



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

TESIS

**Efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis*
(toronjil) frente a *Candida albicans* en la ciudad de Chiclayo 2021.**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES:

Bach. Rosa Elva Chapañan Acosta

Bach. Carmen Alena Chávez Saavedra

ASESOR:

Mg. López Calderón, Rocío Jerónima

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Recursos Naturales

Huancayo – Perú

2021

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada a DIOS que es el principal eje de nuestros sueños y triunfos, a mi padre que con su humildad y trabajo me enseñó que en la vida todo esfuerzo tiene su recompensa y a mi madre que desde el cielo me guía día a día fue mi principal eje e inspiración en todos mis proyectos.

Rosa Elva Chapoñan Acosta

A Dios que es la principal inspiración para de nuestros triunfos, quien con su infinita bondad y amor que nos bendice y guía por el mejor camino. Con todo mi amor y cariño a mis padres que desde que estuvieron a mi lado me enseñaron a luchar por mis sueños

Carmen Alena Chavez Saavedra

Agradecimiento

A DIOS por darnos salud y guiarnos cada día en esta nueva etapa de nuestras vidas para seguir adquiriendo nuevos conocimientos.

A mis padres, hermanas(os), familiares por creer en nosotras y por el apoyo incondicional y de sus consejos cada día.

Agradecer a la universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt por abrirnos sus puertas de poder culminar nuestros sueños y logros.

Agradecer a la Mg. López Calderón, Rocío Jerónima por su apoyo para culminar exitosamente nuestra tesis.

Página del jurado

PRESIDENTE:

Dra. ANDAMAYO FLORES, DIANA ESMERALDA

MIEMBRO SECRETARIO:

Mg. VALDERRAMA SUELDO, MARTHA RAQUEL

MIEMBRO VOCAL:

Mg. LÓPEZ CALDERÓN, ROCÍO JERÓNIMA

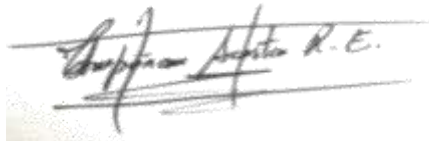
MIEMBRO SUPLENTE:

Dra. POMA VIVAS, MÓNICA EVENCIA

Declaratoria de autenticidad

DECLARACIÓN JURADA SIMPLE

Yo, **Rosa Elva Chapoñan Acosta** de nacionalidad peruana, identificada con DNI N° **42430154**. Tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, domiciliado en calle el Progreso Nro. 900 Íllimo - Chiclayo. DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACION PRESENTADA ES AUTENTICA 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 noviembre del 2021.



.....



Rosa Elva Chapoñan Acosta

DECLARACIÓN JURADA SIMPLE

Yo, **Carmen Alena Chávez Saavedra** de nacionalidad peruana, identificada con DNI N° **75068488**. Tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, domiciliado en Imperio y Raimondi 1501, Chiclayo. DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACIÓN PRESENTADA ES AUTENTICA 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 noviembre del 2021.



.....

Carmen Alena Chávez Saavedra

ÍNDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimiento.....	iii
Página del jurado.....	iv
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. MÉTODO	19
2.1. Tipo y diseño de investigación	19
2.3. Población, muestra y muestreo	20
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	21
2.5. Procedimiento	22
2.6. Método de Análisis de datos.....	23
2.7. Aspectos éticos.....	24
III. RESULTADOS.....	25
IV. DISCUSIÓN.....	31
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXO	39

RESUMEN

Las plantas siempre han proporcionado las herramientas necesarias para combatir las enfermedades; en ese sentido, la búsqueda de las propiedades que poseen beneficia directamente a la salud de las personas, por tal motivo, el presente proyecto estudia a *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans* para determinar su poder antimicótico.

Objetivo: Se demostró el efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans*

Método: El tipo de investigación del estudio fue cuantitativa, aplicada, prospectiva y de diseño experimental, la muestra de estudio fue *Melissa officinalis* de la cual se empleó 4,5 de hojas para la obtención del extracto etanólico por maceración, el aceite fue obtenido mediante arrastre con vapor, el método de difusión en pozo se empleó para determinar el efecto antimicótico de la planta.

Resultados: El extracto etanólico de toronjil frente a *Candida albicans* al 50% obtuvo un valor promedio del halo de inhibición fue de $11,87 \pm 0,31$ mm y al 100% fue de $14,73 \pm 0,41$ mm, por otro lado, el aceite de toronjil al 50% tuvo halos de inhibición promedio de $47,59 \pm 0,32$ mm y al 100% fue de $52,42 \pm 0,26$ mm, así mismo, el control negativo empleado (etanol) obtuvo halo de inhibición de $5,91 \pm 0,26$ mm y el control positivo obtuvo halo $32,11 \pm 0,34$ mm. Es análisis de los datos mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de datos.

Conclusiones: Se demostró que el aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) presenta efecto antibacteriano frente *Candida albicans*.

Palabras claves: *Melissa officinalis*, *Candida albicans*, extracto etanólico, antimicótico.

ABSTRACT

Plants have always provided the necessary tools to fight diseases; in this sense, the search for the properties they possess directly benefits people's health. For this reason, the present project studies *Melissa officinalis* (lemon balm) against *Candida albicans* to determine its antifungal power.

Objective: The antifungal oil effect and ethanolic extract of *Melissa officinalis* (lemon balm) against *Candida albicans* was demonstrated.

Method: The type of study research was quantitative, applied, prospective and experimental design, the study sample was *Melissa officinalis* of which 4,5 leaves were used to obtain the ethanolic extract by maceration, the oil was obtained by steam stripping, the well diffusion method was used to determine the antifungal effect of the plant.

Results: The 50% ethanolic extract of lemon balm against *Candida albicans* obtained an average inhibition halo value of $11,87 \pm 0,31$ mm and at 100% it was $14,73 \pm 0,41$ mm; on the other hand, the 50% lemon balm oil had an average inhibition halo of $47,59 \pm 0,32$ mm and at 100% it was $52,42 \pm 0,26$ mm, Likewise, the negative control used (ethanol) obtained an inhibition halo of $5,91 \pm 0,26$ mm and the positive control obtained a halo of $32,11 \pm 0,34$ mm. The data analysis showed statistically significant differences between the data groups.

Conclusions: It was shown that the oil and ethanolic extract of *Melissa officinalis* (lemon balm) has an antibacterial effect against *Candida albicans*.

Keywords: *Melissa officinalis*, Melissa, *Candida albicans*, ethanolic extract, antifungal.



TDM Roberto S. Lopez Muchi
ACADEMIC COORDINATOR
U.P.H. FRANKLIN ROOSEVELT

I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una infección por hongos que afecta casi en un 90% a mujeres y hombres, es ocasionada por un hongo levaduriforme conocido como *Candida albicans*, en la mujer esta contaminación se produce generalmente en la vagina donde logra incubar produciendo fluidos vaginales y enrojecimiento.¹ La candidiasis es una enfermedad que la padecen muchas personas, especialmente las mujeres, este tipo de hongo puede ser encontrado en cualquier parte del mundo y se dice que más del 70% de los casos reportados de infección por hongos tienen como agente causante a *C. albicans* serotipo B, a esto se incrementa la resistencia que estos microorganismos están logrando.² La resistencia de estos microorganismos a medicamentos antifúngicos ha aumentado en estas últimas décadas, según Zurita E., esta resistencia ha aumentado la tasa de mortalidad lo que se relaciona con infecciones sistémicas generalmente por hongos de género *Candida* entre 20 – 50%, por hongos del género *Aspergillus* entre 40 - 80%, siendo la tasa de mortalidad de este tipo de infecciones aproximadamente el 90%.³ A nivel mundial la candidiasis se ha visto incrementada y debido a la resistencia que se ha producido en las últimas décadas ha logrado elevar las cifras de mortalidad y elevar los costos de tratamiento a nivel nosocomial.⁴ Según cifras publicadas en un revista europea se dice que 3 de cada 4 mujeres sufren de infecciones vaginales por lo menos 1 vez en el transcurso de su vida y que la incidencia de padecerla al año entre 2 y 4 veces le corresponde a la mitad de estas.⁵ Según datos de *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, las infecciones causadas por hongos se ha estimado en 832 millones de afectados correspondientes a estadísticas de catorce países de África del Norte, Asia, Europa y América de estos se estima que en cada país entre el 1.8% al 3% son infectados por hongos resistentes que causan alguna enfermedad crónica y puede llevarlos a la muerte.⁶ Por otro lado, en América Latina los episodios de candidemia en menores de 18 años internados en hospitales, indicaron que el 29% se produce en neonatos y que la principal especie encontrada fue *Candida albicans*, también revelaron que la tasa de mortalidad fue de 31% para los niños y 35% para pacientes de 13 a 18 años. En Colombia se reportó que la candidemia presenta la tasa más alta de incidencia de 1,98 casos. Asimismo, indico que la candidiasis invasiva representa el 88% de infecciones fúngicas en pacientes hospitalizados con una mortalidad que varía entre el 36 y 40%.^{7,8} En el Perú se observó que de

