Ciencias Básicas* [Internet]. 2020;15(1):31-40. Disponible en: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/3597/3606>
5. Coyle M, Cavalieri SJ, Rankin ID, Harbeck RJ, Sautter RL. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana* [Internet]. 2016. 248 p. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
6. Alvarez P. *Ética e Investigación Ethics and Research Primer*. *Redipe* [Internet]. 2018;7(2):122-49. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6312423>

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

Autor (es): Bach. GUERRERO RUIDIAS, Sayra Esther / Bach. SANTAMARÍA INOÑAN, Milagros
Tema: “Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil y <i>Piper aduncum</i> (matico) frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ”

Problema general	Objetivo general	Hipótesis general	Variables y dimensiones	Metodología
¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil y <i>Piper aduncum</i> (matico) frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ?	Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil y <i>Piper aduncum</i> (matico) frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	El extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L.(toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (matico) presenta actividad antibacteriana frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Variables: X1: extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (matico)	Alcance de la investigación: Analítica Método de la investigación: transversal Diseño de la investigación: Experimental
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas		Población: <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) y <i>Piper aduncum</i> (matico)
¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) al 100% y 50% frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ?	Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) al 100% y 50% frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ,	El extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. (toronjil) al 100% y 50% presenta actividad antibacteriana frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ,	Dimensiones: Concentración 50% y 100%	Muestra: extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil y <i>Piper aduncum</i> (matico)
¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> (matico) al 100% y 50% frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ?	Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> (matico) al 100% y 50% frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	E extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> (matico) al 100% y 50% presentan actividad antibacteriana del frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Y1: frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Técnicas de recopilación de información: Extracción etanólico Difusión en agar
¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil y <i>Piper aduncum</i> (matico) frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> comparado con ciprofloxacino?	Comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil y <i>Piper aduncum</i> (matico) frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> con ciprofloxacino	El extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil y <i>Piper aduncum</i> (matico) presentan actividad antibacteriana mayor frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> que el ciprofloxacino.	y1: Halo de inhibición	Técnicas de procesamiento de información: ANOVA y Tukey

Anexo 2. Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Extracto etanólico de hojas <i>Melissa officinalis</i> L	Sustancias activas obtenidas por media de maceración con etanol	Controles	Positivo	milímetros
			Negativo	
Extracto etanólico de hojas de <i>Piper aduncum</i>	Sustancias activas obtenidas por media de maceración con etanol	Marcha fitoquímica	Alcaloides (Dragendorf)	Positivo: Naranja/rojo
			Compuestos Fenólicos (Tricloruro Férrico)	Positivo: Rojo vino
			Taninos (Acetato de plomo)	Positivo: Precipitado blanco
			Cumarinas (Baljet)	Positivo: Rojo
			Aminoácidos (Ninhidrina)	Positivo: Violeta
			Flavonoides (Shinoda)	Positivo: Rojo-anaranjado
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Efecto antibacteriano frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Inhibición en el crecimiento bacteriano de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Tamaño del halo de inhibición	$\leq 8\text{mm}$ 8mm a 14mm 15mm a 20mm > a 20mm	Nula Sensible Medio Muy sensible

Anexo 3. Identificación taxonómica de las especies vegetales

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


CERTIFICACION BOTÁNICA

El Biólogo colegiado, certifica que la planta conocida como "TORONJIL" proporcionado por los Bachilleres, GUERRERO RUIDIAS SAYRA ESTHER y SANTAMARÍA INOÑAN MILAGROS, Tesistas de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, ha sido estudiada científicamente y determinada como Melissa officinalis y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

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

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

Lima, 03 setiembre 2021


Blgo. Hamilton Beltrán
Hamilton W. Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico ·
C.R.P. 2719

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

CERTIFICACION BOTÁNICA

El Biólogo colegiado, certifica que la planta conocida como "MATICO" proporcionado por los Bachilleres, GUERRERO RUIDIAS SAYRA ESTHER y SANTAMARÍA INOÑAN MILAGROS, Tesistas de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Piper aduncum* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Magnoliidae
Orden: Piperales
Familia: Piperaceae
Género: *Piper*
Especie: *Piper aduncum* L.
= *Piper angustifolium* Ruiz & Pav.