las infecciones por hongos las candidiasis y aspergilosis son las más comunes y difíciles de tratar, se estima que existen 581,174 casos al año.⁶ Un estudio retrospectivo de enfermedades fúngicas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en el periodo 2012 a 2016. Se halló que las infecciones sistémicas causadas por *Candida albicans* eran más habituales (54,0%) en pacientes con tumor, además *C. albicans* aumento su frecuencia de 14,7% a 31,0% durante el tiempo de estudio.⁸ Las infecciones por hongos especialmente las producidas por *C. albicans* representan un grupo importante de microorganismos que están presentando resistencia, esta generalmente se presenta por la exposición a antifúngicos, por lo tanto, se observó una enorme necesidad de encontrar alternativas o soluciones que ayuden a disminuir los índices de mortalidad e incidencia en complicaciones por causa de resistencia a este tipo de hongos como es la *Candida albicans*, En ese sentido el presente proyecto de investigación busca ser una alternativa práctica y eficaz al tratamiento de las micosis por *Candida albicans* a nivel de la piel, convirtiéndose los resultados de su ejecución en un conocimiento que ayude a cambiar la realidad problemática que existe con respecto a este tipo de infecciones. **Los antecedentes nacionales que se relacionaron con nuestro estudio se citan a continuación; Cuero M. y Gonzales M. (2021)**, en su estudio titulado “Compararon de la actividad anti *Escherichia coli* ATCC 25922 de los aceites esenciales de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Syzygium aromaticum* L. (clavo de olor) para el desarrollo de una formulación de emulsión bebible”, realizado en la ciudad de Lima – Perú. Su objetivo fue demostrar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. y *Syzygium aromaticum* L., ambos aceites se obtuvieron por hidrodestilación y se prepararon concentraciones de 50, 75 y 100%, la actividad anti *E. coli* se determinó por el método de Kirby-Bauer; el control positivo fue ciprofloxacino. Los resultados indicaron mayores halos de inhibición en los aceites al 100%. Concluyeron que ambos aceites de las especies mencionadas presentan actividad anti *E. coli.*, sin embargo, el que destacó más por su efecto fue *S. aromaticum.*⁹ **Lema A. (2018)**, en su tesis “Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* (Toronjil) en *Proteus spp.*”, realizado en la ciudad de Lima – Perú. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana “in vitro” del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Mellisa officinalis* (toronjil) en *Proteus spp*, Para la caracterización fitoquímica del extracto del vegetal seleccionado se recolecto, identifico, se extrajo con etanol al 96%, concentro y se llevó a cabo la identificación de sus metabolitos secundarios. La evaluación de la actividad

antimicrobiana se realizó con el extracto hidroalcohólico de las hojas usando el método de difusión en discos (Kirby-Bauer) frente a *Proteus spp.* Como resultado el tamizaje fitoquímico dio positivo para: saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, chalconas, auronas, alcaloides, y quinonas que son metabolitos con actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones, siendo estas 25% (13mm), 50%(15mm), 75%(18mm) y 100%(20mm). El extracto presentó actividad antimicrobiana frente a *Proteus spp.* Se concluyó que es una planta que presenta actividad antimicrobiana “in vitro” frente a *Proteus spp.*¹⁰ **Navarro Y. y Salazar B. (2017)**, con su investigación de nombre “Extracción y fraccionamiento del aceite esencial de toronjil (*Melissa officinalis*) para la obtención de los destilados de composición diferenciada”, realizado en la ciudad del Callao – Perú. El objetivo de la presente investigación fue la obtención del aceite esencial de toronjil mediante extracción por arrastre de vapor acoplado con una columna de rectificación para obtener destilados de composición diferenciada, tomando como material de extracción hojas de toronjil (*Melissa Officinalis*) previamente acondicionada para esta operación y considerando como parámetros de extracción la humedad de la muestra, tiempo de extracción y altura de la columna de relleno. Posteriormente se realizaron los análisis fisicoquímicos a los destilados obtenidos, para identificar a que parámetros de operación de obtiene mayor cantidad de aceite con el componente activo. Los resultados obtenidos en los experimentos, son tratados estadísticamente, y mediante una gráfica de superficie de respuesta se concluyó que, con la muestra fresca, con una altura relleno de 100 mm y un tiempo de extracción de 3 horas, se obtuvo mayor cantidad de aceite esencial enriquecido en su componente activo es decir el eugenol y el cariofileno.¹¹ **A nivel internacional se citó a los autores Behbahani B. y Shahidi F. (2019)**, en su estudio “Aceite esencial de *Melissa officinalis*: composiciones químicas, potencial antioxidante, contenido fenólico total y actividad antimicrobiana”, realizado en la ciudad de Mashhad – Iran. Evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite *M. officinalis* sobre el crecimiento de cepas clínicas y ATCC. En su metodología la composición química se analizó por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS); el poder antioxidante a través del método DPPH; el contenido de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antimicrobiana por el método de difusión. Los resultados indicaron la presencia de geranilo, citral, Z-citral, citronelal y citronelol; el contenido fenólico total y el potencial antioxidante fueron $51 \pm 0,50$ mg GAE / y $98 \pm 0,45$ μ g / ml, respectivamente, los halos de inhibición promedio fueron de 7,2mm; 9,0mm; 10,6mm; 12,4mm

y 13,5mm para las concentraciones de 0,5mg/ml; 1mg/ml; 2mg/ml; 4mg/ml; y 8mg/ml; frente a *E. Coli*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*. Se concluyó que el aceite de *M. officinalis* presento mayor efecto inhibitorio sobre cepas bacterianas ATCC, además, tiene mayor efecto sobre bacterias grampositivas.¹² **También, Abdel W., Fahim J., Fouad M. y Kamel M. (2019)**, en su estudio “Estudios antibacterianos, antifúngicos y análisis en el GC-MS de *Melissa officinalis*”, realizado en la ciudad de Minia – Egypto. 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 MIC que oscilan entre 1,65 y 191,40 µg / ml; el extracto mostró actividad contra *C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata*. Se observaron que las propiedades inhibitorias contra *Candida albicans* fueron contra *C. albicans* fueron para la fracción al 100% MeOH, éter y fracciones de EtOAc (MIC = 2.83, 3.24, y 12.50 µg/mL, respectivamente), mientras que tanto el extracto total para la fracción EtOAc–MeOH (1:1) mostraron actividades moderadas contra *C. albicans* con valores de MIC de 25.60 y 53.40 µg/mL. 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*, presentaron actividad antibacteriana y antifúngica.¹³ **Ehsani A., Alizadeh O., Hashemi M., Afshari A. y Aminzare M. (2017)**, en su artículo titulado “Propiedades fitoquímicas, antioxidantes y antibacterianas de los aceites esenciales *Melissa officinalis* y *Dracocephalum moldavica*”, realizado en la ciudad de Zanzan – Irán. Plantearon como objetivo investigar la composición química, actividad antimicrobiana (*S. typhimorium*, *E. coli* y *S. aureus*) y las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales mencionados. Los métodos aplicados fueron cromatografía de gases, ensayo de difusión en disco, concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración bactericida mínima, el ensayo de DPPH. Los resultados indicaron la presencia de geranial, neral, geraniol, geranilo, citral, timol, citronelal; *Staphylococcus aureus* fue la bacteria más sensible y el efecto del toronjil fue mayor, ambos aceites presentaron actividad antioxidante. En conclusión, el aceite de toronjil presento mayor efecto sobre *Staphylococcus aureus*.¹⁴ **Manssouri M, et. al (2016)** en su investigación “Composición de aceite esencial y actividad antifúngica de *Melissa officinalis* procedente del norte-este de Marruecos, contra hongos fitopatógenos poscosecha en manzanas” cuyo objetivo

fue investigar métodos de control biológico contra hongos fito patógenos. En la metodología empleada se obtuvo el aceite de *Melissa officinalis*, mediante la técnica de hidrodestilación y se analizó los principios activos mediante GC-MS. En los resultados se observó actividad antifúngica del aceite de *Melissa officinalis* mediante la prueba in vitro de alimentos venenosos (PF) y actividad volátil (VA), los componentes encontrados fueron P-mentha- 1,2,3-triol (13,1%), P-menth-3-en-8-ol (8,8%), pulegona (8,8%), óxido de piperitona (8,4%) y 2 -óxido de piperitona (7,3%). El estudio concluyó que el aceite de *Melissa officinalis* tuvo potencial como conservante bio-antifúngico.¹³ **Pinheiro C, et. al. (2015)** en su estudio “Investigación del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. para la actividad antifúngica contra *Cladosporium carrionii*”, con el objetivo de identificar componentes del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. con actividad antifúngica in vitro contra cepas de *C. carrionii*. En la metodología empleada se determinó los componentes del aceite esencial mediante CG-MS, la actividad antifúngica del aceite se investigó empleando la técnica de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima fungicida (MFC). Los resultados mostraron 4 componentes geranial (52%), citral (38,90%), trans- β -cariofileno (1,22%) y germacreno D (0,84%). El aceite esencial de *M. officinalis* L. inhibió el crecimiento de todas (100%) las cepas de *C. carrionii* probado. La MIC y la MFC se establecieron en 256 μg / ml. El estudio concluyó que el aceite esencial de *M. officinalis* L. como un agente antifúngico potencial contra *C. carrionii*.¹⁴ **El marco teórico que respalda la investigación fue de la siguiente manera;** con respecto a la especie botánica a trabajar *Melissa officinalis* conocida comúnmente como toronjil. se encuentra dentro de la familia *Lamiaceae*, es originaria del sur de Europa, la región mediterránea, el oeste de Asia y el norte de África; actualmente se ha propagado a nivel global. Se caracteriza por ser una planta medicinal.¹⁵ Botánicamente es un subarbusto frondoso, sus tallos son rectos y contiene las hojas de consistencia rugosa y al ser frotadas emanan su aroma a limón, sus flores son blanquecinas o rosadas agrupadas de forma irregular, el limbo de sus hojas es muy vistoso por su nervatura. Presenta aceite esencial (0.5mL/kg) aunque en bajas cantidades, pero es el componente de mayor interés por la industria farmacéutica.¹⁶ El género *Melissa. spp* es muy utilizado en un sin número de preparaciones aromáticas gracias a sus efectos carminativos, calmantes, sedante, estimulante del tracto gastrointestinal, antiespasmódico. Sus hojas presentaron actividad antibacteriana y antiviral.¹⁶ La caracterización química del aceite esencial de *Melissa officinalis* revela que contiene compuestos monoterpenos (β -mirceno, β -pineno, citronelal, citronelol, neral

o citral B, trans-geraniol, geraniol o citral A, acetato de geraniol), sesquiterpenos (β -cariofileno) y otros compuestos como 3-undecino. Los compuestos predominantes fueron citronelal, isogeraniol, acetato de geraniol, acetato de nerol, cariofileno y óxido de cariofileno.^{17,18} Las hojas de *Melissa officinalis* contienen flavonoides (quercitina, ramnocitina, luteolina), compuestos polifenólicos (ácido rosmarínico, ácido cafeico y ácido protocatecuico), aldehído monoterpenoide, glucósidos monoterpénicos, triterpenos (ácidos ursólico y oleanólico), sesquiterpenos y taninos esenciales.¹⁹ La taxonomía de la planta es reino: Plantae; división: Magnoliophyta; clase: Magnoliopsia; sub clase: Asteridae; orden: Lamiales; Familia: Lamiaceae; género: Melissa, especie: *Melissa officinalis* L.¹⁵ Estudios identificaron en la fracción etérea del extracto crudo de Melisa officinalis mediante GC-MS, ácidos grasos y distintos terpenoides como metil commate A, ácido palmítico, y fitol como principales componentes identificados los cuales presentaron gran actividad antibacteriana contra Gram positiva y levaduras de la familia Candida.⁹ El fitol es un tipo de alcohol diterpénico acíclico que sirve como precursor de la vitamina E y K1, forma parte de la clorofila del cual, algunos estudios refieren, interviene en la apoptosis de la pared celular de los microorganismos y es un potencial componente antifúngico.¹⁰ Los efectos antimicrobianos del citral han sido documentados, mostrando un fuerte efecto fungistático y fungicida, así mismo, sus isómeros: geranial y neral. En general, la acción inhibidora de citral y compuestos relacionados tales como citronelal y α -pineno sobre células de moho implica granulación del citoplasma, ruptura de la membrana citoplasmática e inhibición de la inactivación y / o síntesis de enzimas intracelulares y extracelulares. Estas acciones pueden ocurrir de forma aislada o concomitante y culminar con la inhibición de la germinación del micelio.^{11,12} **Con respecto al efecto antifúngico** está definido como aquella sustancia capaz de inhibir el crecimiento de un determinado hongo (levadura o hifa). Dentro de estas sustancias podemos mencionar a las plantas medicinales por las propiedades de sus metabolitos secundarios, para poder aprovechar los efectos de estas plantas se recurre a la extracción de sus componentes por diversos métodos como: extracción por maceración, extracción por arrastre de vapor, por hidrodestilación, por presión, entre otros.²⁰ **La Nistatina** es un agente polienico tópico sintético que inhibe la concentración de ergosterol en la membrana de los hongos. Es uno de los medicamentos más eficaces en el tratamiento tópico de los hongos.^{30,31} **Una extracción por maceración** nos da un extracto que puede ser de consistencia líquida, semisólida o sólida, este se obtuvo de las diferentes partes de una planta.