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

Lima, 03 setiembre 2021


Blgo. Hamilton Beltrán

Hamilton Wiener Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico ·
C.B.P. 2719





Anexo 4: Marcha analítica del estudio fitoquímico

Ensayo o Reactivo	Metabolitos	Procedimiento	Coloración
Dragendorff	Alcaloides	II gts de (A+B/100 mL H ₂ O) A: 8 g Bi (NO ₃) ₃ .5H ₂ O/20 mL HNO ₃ B: 27,2 g KI/50 mL H ₂ O	Naranja a rojo o rosado
Shinoda	Flavonoides	Mg + II gts HCl	Rojo anaranjado a violeta
H ₂ SO ₄		II gts de H ₂ SO ₄	Anaranjado o guinda
FeCl ₃	Compuestos Fenólicos	II gts de FeCl ₃ 1%	Rojo-vino
Acetato de plomo	Taninos	1 ml de acetato de plomo al 10%	Precipitado blanco
Ninhidrina	Aminoácidos	2ml solución de ninhidrina al 2% (10' baño maría)	Violáceo o amarillo
Baljet	Glucósidos	1 mg del extracto + 2 gtrvo Baljet A y 2 gt B	Naranja - roja

Anexo 4. Certificado de análisis de la cepa



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum Catalog Number: 0328 Lot Number: 328-88** Reference Number: ATCC® 25586™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2022/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Jackie L Mackedanz Release Date: 2020/7/27
Performance	
Macroscopic Features: Small, white to gray, circular to slightly irregular, convex, granular to smooth Microscopic Features: Gram negative rod having tapered to pointed ends and often with central swelling	Medium: A/R SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results Esculin (Agar) Hydrolysis: negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vials: Although the Vial(s) panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="276 1186 470 1333">  ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 </div> <div data-bbox="511 1333 1331 1386"> (*) 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. </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="276 1354 422 1396">  </div> <div data-bbox="511 1417 836 1438"> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025. </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="276 1417 470 1564">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div> </div>	

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	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: 2020-07-22T16:03:34.634 JLM

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D6 (+++) (A)	328-86	Fusobacterium nucleatum	2.46

Comments:

Species naviforme / nucleatum of the genus Fusobacterium have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Anexo 5. Recolección de datos

Item	Extracto etanólico de hojas <i>Melissa officinalis</i> L		Extracto etanólico de hojas de <i>Piper aduncum</i>		Controles	
	100%	50%	100%	50%	Ciprofloxacino (Positivo)	Etanol (Negativo)
1	16,20	11,50	13,20	10,20	21,30	6,10
2	16,10	11,60	12,50	10,30	22,50	6,60
3	15,50	11,80	12,90	9,80	22,00	5,90
4	16,00	11,10	12,80	9,70	21,50	6,20
5	15,80	11,40	12,80	9,90	22,10	5,90
6	15,60	11,20	12,90	9,90	21,60	6,20
7	16,00	11,30	13,20	10,10	22,00	6,10
8	16,00	11,60	12,90	10,20	21,80	6,30
9	15,60	11,20	12,70	10,10	22,10	5,80
10	15,70	11,40	13,10	10,50	21,90	5,60
11	16,10	11,50	13,20	9,50	22,00	6,20
12	16,50	11,20	13,70	10,00	21,30	6,30
13	16,60	11,30	12,70	10,20	22,30	5,60
14	15,90	11,90	12,80	10,70	22,40	5,80
15	16,30	11,30	13,20	9,80	22,20	6,10

Anexo 6. Evidencias del trabajo de campo



Figura 3. Recolección de la muestra

Figura 2. Lavado, desinfección y secado de las muestras



Figura 4. Melissa officinalis L. (toronjil)



Figura 5. Piper aduncum (matico)