La extracción puede realizarse a partir de plantas frescas, secas, semi-secas o fermentadas. Consiste en separar las sustancias y se obtuvo dos componentes: el extracto en sí y el residuo. Uno de los métodos usados es la expresión, por el que se introduce la planta en una prensa hidráulica y se exprime. También existe la extracción por incisiones, que se utilizó para lograr gomas, resinas y mieles. Con la destilación, en cambio, se obtuvo aceites esenciales, productos grasos con una composición muy compleja. Sin embargo, la forma más habitual de obtener los extractos es a través de solventes, que pueden ser agua, mezclas hidroalcohólicas, glicoles o disolventes orgánicos. En este caso, uno de los procesos que existe es **la maceración**, que consiste en dejar la planta molida en contacto con el solvente a temperatura ambiente entre tres y 10 días.²¹ Así mismo con respecto a *Candida albicans*, es un hongo que se presentó en dos formas morfológicas o dos tipos distintos, esta depende de la temperatura del medio, presentándose en la forma de levadura cuando se encuentra a una temperatura de 37°C en el huésped y cuando se encuentra a 25°C aproximadamente el aspecto que presento es el filamentoso, por lo general en el medio ambiente. Pertenece al filo Ascomycota, reproduciéndose por gemación de forma asexual.²² Aunque, *Candida albicans* es un componente normal de la flora comensal humana, es también la especie fúngica más común causante de enfermedad en humanos. *C. albicans* causa varios tipos de infecciones, que pueden ser divididas en dos grupos: mucosas y sistémicas. Las infecciones mucosas se presento comúnmente en mujeres en forma de candidiasis vulvovaginal. Se estima que hasta un 75% de mujeres adultas experimentará una vez en su vida esta infección. *C. albicans* también puede colonizar la cavidad oral (candidiasis oral) y puede ser un problema en los recién nacidos y en la vejez. La infección sistémica, o candidiasis diseminada, es una enfermedad mucho más seria. Ocurre cuando un paciente está inmunocomprometido y *C. albicans*, que normalmente es mantenida bajo control por el sistema inmunitario, invade tejidos y entra en el torrente sanguíneo.^{23,24} La identificación taxonómica de la especie microbiológica es orden: Saccharomycetales; Familia: Saccharomycetaceae; género: Candida, especie: **C. albicans**.¹⁶ Otro punto importante son las pruebas de rutina para la identificación microbiológica para *Candida albicans* que son realizadas mediante el antibiograma o prueba de sensibilidad, en la cual se observó el crecimiento y se utilizó medios de cultivo como el agar Sabouraud u otros. Las especies de *Candida* crecen dentro de 48 a 72 horas y se observó colonias cremosas, brillantes de color blanco o crema.^{25,26} **El antibiograma** es uno de los métodos in vitro más

importantes en microbiología, para la identificación de sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos. La sensibilidad se puede medir por diferentes técnicas, siendo la Técnica de Difusión o llamada también Kirby-Bauer uno de los métodos recomendados por el comité nacional de estándares de laboratorio clínico (NCCLS).²⁷ El método Kirby-Bauer modificado en pozo se utilizó para evaluar la sensibilidad de un microorganismo in vitro frente a una concentración determinada de una sustancia antimicrobiana que será inoculada en el agar mediante la formación de un pozo de aproximadamente 6mm de diámetro y de acuerdo al tamaño del halo de inhibición que se forme alrededor del pozo se interpretará según la escala de Duraffort, si el microorganismo frente a un antibiótico es: - Sensible (S): indicando que la dosis del antimicrobiano puede frenar la infección producida por la cepa en estudio. Intermedio (I): se refiere a que las cepas presento inhibición elevando las concentraciones del antibiótico. Resistente (R): las cepas no pueden ser inhibidas por el antimicrobiano.²⁸ - Es de suma importancia que los que se emplean para el crecimiento de microorganismos, deben provenir de laboratorios certificados y especializados.²⁹ **Se formuló el siguiente problema** ¿Presentará efecto antimicótico el aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans*? del mismo modo, **los problemas específicos se formularon** ¿ Presentará efecto antimicótico el aceite de *Melissa officinalis* (toronjil) al 100% y 50% frente *Candida albicans*?; ¿ Presentará efecto antimicótico el extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) al 100% y 50% frente *Candida albicans*? y ¿Cuál será el efecto antimicótico el aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans* comparado con Nistatina?. El presente estudio se justificó en el sentido de la búsqueda de una solución a una problemática de salud, mediante el uso de una especie vegetal con efecto demostrado in vitro mediante diseño experimental, beneficiando a la comunidad científica la que se valdrá de los resultados para seguir realizando investigaciones de mayor realce, profundizo el conocimiento sobre las plantas y sus beneficios en el campo de la salud, propicio el uso de plantas medicinales en el tratamiento antimicótico, reduciendo costos de tratamiento, así mismo, reducirá los costos de estos lo que ayudará a la población sobre todo a los de menos recursos y difícil acceso a los medicamentos esenciales. **El objetivo general** fue demostrar el efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans*, y **los objetivos específicos** fueron; determinar el efecto antimicótico del aceite de *Melissa officinalis* (toronjil) al 100% y 50% frente *Candida albicans*, Determinar el efecto antimicótico del extracto etanólico de

Melissa officinalis (toronjil) al 100% y 50% frente *Candida albicans* y Determinar el efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans* comparado con Nistatina. Así mismo, nos formulamos la siguiente **hipótesis** del estudio El aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) presento efecto antimicótico frente *Candida albicans*

II. MÉTODO

2.1. Tipo y diseño de investigación

2.1.1 Tipo de investigación^{17,18}

Es la clasificación que persigue el método científico según el nivel de profundización y permite agrupar las variables según su aspecto. La presente investigación corresponde al tipo cuantitativa, debido a que las variables fueron cuantificadas y analizadas como datos numéricos; es aplicada, por el fin que persigue, en apoyo y mejora de la salud de la sociedad y es prospectivo, debido a que el análisis de las variables se realizó en un posterior al planteamiento del estudio.

2.1.2. Diseño de investigación¹⁹

Es el plan o estrategia concebido para obtener la información que se desea con el fin de responder al planteamiento del problema. El diseño de la investigación es de tipo experimental, debido a que existe modificación y alteración de las variables en estudio, el estudio se representa mediante el siguiente esquema:

G1	X1	O1
G1	X2	O2
G1	(-)	O3
G1	(+)	O4

G1: Grupos de cepas

X1, X2: Tratamientos

O1, O2, O3: Efecto observado.

(-) Control negativo. (etanol)

(+) Control positivo. (nistatina)

2.2. Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Planta de toronjil <i>Melissa officinalis</i>	Producto obtenido mediante un proceso físico que contiene principios activos solubles	Aceite de <i>Melissa officinalis</i>	Concentración 100%	Porcentaje
			Concentración 50%	
		Extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i>	Concentración 100%	Porcentaje
			Concentración 50%	
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
<i>Cepa de Candida albicans</i>	Inhibición en el crecimiento de los microorganismos	Efecto antimicótico frente a <i>Candida albicans</i>	Halo de inhibición ≤ 8mm 8mm a 14mm 15mm a 20mm > a 20mm	Nula Sensible Medio Muy sensible

2.3. Población, muestra y muestreo

2.2.1. Población²⁰

La población es la selección o conjuntos de individuos u objetivos que tienen características similares las cuales son objeto de estudio. La población en estudio de la presente investigación es *Melissa officinalis* fue en el distrito de chota, provincia chota, departamento Cajamarca.

2.2.2. Muestra²¹

Se entiende por muestra a la fracción o parte de la población, la cual posee las mismas características y está representada por el extracto etanólico de *Melissa officinalis* y Aceite de *Melissa officinalis*

Criterios de inclusión

- Especie vegetal con identificación taxonómica
- Especie en buen estado

Criterios de exclusión

- Especie no contaminada
- Especie diferente

2.2.3. Muestreo²²

Es la técnica empleada para seleccionar la muestra ideal que representa la población. El tipo de muestreo aplicado es no probabilístico por conveniencia debido a que todo los individuos que conforman la población no tienen la misma posibilidad de ser seleccionados por haber sido escogida por facilidad de acceso del investigados a un solo lugar.

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

2.3.1. Técnicas: La técnica de investigación científica es un procedimiento típico, validado por la práctica, orientado generalmente aunque no exclusivamente a obtener y transformar información útil para la solución de problemas de conocimiento en las disciplinas científicas.

Extracción etanólica: Técnica empleada para la obtención de principios activos de la muestra vegetal, mediante la maceración con etanol de 96°.

Difusión en pozo (Kirby Bauer): Técnica que permite determinar la actividad antibacteriana, es una técnica estandarizada, la cual se aplica la muestra en unos pocitos de diámetro uniforme.

2.3.2. Instrumentos de recolección de datos

Ficha de registro de datos: Ficha en la cual se registraron los datos obtenidos en cada experiencia de manera sistemática, organizada y validada mediante juicio de expertos.

Vernier digital: Instrumento electrónico que permite medir magnitudes de menor tamaño de manera precisa.

2.5. Procedimiento

2.5.1. Recolección de la muestra

Se recolectó 4.5 Kg de hojas de la especie vegetal en estudio directamente de la zona agrícola de cultivo, las cuales fueron seleccionadas tomando en consideración los criterios de inclusión y exclusión, así mismo, se seleccionó 3 especies vegetales completas para la identificación botánica por el especialista botánico.

2.5.2. Preparación de la muestra

Las muestras recolectadas fueron trasladadas al laboratorio donde fueron lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio, luego fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra por 2 días, luego de este tiempo se separaron las hojas y llevaron a la estufa a 55°C hasta su deshidratación completa. A la muestra se le retiró las secciones de la planta que no correspondían a las hojas, luego se pulverizaron y fueron puestas en un frasco de vidrio ámbar hasta su análisis.

2.5.3. Obtención del extracto alcohólico

A las hojas pulverizadas se le agregó por cada 400gr, 700 ml de etanol de 96°, luego se dejó en maceración por 8 días, pasado este periodo de tiempo se filtró y luego se llevó a baño maría hasta evaporación completa.

2.5.4. Reactivación de la cepa de *Candida albicans*

La reactivación de la cepa de *Candida albicans*, se realizó según la información técnica del catálogo de la empresa comercializadora de la cepa, la cual estuvo a cargo del laboratorio de microbiología Microclin SA, de la ciudad de Trujillo.

2.5.5. Sembrado en placa de las cepas:

De las cepas activadas se preparó el inóculo de trabajo tomando dos asadas de las cepas activadas y re-suspendiendo las bacterias en 10ml de solución salina fisiológica (SSF), luego se hicieron diluciones seriadas tomando 1ml de la solución anterior y colocando en 9ml de SSF hasta alcanzar el 0.5 en la escala de McFarland. Luego se procedió a realizar un sembrado con hisopos estériles en todas las placas bajo condiciones de aerobiosis y esterilidad en una cabina de flujo laminar en agar TSA, y dejará secas por 10 minutos antes de iniciar el siguiente procedimiento.

2.5.6. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite y extracto etanólico de *Melisa officinalis*

En las placas sembradas se realizaron pocitos de 6 mm de diámetro con un sacabocado 4 por placa, donde se colocaron las distintas concentraciones de los extractos y los controles positivos y negativo, esta operación se realizó en 15 placas para cada bacteria. Se llevó a incubación por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ para posteriormente revisar el efecto producido sobre los microorganismos mediante el halo de inhibición. Se realizó las mediciones de los diámetros mediante un vernier digital y los datos obtenidos fueron registrados en la ficha de recolección de datos.

2.6. Método de Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó mediante el empleo del software Microsoft Excel 2016 y el programa estadístico SPSS v.26, donde se presentaron los datos en tablas de frecuencia y porcentajes, además de pruebas inferenciales de normalidad y ANOVA y Tukey, con un nivel de significancia alfa del 0.05.

2.7. Aspectos éticos

El presente trabajo de investigación se desarrolló sobre la línea de investigación in vitro, en ese sentido, se mantuvo en todo momento los principios éticos en investigación establecidos en el Código de ética de la Universidad Privada Roosevelt de Huancayo, además del principio de no maleficencia; así mismo se cumplieron de manera estricta los protocolos de bioseguridad en el laboratorio y manejo de residuos sólidos y muestras biocontaminadas.^{23,24}

III. RESULTADOS

Tabla 1. Estadística descriptiva obtenida de los halos de inhibición por grupo de análisis

Descriptives

Diámetro del halo de inhibición (mm)

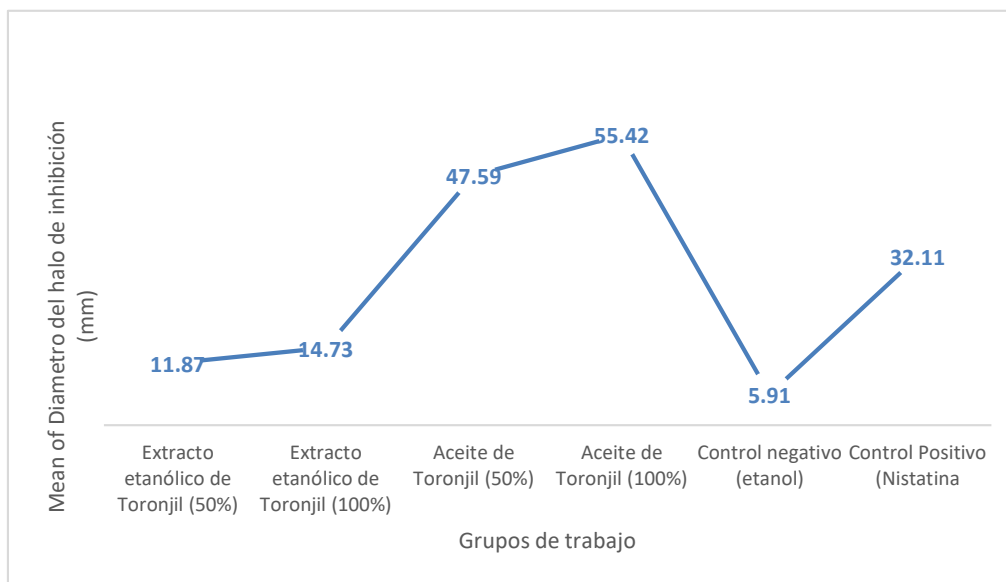
	N	Media	Desv. Estándar	Error Estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Extracto etanólico de Toronjil (50%)	15	11,87	0,31	0,08	11,70	12,05	11,40	12,40
Extracto etanólico de Toronjil (100%)	15	14,73	0,41	0,11	14,51	14,96	14,10	15,60
Aceite de Toronjil (50%)	15	47,59	0,32	0,08	47,42	47,77	47,10	48,30
Aceite de Toronjil (100%)	15	55,42	0,26	0,07	55,28	55,56	55,10	55,90
Control negativo (etanol)	15	5,91	0,26	0,07	5,76	6,05	5,50	6,40
Control Positivo (Nistatina)	15	32,11	0,34	0,09	31,93	32,30	31,50	32,70

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

Se puede apreciar el análisis realizado a los datos del tamaño del halo de inhibición de cada grupo de análisis mediante el programa SPSS versión 26 para obtener los datos estadísticos como media, desviación estándar, los límites de confianza y valores máximo y mínimo encontrados de los valores promedio de los halos de inhibición con respecto al obtenido por el extracto etanólico de toronjil frente a *Candida albicans* al 50% el valor promedio del halo de inhibición fue de $11,87 \pm 0,31$ mm y al 100% fue de $14,73 \pm 0,41$ mm, por otro lado, el aceite de toronjil al 50% tuvo halos de inhibición promedio de $47,59 \pm 0,32$ mm y al 100% fue de $52,42 \pm 0,26$ mm, por otro lado, el control negativo empleado (etanol) obtuvo halo de inhibición de $5,91 \pm 0,26$ mm y el control positivo obtuvo halo $32,11 \pm 0,34$ mm.

Figura 1. Diámetro promedio de los halos de inhibición por grupo de trabajo



Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

Se observa de manera gráfica los promedios de los halos de inhibición con su respectivo rango de variación con respecto a la media, del mismo modo, se observa el comportamiento comparado del extracto etanólico y del aceite de toronjil, observándose un efecto inhibitorio superior contra *Candida albicans* por parte del aceite de toronjil con respecto a los extractos y control positivo inclusive, así mismo, se observan diferencias significativas entre los halos de inhibición de los grupos control con respecto a los grupos experimentales del extracto y aceite de toronjil.