Figura 6. Secado y deshidratación de la muestra en estufa



Figura 7. Trituración, pulverizado, tamizado y maceración de las muestras



Figura 9. Filtración de los macerados de ambas muestras



Figura 8. Evaporación del solvente en estufa

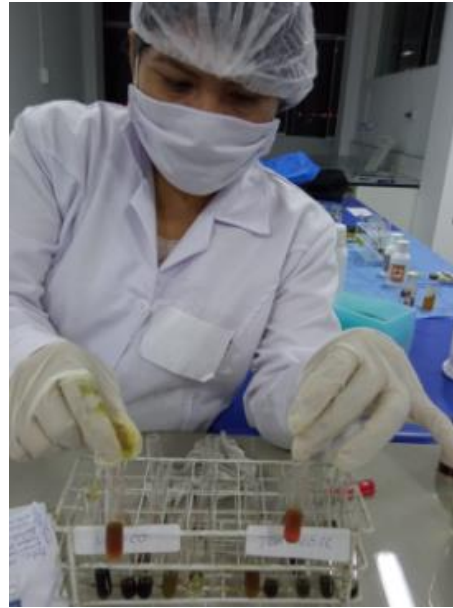
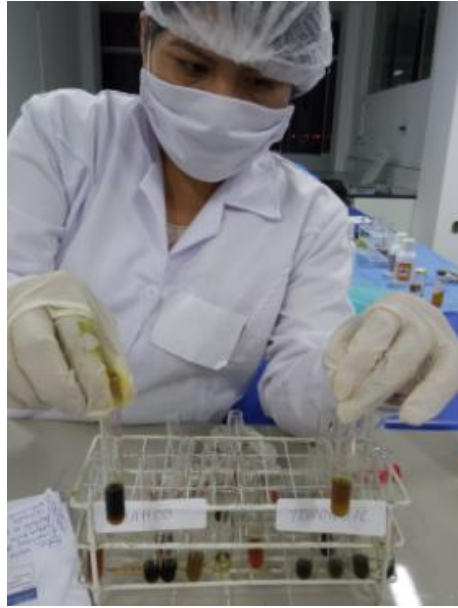


Figura 10. Reacción positiva para $FeCl_3$ y Dragendorff

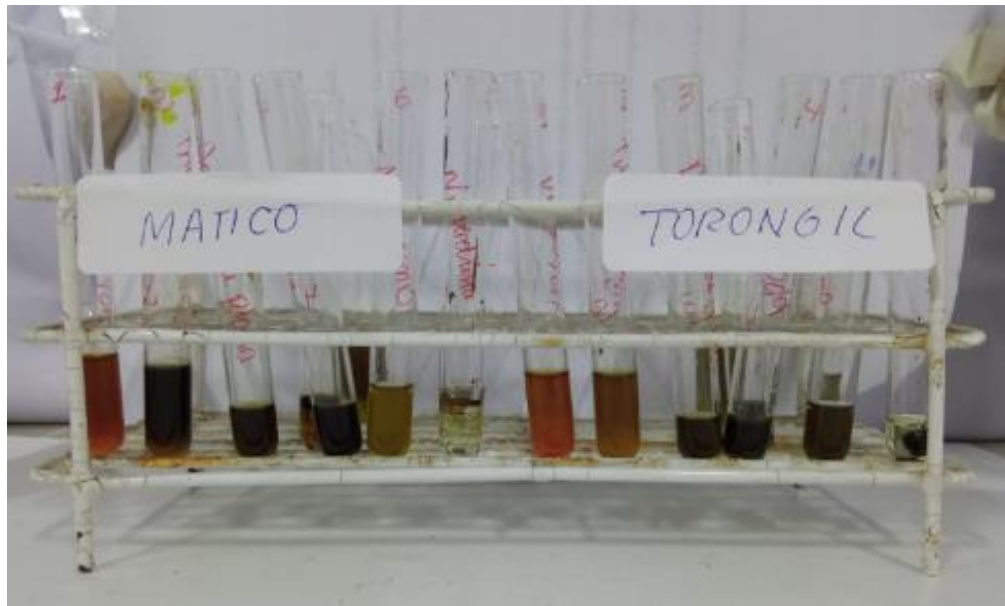


Figura 11. Reacciones de coloración del estudio fitoquímico



Figura 12. Activación de la cepa, preparación del inóculo y sembrado en placa



Figura 13. Preparación de los discos e incubación