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

Grupos de trabajo	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Extracto etanólico de Toronjil (50%)	0,191	15	0,148	0,945	15	0,442
Extracto etanólico de Toronjil (100%)	0,142	15	0,200*	0,969	15	0,843
Aceite de Toronjil (50%)	0,158	15	0,200*	0,956	15	0,628
Aceite de Toronjil (100%)	0,204	15	0,093	0,914	15	0,157
Control negativo (etanol)	0,175	15	0,200*	0,939	15	0,372
Control Positivo (Nistatina)	0,151	15	0,200*	0,976	15	0,935

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

Se muestra el análisis realizado las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para confirmar la distribución normal de los datos analizados, con un nivel de confianza del 95,00%, se observa que el nivel de significancia calculado en tabla supera el nivel de significancia de 0,05 establecido por el estudio, por lo tanto, se confirma que todos los grupos analizados presentan distribución normal.

Tabla 3. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)

		Levene	df1	df2	p-valor
		Statistic			
Diámetro del halo de inhibición	Based on Mean	0,687	5	84	0,635
	Based on Median	0,585	5	84	0,712
	Based on Median and with adjusted df	0,585	5	76,953	0,712
	Based on trimmed mean	0,671	5	84	0,647

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

Se muestra la prueba de Levene o de homogeneidad de varianzas aplicada donde luego del análisis se observa que un p-valor es superior al nivel alfa de significancia de 0,05; por lo tanto, se deduce que existe varianzas homogéneas en todos los grupos analizados con un nivel de confianza del 95,00%.

Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA)

Diámetro del halo de inhibición					
	Suma de cuadrados	df	Media al cuadrado	F	p-valor.
Entre grupos	31152,633	5	6230,527	60979,211	0,000
Dentro de los grupos	8,583	84	0,102		
Total	31161,216	89			

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

Se observa la prueba de ANOVA o análisis de la varianza aplicada a los grupos de los datos mediante el programa SPSS versión 26, luego del análisis se observa un p-valor obtenido menor al nivel de significancia del estudio; por lo tanto, la prueba nos confirma que existe diferencia estadísticamente significativa en al menos uno de los grupos de datos analizados.

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

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	5,90					
Extracto etanólico de Toronjil (50%)	15		11,87				
Extracto etanólico de Toronjil (100%)	15			14,73			
Control Positivo (Nistatina)	15				32,11		
Aceite de Toronjil (50%)	15					47,59	
Aceite de Toronjil (100%)	15						55,42
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

Se muestra un análisis complementario a la prueba de ANOVA el cual se realizó mediante la prueba de Tukey por sub grupos homogéneos, este análisis determinó diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de los datos mostrando en la tabla según niveles el grado superior de estas según tamaño de halo de inhibición. Se observa que el aceite de toronjil al 100% obtuvo mayor efecto inhibitorio frente a *Candida albicans*, seguido por la concentración del aceite de toronjil al 50% y por el control positivo Nistatina, de igual manera para las concentraciones de los extractos etanólicos de toronjil al 100% y 50%, para concluir el control negativo se ubica en el nivel inferior sin efecto antimicótico frente a *Candida albicans*.

Tabla 6. Comparación de la sensibilidad antibacteriana según la escala de Duraffourd

Tratamiento	Sensibilidad nula ≤ 8 mm	Sensible 8–14 mm	Muy sensible 15-20 mm	Sumamente sensible > 20 mm
Control negativo (etanol)	5,90			
Extracto etanólico de Toronjil (50%)		11,87		
Extracto etanólico de Toronjil (100%)		14,73		
Control Positivo (Nistatina)				32,11
Aceite de Toronjil (50%)				47,59
Aceite de Toronjil (100%)				55,42

Interpretación:

Se muestra la escala de Duraffourd donde se relaciona la sensibilidad de *Candida albicans* al aceite esencial y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil), en tal sentido, se observa que *Candida albicans* es sumamente sensible al aceite de *Melissa officinalis* (toronjil) al 100% y 50%, de igual manera para Nistatina, asimismo, *Candida albicans* es sensible a los extractos etanólicos de toronjil al 100% y 50%; el control negativo no evidenció efecto frente a *Candida albicans*.

IV. DISCUSIÓN

La micosis son una de las enfermedades más comunes que afecta a las personas, principalmente producidas por *Candida albicans*, microorganismo que llega a producir un alto porcentaje de morbilidad y resistencia, por tal motivo, es necesario encontrar alternativas que ayuden a combatir este tipo de infecciones, en ese sentido se escogió a la especie vegetal *Melissa officinalis* (toronjil) para demostrar su actividad antimicótica frente a este hongo, dichos resultados son analizados a continuación según los objetivos planteados:

Con respecto al primer objetivo se determinó el efecto antimicótico del aceite de *Melissa officinalis* (toronjil) al 100% y 50% frente *Candida albicans* mediante la formación de halos de inhibición promedio de $47,59 \pm 0,32\text{mm}$ y $52,42 \pm 0,26\text{mm}$ respectivamente; el estudio realizado por Curo M. y Gonzales M. (2021), el cual tuvo como objetivo demostrar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Melissa officinalis* L. y *Syzygium aromaticum* L frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, obtuvo resultados con respecto al tamaño del halo de inhibición del aceite de *Melissa officinalis* L. a las concentraciones del 50, 75 y 100% obteniendo halos de inhibición de 25mm, 29mm y 35mm sobre la bacteria en estudio, esto datos se **corroboran** con los tamaños de los halos de inhibición obtenidos ya que de manera similar se corresponden considerando el hecho de haber sido aplicados a diferentes especies microbiológicas.

Por otra parte, Behbahani B. y Shahidi F. (2019), evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite *M. officinalis* sobre el crecimiento de cepas clínicas y ATCC, obtuvieron presencia de geranilo, citral, Z-citral, citronelal y citronelollos; halos de inhibición promedio fueron de 7,2mm; 9,0mm; 10,6mm; 12,4mm y 13,5mm para las concentraciones de 0,5mg/ml; 1mg/ml; 2mg/ml; 4mg/ml; y 8mg/ml; frente a *E. Coli*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*; considerando las diferentes concentraciones y microorganismos los resultados se **contraponen** debido a ser inferiores a los obtenidos en el estudio.

Con respecto al segundo objetivo, se determinó el efecto antimicótico del extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) al 50% y 100% frente *Candida albicans* mediante la formación de halos de inhibición de $11,87 \pm 0,31\text{mm}$ y $14,73 \pm 0,41\text{mm}$ respectivamente; el estudio realizado por Lema A. (2018), con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana “in vitro” del extracto

hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* (toronjil) en *Proteus spp*, obtuvo que a las concentraciones de 25% (13mm), 50%(15mm), 75%(18mm) y 100%(20mm) se observa actividad antimicrobiana del extracto de toronjil contra *Proteus spp*; así mismo, determino la presencia de saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, chalconas, auronas, alcaloides, y quinonas como metabolitos responsables de esta actividad lo que se **corroboran** con los datos obtenidos en el estudio con respecto a la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de toronjil, las diferencias existentes comprenden la variación debida a la aplicación en diferente microorganismo.

A diferencia de los estudios anteriores la investigación realizada por Abdel W., Fahim J., Fouad M. y Kamel M. (2019), confirma el poder antifúngico de la planta sobre *Candida albicans*; el objetivo del estudio fue evaluar el potencial antimicrobiano del extracto etanólico de *M. officinalis* sobre microorganismos patógenos humanos; en ese sentido; se determinó potencial efecto contra *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa* con MIC que oscilan entre 1,65 y 191,40 y actividad contra *C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata*, encontrándose mayor actividad en la fracción eter y acetónica del extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) con una CMI: 12.50 µg/mL, resultados que **corroboran** nuestro estudio contra este microorganismo del mismo modo.

Con respecto al tercer objetivo, en la determinación del efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans* comparado con Nistatina, se determinó que el aceite de *Melissa oficcinalis* (toronjil) presenta mayor efecto que el extracto etanólico y la nistatina; sin embargo, el extracto etanólico presentó menor efecto antimicótico que la nistatina. Esto se determinó mediante el análisis estadístico que sirvió para establecer la seguridad del análisis de los resultados con una confianza del 95% empleando como pruebas inferenciales ANOVA y Tukey, las que demostraron diferencias estadísticamente significativas en la **comparación** de los resultados, tal como se observa en la tabla 5.

De los resultados mostrados en el análisis de la escala de Durafford **comparados** con los tamaños de los halos de inhibición se obtuvo que *Candida albicans* presenta sensibilidad nula para el control negativo (etanol); es sensible al extracto etanólico de Toronjil al 50% y 100% y

es sumamente sensible al aceite de toronjil a las concentraciones de 50% y 100%, así como para el control positivo (nistatina).

V. CONCLUSIONES.

1. Se determinó el efecto antimicótico del aceite de *Melissa officinalis* (toronjil) al 100% mediante la formación de un halo de inhibición de $52,42 \pm 0,26\text{mm}$ y al 50% con halo de inhibición de $47,59 \pm 0,32\text{mm}$ frente *Candida albicans*.
2. Se determinó el efecto antimicótico del extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) al 100% mediante la formación de un halo de inhibición de $14,73 \pm 0,41\text{mm}$ y 50% con un halo de inhibición de $11,87 \pm 0,31\text{mm}$ frente *Candida albicans*.
3. Se determinó el efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de *Melissa officinalis* (toronjil) frente *Candida albicans* comparado con Nistatina.

VI. RECOMENDACIONES

1. Que a partir de los resultados obtenidos se pueda proseguir con otras investigaciones para ampliar los conocimientos sobre el efecto terapéutico de éstas plantas.
2. Las instituciones educativas de nivel superior deben promover investigaciones de este tipo o complementar los estudios realizados con la finalidad de lograr conclusiones que sirvan en beneficio de la población.
3. Para prevenir, aliviar o curar alguna enfermedad se debe articular la medicina sintética con la tradicional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García M. La candidiasis como problema. Síntomas, diagnóstico, tratamiento y prevención. Cuida de tu salud [Internet]. 2017 [citado 4 de julio de 2021]. Disponible en la URL: <https://mifarmaciaespana.com/la-candidiasis-como-problema-sintomas-diagnostico-tratamiento-y-prevencion-cuida-de-tu-salud/>
2. Pineda J. et al. Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev Médica Risaralda [Internet]. 2017 [citado 11 de julio de 2021] Disponible en la URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v23n1/v23n1a09.pdf>
3. Zurita S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género candida en Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2018.
4. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horiz Médico [Internet]. 2018. Disponible en la URL: <http://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/710>
5. Rivera M. El 75 % de las mujeres ha sufrido al menos una vez en la vida alguna infección vaginal [Internet]. XIV Encuentro Nacional de Salud y Medicina de la Mujer. 2016. Disponible en la URL: <https://www.20minutos.es/noticia/2063900/0/75-por-ciento-mujeres/infeccion-vaginal/hongo-candida/>
6. Bustamante B, Denning D, Campos P. Infecciones fúngicas graves en Perú. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2017 [citado 11 de julio de 2021] Disponible en la URL: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-017-2924-9>
7. Santolaya M, Alvarado T, Quiroz F, Colombo A, Zurita J, Tiraboschi I, et al. Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia. Rev Iberoam Micol. 2016.
8. Villanueva F, Veliz J, Canasa K. Características de las fungemias en un centro de referencia del Perú: Análisis retrospectivo de cinco años. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2020.
9. Abdel W, Fahim J, Fouad M, Kamel M. Estudios antibacterianos, antifúngicos y GC-MS de *Melissa officinalis*. South African J Bot [Internet]. 2019 [citado 8 de octubre de 2021]. Disponible en la URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629919303096>
10. Quezada R, Fernández E, García A, Garza E, Alvarez L, Camacho M, et al. Composición de aceites esenciales y actividad antifúngica de *Melissa officinalis* originaria del norte de Marruecos, contra hongos fitopatógenos poscosecha en manzanas. 2016.
11. Pérez A, Chamorro L, Vitola D. Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial foliar de *Lippia alba* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Rev Peru Biol [Internet]. 2017. Disponible en la URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v24n2/a13v24n2.pdf>
12. Garcia R, Alves E, Santos M, Viégas G, Fernandes A, Dos Santos R, et al. Actividad antimicrobiana y uso potencial de monoterpenos como conservantes de frutas

- tropicales. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2008. Disponible en la URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v24n2/a13v24n2.pdf>
13. Ouadi Y, Manssouri M, Bouyanzar A, Majidi L, Bendaif H, Elmsellem H, et al. Composición de aceites esenciales y actividad antifúngica de *Melissa officinalis* originaria del norte de Marruecos, contra hongos fitopatógenos poscosecha en manzanas. *ScienceDirect* [Internet]. 2017. Disponible en la URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401017302759?via%3Dihub>
 14. Pinheiro C, Queiroga F, Sousa L, Nogueira V, Oliveira F, Gomes V. Investigación de *Melissa officinalis* L. Aceite esencial para la actividad antifúngica contra *Cladosporium carrionii*. *J Bank* [Internet]. 2016. Disponible en la URL: <https://journalbank.org/index.php/IJTDH/article/view/2158>
 15. Sorensen J. *Melissa officinalis*. *Int J Aromather*. 2016.
 16. Vircell Microbiologists. *Candida albicans* - Vircell [Internet]. Vircell Microbiologists. 2017 [citado 15 de agosto de 2020]. Disponible en la URL: <https://www.vircell.com/enfermedad/27-candida-albicans/>
 17. Hernández. *Metodología de la Investigación: Las rutas de la investigación cuantitativa, cualitativa y mixta*. 1era ed. Mc Graw Hill. Mexico; 2018.
 18. Guevara G, Verdesoto A, Castro N. Metodologías de investigación educativa (descriptivas, experimentales, participativas, y de investigación-acción). *Rev Cient Mundo la Investig y el Conoc* [Internet]. 2020. Disponible en la URL: <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/860/1363>
 19. Hernández R, Fernández C, Baptista P. *Metodología de la Investigación* [Internet]. 6ta ed. México, D.F.: Mc Graw Hill; 2014. Disponible en la URL: https://periodicooficial.jalisco.gob.mx/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia_de_la_investigacion_-_roberto_hernandez_sampieri.pdf
 20. Díaz V. *Metodología de la investigación científica y bioestadística*. 2da ed. RIL®, editor. Chile: Universidad Finis Terrae; 2010.
 21. Hernández R. *Metodología de la Investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*. [Internet]. 1era edici. McGRAW-HILL INTERAMERICANA. 2018. Disponible en la URL: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/65000949/METODOLOGIA_DE_LA_INVESTIGACION_LAS_RUTA.pdf?1606024201=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DMETODOLOGIA_DE_LA_INVESTIGACION_LAS_RUTA.pdf&Expires=1627241110&Signature=cZf8Cub7MselHT2gfuMMLqXSShr
 22. Prats J. *Técnicas y recursos para la elaboración de tesis doctorales: Bibliografía y orientaciones metodológicas*. Univ Barcelona. 2014.

23. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Raton [Internet]. Instituto nacional de salud. 2008. Disponible en la URL: www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf
24. Jayo M, Cisneros F. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio Contenido. Inst Lab Anim Resour [Internet]. 1999; Disponible en la URL: <http://www.uss.cl/wp-content/uploads/2014/12/Guía-para-el-Cuidado-y-Uso-de-los-Animales-de-Laboratorio.pdf>

ANEXO

Anexo 1. Matriz de consistencia

Autor (es): Rosa Elva Chapoñan Acosta / Carmen Alena Chávez Saavedra
Tema: Efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) frente a <i>Candida albicans</i> en la ciudad de Chiclayo 2021.

Problema general	Objetivo general	Hipótesis General	Variables y dimensiones	Metodología
¿Presentará efecto antimicótico el aceite y extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) frente a <i>Candida albicans</i> ?	Demostrar el efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) frente <i>Candida albicans</i>	El aceite y extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) presenta efecto antimicótico frente <i>Candida albicans</i>	Variable Independiente (x) X1: Planta de toronjil <i>Melissa officinalis</i> Dimensiones: Aceite de <i>Melissa officinalis</i>	Alcance de la investigación: Cuantitativo Método de la investigación: Transversal y prospectivo Diseño de la investigación: Experimental
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas		
¿Presentará efecto antimicótico el aceite de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) al 100% y 50% frente <i>Candida albicans</i> ?	Determinar el efecto antimicótico del aceite de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) al 100% y 50% frente <i>Candida albicans</i> .	El extracto de <i>Melissa officinalis</i> al 100% y 50% presenta efecto antimicótico entre <i>Candida albicans</i> .	Extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> Variable Dependiente (y) Cepas <i>Candida albicans</i>	Población: <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) Muestra: Aceite y extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil)
¿Presentará efecto antimicótico el extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) al 100% y 50% frente <i>Candida albicans</i> ?	Determinar el efecto antimicótico del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) al 100% y 50% frente <i>Candida albicans</i> .	El extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> al 100% y 50% frente a <i>Candida albicans</i>	Dimensión: Efecto antimicótico frente a <i>Candida albicans</i>	Técnicas de recopilación de información: – Destilación por arrastre de vapor – Extracción etanólica – Difusión en pozo
¿Cuál será el efecto antimicótico el aceite y extracto etanólico de				

<p><i>Melissa officinalis</i> (toronjil) frente <i>Candida albicans</i> comparado con Nistatina?</p>	<p>Determinar el efecto antimicótico del aceite y extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> (toronjil) frente <i>Candida albicans</i> comparado con Nistatina</p>	<p>El aceite y extracto de <i>Melissa Officinalis</i> presenta mayor efecto antimicótico frente a <i>Candidas albicans</i> que es la Nistatina.</p>		<p>Técnicas de procesamiento de información: Estadística descriptiva y ANOVA y Tukey mediante SPSS 26</p>
--	--	---	--	---

Anexo 2. Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Planta de toronjil <i>Melissa officinalis</i>	Producto obtenido mediante un proceso físico que contiene principios activos solubles	Aceite de <i>Melissa officinalis</i>	Concentración 100%	Porcentaje
			Concentración 50%	
		Extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i>	Concentración 100%	Porcentaje
			Concentración 50%	
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
<i>Cepa de Candida albicans</i>	Inhibición en el crecimiento de los microorganismos	Efecto antimicótico frente a <i>Candida albicans</i>	Halo de inhibición ≤ 8mm 8mm a 14mm 15mm a 20mm > a 20mm	Nula Sensible Medio Muy sensible

Anexo 3. Instrumento de recolección de datos

Placa	Control positivo (mm)	Control negativo etanol (mm)	Aceite de <i>Melissa officinalis</i>		Extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i>	
			50% (mm)	100% (mm)	50% (mm)	100% (mm)
1	32,7	6,4	47,1	55,9	11,7	14,9
2	32,1	6,2	47,8	55,6	12,0	15,2
3	32,6	5,5	47,4	55,5	12,4	15,3
4	32,2	5,6	48,0	55,1	11,6	14,5
5	32,1	6,1	47,6	55,7	12,0	14,1
6	31,9	5,6	48,3	55,2	11,5	14,8
7	31,5	6,1	47,6	55,1	11,8	14,6
8	32,3	6,0	47,3	55,5	12,2	14,7
9	32,4	6,0	47,3	55,5	11,6	14,2
10	31,6	5,7	47,8	55,8	12,3	14,8
11	32,2	6,0	47,5	55,2	11,4	14,4
12	32,3	5,6	47,3	55,2	11,5	14,4
13	31,9	6,0	47,6	55,5	12,0	15,6
14	32,1	5,9	47,4	55,2	12,0	14,6
15	31,8	5,5	47,9	55,3	12,1	14,9

Anexo 4. Validación del instrumento: Juicio de expertos

PROMEDIO DE VALORACIÓN

95

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

a) Deficiente b) Baja c) Regular d) Buena e) Muy buena

•
Nombres y Apellidos : DIANA ESMERALDA ANDAMAYO FLORES
DNI N° : 20078664 Teléfono/Celular : 964884831
Dirección domiciliaria : LORETO 569
Título Profesional : QUÍMICO FARMACÉUTICO
Grado Académico : DOCTORA
Mención : FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Firma

Lugar y fecha:

PROMEDIO DE VALORACIÓN

95

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

a) Deficiente b) Baja c) Regular d) Buena e) ~~Muy buena~~

Nombres y Apellidos : IVAR JINES LAVADO MORALES

DNI N° : 20655225 Teléfono/Celular : 990018724

Dirección domiciliaria : JR. MIGUEL GRAU N° 921 CHUPACA

Título Profesional : QUIMICO FARMACEUTICO

Grado Académico : MAESTRIA

Mención : SALUD PUBLICA.




Firma

Lugar y fecha: Huancayo, 16 de octubre del 2021

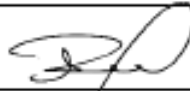
PROMEDIO DE VALORACIÓN

95

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

a) Deficiente b) Baja c) Regular d) Buena e)  Muy buena

Nombres y : Rocío Jerónima López Calderón
Apellidos :
DNI N° : ...20075533..... Teléfono :954931834.....
/Celular
Dirección :Jr. Rosemberg N° 327 El Tambo – Huancayo.....
domiciliaria
Título :Químico Farmacéutico.....
Profesional
Grado :Magister.....
Académico
Mención :Problemas de Aprendizaje.....



Firma

Lugar y fecha:17 de octubre 2021.....

Anexo 5. Carta de aceptación del laboratorio Microclin SRL



CARTA DE ACEPTACIÓN

EL QUE SUSCRIBE

Hace constar

Que Rosa Elva Chapoñan Acosta y Carmen Alena Chávez Saavedra, bachilleres en Farmacia y Bioquímica han sido aceptados por este laboratorio para realizar la ejecución de su trabajo de investigación titulado "EFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE Y EXTRACTO ETANÓLICO DE *Melissa officinalis* (TORONJIL) FRENTE A *Candida albicans* EN LA CIUDAD DE CHICLAYO 2021" en nuestras instalaciones

Trujillo, 17 de octubre de 2021




Dgo. Liana E. Nilo Barburén
C.B.P. 1807

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

EL LABORATORIO DE LA REGION

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

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com

Anexo 6. Identificación taxonómica de la planta:

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

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

El Biólogo colegiado, certifica que la planta conocida como “TORONJIL” proporcionada por los Bachilleres, ROSA ELVA CHAPOÑAN ACOSTA y CARMEN ALENA CHÁVEZ SAAVEDRA, 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
Especie: Melissa
Especie: Melissa officinalis L.

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

Lima, 29 octubre 2021


Bigo. Hamilton Beltrán
Calle Natalio Sánchez 251 - Jesús María
Físico - Botánico
C.P. 3718

Anexo 7. Certificado de análisis de la cepa microbiológica:



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Candida albicans Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-1006** Reference Number: ATCC® 10231™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/12/28 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Stensvad Release Date: 2019/11/18
Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1)	Other Features/ Challenges: Results
See attached ID System results document.	(1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydospore production: positive  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 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.</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-around;"> <div data-bbox="300 1239 503 1375">  ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 </div> <div data-bbox="300 1396 1396 1438"> (*) 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-around; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="300 1470 503 1606">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div> <div data-bbox="544 1596 917 1617"> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005. </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 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: Candida albicans
 Sample Description: 0443
 Sample ID: 443-1006
 Sample Creation Date/Time: 2018-03-08T14:55:08.305 ADS
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

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

Comments:

n/a

Anexo 8.

Recolección de la planta en el terreno de cultivo



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Anexo 9.

Selección, lavado y secado de la muestra



Fuente: Elaboración propia

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Anexo 10.

Preparación del extracto etanólico



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Anexo 11.

Preparación del aceite esencial



Fuente: Elaboración propia

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia