

**UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL FABIOLA  
SALAZAR LEGUÍA DE BAGUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y APLICADAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**INFORME DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO  
PROFESIONAL DE BIOTECNÓLOGO**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO  
DE HOJAS DE “TORONJIL” (*Melissa officinalis*) FRENTE A  
*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae***

**Autora:**

**Maryori Sarain Castañeda Terrones**

**Asesora:**

**Dra. Lizbeth Maribel Córdova Rojas**

**Registro: 002-2025-FCNA**

**BAGUA – PERÚ**

**2025**

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DEL INFORME DE TESIS

En el aula destinada para la sustentación de tesis, campus universitario de la Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía ubicada en la provincia de Bagua, departamento de Amazonas, a las 13:09 horas del día 08 de Setiembre, se reunió el Jurado de Tesis presidido por el Dr. JORGE HILARIO GUZMÁN BAUTISTA, e integrado por el M.Sc ROMEL IVÁN GUEVARA GUERRERO y la Dra. MARÍA MARGARITA MORA COSTILLA, en calidad de miembros, con la exclusiva finalidad de evaluar la sustentación de la tesis titulada: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE HOJAS DE “TORONJIL” (*Melissa officinalis*) FRENTE A *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, cuya responsabilidad corresponde a la Bachiller en BIOTECNOLOGÍA MARYORI SARAIN CASTAÑEDA TERRONES, a fin de optar el Título Profesional de BIOTECNÓLOGO.

Terminada la sustentación la autora de la tesis respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado, cuya evaluación se consolida según tabla y parámetros cuantitativos que siguen:

<b>Presidente</b>	Dr. JORGE HILARIO GUZMÁN BAUTISTA	29
<b>Miembro</b>	M.Sc ROMEL IVÁN GUEVARA GUERRERO	27
<b>Miembro</b>	Dra. MARÍA MARGARITA MORA COSTILLA	29
<b>PROMEDIO</b>		28.33

El Jurado después de deliberar y calibrar los aportes de la tesis y la fundamentación del sustentante, compatibilizó el resultado cuantitativo con la tabla cualitativa equivalente sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes declara la sustentación como EXCELENTE asignándole un calificativo de 28.33 puntos, según el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua.

Siendo las 13.15 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.

Nombre: Dr. JORGE HILARIO GUZMÁN BAUTISTA  <b>Presidente</b>	Nombre: M.Sc ROMEL IVÁN GUEVARA GUERRERO  <b>Miembro</b>
Nombre: Dra. MARÍA MARGARITA MORA COSTILLA  <b>Miembro</b>	

Nombre Asesor: Dra. LIZBETH MARIBEL CÓRDOVA ROJAS

Distribución: Integrantes del Jurado de Tesis, Tesista (Todas con firmas en original)

## **DEDICATORIA**

Agradecer a nuestro señor Dios, por otorgarme la vida y por permitirme seguir en pie ante los momentos de fragilidad, por haber estado para mí y haberme guiado en cada instante.

A Luzlinda y Jorge, quienes son mis padres, por enseñarme que el estudio es importante porque te ofrece muchas oportunidades en el transcurso de la vida, por su amor incondicional y sacrificio en toda mi carrera profesional, por cada uno de sus consejos, y siempre animarme a seguirme adelante, estaré eternamente agradecida por todo el esfuerzo que han realizado por cada uno de sus hijos.

A mis hermanos y amistades, por su cariño y motivación en todo este trayecto, por creer siempre en mí, gracias por su valiosa compañía y estar a mi lado.

## AGRADECIMIENTO

De manera especial agradecer a la Dra. Lizbeth M. Córdova Rojas, asesora de tesis, por haber aceptado trabajar en conjunto esta investigación, por haberme guiado, orientado y apoyado completamente durante todo este trayecto, que ha sido una travesía de aprendizaje, por su paciencia que la caracteriza, y por haberme brindado su amistad, muchas gracias por la consideración hacia mi persona.

A la Mg. Silvia Isabel Suarez Chavarri, jefa del servicio de Patología Clínica del Hospital de Apoyo de Bagua, y al personal que forma parte del Área de Microbiología, por haberme compartido sus conocimientos, y a su vez por haberme apoyado en la obtención de las muestras en estudio.

A la Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua por el financiamiento otorgado, el cual constituyó un pilar fundamental para la ejecución y culminación del presente trabajo de investigación, contribuyendo de manera significativa al desarrollo académico y científico del mismo

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.1. Determinación del problema de investigación .....	2
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos .....	3
1.4. Importancia y alcance de la investigación .....	3
1.5. Limitaciones de la investigación .....	4
II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Antecedentes del estudio .....	6
2.2. Bases teóricas de la primera y segunda variable .....	7
2.3. Definición de términos básicos .....	9
2.3.1. Efecto antimicrobiano.....	9
2.3.2. Efecto antimicrobiano “toronjil” ( <i>Melissa officinalis</i> ) .....	9
2.3.3. Bacterias patógenas .....	10
2.3.4. <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.3.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
III. HIPÓTESIS.....	11
3.1. Hipótesis .....	11
3.2. Variables .....	11
3.3. Operacionalización de variables .....	12
IV. METODOLOGÍA.....	13
4.1. Enfoque de la investigación.....	13
4.2. Tipo de investigación.....	13
4.3. Diseño de investigación.....	13
4.4. Método.....	13
4.5. Población y muestra .....	19
4.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	19
4.7. Validez y confiabilidad de instrumentos.....	19
4.8. Constatación de hipótesis .....	20

V. RESULTADOS.....	21
5.1. Presentación y análisis de los resultados.....	21
5.1.1. Efecto inhibitorio del extracto de hojas de “toronjil” ( <i>Melissa officinalis</i> ) sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	21
5.1.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas <i>Melissa officinalis</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	23
5.1.3. Comparación del extracto de hojas <i>Melissa officinalis</i> y discos de antibióticos de gentamicina frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	24
5.2. Discusión de resultados.....	28
VI. CONCLUSIONES.....	33
VII. RECOMENDACIONES.....	34
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> .....	<b>17</b>
<i>Codificación de cepas entregadas por el servicio de Patología Clínica – Área de Microbiología del HAB.</i>	
<b>Tabla 2</b> .....	<b>23</b>
<i>Promedio de los halos de inhibición de las cuatro concentraciones del extracto de hojas de “toronjil” (Melissa officinalis) frente a Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae.</i>	
<b>Tabla 3</b> .....	<b>24</b>
<i>Promedio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Melissa officinalis sobre las seis cepas bacterianas.</i>	
<b>Tabla 4</b> .....	<b>26</b>
<i>Análisis de varianza de los halos de inhibición (mm) por seis bacterias frente a cinco tratamientos; disco de antibiótico de gentamicina y cuatro concentraciones (100, 200, 300 y 400 mg/mL) de extracto etanólico de las hojas de Melissa officinalis.</i>	
<b>Tabla 5</b> .....	<b>27</b>
<i>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del promedio de los halos de inhibición (mm) de las seis bacterias experimentales frente a los tratamientos.</i>	
<b>Tabla 6</b> .....	<b>27</b>
<i>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del efecto inhibitorio (mm) de los cinco tratamientos; disco de antibiótico de gentamicina y cuatro concentraciones (100, 200, 300 y 400 mg/mL) de extracto etanólico de las hojas de Melissa officinalis.</i>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> .....	<b>14</b>
<i>Planta de Melissa officinalis.</i>	
<b>Figura 2</b> .....	<b>15</b>
<i>Concentración del extracto “toronjil”.</i>	
<b>Figura 3</b> .....	<b>16</b>
<i>Cepa de Escheria coli aislada en Agar MacConkey.</i>	
<b>Figura 4</b> .....	<b>16</b>
<i>Cepa de Klebsiella pneumoniae aislada en Agar MacConkey.</i>	
<b>Figura 5</b> .....	<b>17</b>
<i>Suspensión bacteriana a la escala 0.5 de Mc. Farland.</i>	
<b>Figura 6</b> .....	<b>21</b>
<i>Actividad antibacteriana del extracto de “toronjil” en cepas de Escherichia coli (a. EC.ATCC 25922, b. EC.C1, c. EC.C2)</i>	
<b>Figura 7</b> .....	<b>22</b>
<i>Actividad antibacteriana del extracto de “toronjil” frente a cepas de Klebsiella pneumoniae (a. KP.ATCC 700603, b. KP.C1, c. KP.C2)</i>	
<b>Figura 8</b> .....	<b>24</b>
<i>CMI frente a Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae.</i>	
<b>Figura 9</b> .....	<b>28</b>
<i>Promedio estimado del efecto inhibitorio (mm) en la interacción del factor tratamientos (A) Y el factor bacterias (B).</i>	

## RESUMEN

Dado el incremento de la resistencia antimicrobiana y la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, la presente tesis buscó aportar al conocimiento científico en los ámbitos de la medicina herbal y la microbiología. El propósito de la investigación fue determinar el efecto antimicrobiano del extracto de hojas de *Melissa officinalis* contra cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, mediante el método difusión en pocillos en agar a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mg/mL, además se comparó con el disco estándar de gentamicina (10 µg). Los resultados de la investigación demostraron el efecto inhibitorio del “toronjil” contra cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con halos de inhibición de 14.2 y 12.6 mm respectivamente, y una concentración mínima inhibitoria (CMI) que oscilaron entre 6.25 a 25 mg/mL. Se concluyó que el extracto de *Melissa officinalis* presentó efecto antimicrobiano frente a cepas bacterias estudiadas, dicha evidencia avala el uso de esta planta en el campo de la fitoterapia y la lucha contra las infecciones bacterianas, además podría llevar al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos a partir de compuestos naturales.

**Palabras claves:** actividad antimicrobiana, *Escherichia coli*, extracto de hojas de “toronjil”, halos de inhibición, *Klebsiella pneumoniae*.

## ABSTRACT

Given the increase in antimicrobial resistance and the need to find for new therapeutic alternatives, the present thesis sought to contribute to scientific knowledge in the fields of herbal medicine and microbiology. The purpose of the research was to determine the antimicrobial effect of *Melissa officinalis* leaf extract against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains, using the agar well diffusion method at concentrations of 100, 200, 300 and 400 mg/mL, and compared with the standard gentamicin disk (10 µg). The results of the research demonstrated the inhibitory effect of *Melissa officinalis* against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains with inhibition halos of 14.2 and 12.6 mm respectively, and a minimum inhibitory concentration (MIC) that ranged from 6.25 to 25 mg/mL. It was concluded that the extract of *Melissa officinalis* did present an antimicrobial effect against the bacterial strains studied. This evidence supports the use of this plant in the field of phytotherapy and the fight against bacterial infections. It could also lead to the development of new antimicrobial agents from natural compounds.

**Key words:** antimicrobial activity, *Escherichia coli*, lemon balm leaf extract, inhibition halos, *Klebsiella pneumoniae*.

## INTRODUCCIÓN

Durante décadas, los antibióticos han servido para tratar diversas enfermedades sino también para prevenirlas tanto en humanos como en animales (Gajdács & Albericio, 2019), ya que estos son compuestos antimicrobianos capaces de inhibir microorganismos pero el uso intensivo e inapropiado ha generado que los microorganismos se adapten ante el efecto de los fármacos (Gajdács & Albericio, 2019). El aumento de resistencia a diversos antibióticos ha generado un problema global de salud y a la vez se ha convertido en un reto debido a que la mayor parte de bacterias patógenas tienen la capacidad de resistir al menos a un antibiótico (Mahtab et al., 2021). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2013, presentó un informe a nivel mundial mencionando a diversas bacterias que son resistentes a diversos fármacos (*Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*), las cuales han provocado altas tasas de mortalidad en Europa y los Estados Unidos (Seyfried & Hughes, 2014). Asimismo, en el año 2015 y 2019, la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (EARS-Net), publicó el grupo de bacterias resistentes, donde *E. coli* (44,2%), se encuentra en primer lugar y *K. pneumoniae* (11,3%) en el tercero (ECDC, 2020), ambas bacterias generan infecciones del tracto urinario (ITU).

Dicha situación busca explorar nuevas opciones seguras, es por ello que toma gran relevancia las plantas medicinales, por su potencial y la diversidad de propiedades biológicas, lo que permite utilizarlas a favor de la humanidad (Joy et al., 2011). A nivel mundial, aproximadamente el 80% de la población suele usar la medicina ancestral, especialmente los países en desarrollo (Mbuni et al., 2020). Además, que estas son más accesibles que los fármacos (Joy et al., 2011).

*Melissa officinalis*, una planta conocida popularmente como “toronjil”, forma parte de la familia taxonómica Lamiaceae; sus propiedades terapéuticas son: antibacteriano, antivirales, antifúngico, sedantes, antihistamínico, entre otros. Sus principales compuestos bioactivos son: citronelal, timol, citral y  $\beta$ -cariofileno (Yoo et al., 2018).

En tal sentido, se propuso la presente investigación cuyo objetivo es determinar la acción antimicrobiana del extracto de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) contra *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. Determinación del problema de investigación

La Organización Mundial de la Salud (2020), enfatiza que los antibióticos son fármacos que se sirven para contrarrestar las infecciones bacterianas, entre las que destacan aquellas causadas por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

*Escherichia coli*, es una bacteria Gram-negativa, responsable de infecciones intestinales y principal agente causante de infecciones del tracto urinario, que últimamente, demuestra su mecanismo de resistencia a los antibióticos.

Por otro lado, *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno oportunista, conocido por su elevada prevalencia y variedad de genes de resistencia a los antimicrobianos, son agentes causantes de infecciones sobre todo en paciente inmunodeprimidos, y reciente investigaciones refieren de *K. pneumoniae* hiper mucoide. La manifestación de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a múltiples fármacos (MDR) se encuentra en constante crecimiento, lo cual es un problema de salud para los países que se encuentran en desarrollo (Aminul et al., 2021).

El excesivo e inapropiado uso de los antibióticos, ha logrado desarrollar la resistencia bacteriana, que se define como la habilidad que tiene la bacteria de rechazar el efecto antagonista de un agente antibacteriano o bactericida (Cesur & Demiröz, 2013). Asimismo, los antibióticos modifican la composición del agente infeccioso, lo que provoca la adaptación o la aparición de mutaciones en las bacterias y, a su vez, generan nuevas cepas que son resistentes al régimen antibiótico actual (Habboush & Guzman, 2022).

En tal contexto, desde hace unos años, sigue en aumento la resistencia a los antibióticos, a escalas peligrosamente altas en todo el mundo, a causa del excesivo uso de estos, lo cual genera nuevos factores de resistencia de dichas bacterias, extendiéndose así a nivel mundial y amenazando la capacidad de tratar infecciones bacterianas comunes (WHO, 2020), con el objetivo de enfrentar la problemática, se ha venido otorgando mayor relevancia al uso de plantas medicinales, las cuales tienen diversas propiedades biológicas, por lo que ejercen un papel importante en el abordaje de diferentes enfermedades (Wang et al., 2020). Estas plantas son ricas fuente de compuestos biológicos activos y pueden representar materias primas que pueden utilizarse para la mejora de nuevos medicamentos (Petrisor et al., 2022).

Históricamente *Melissa officinalis*, perteneciente a la familia Lamiaceae y comúnmente conocida como “toronjil”, es una de las plantas medicinales aromáticas más antigua (Wang et al., 2020), que se utiliza tradicionalmente por sus propiedades curativas como agentes antimicrobianos, antihistamínico y antitumoral, gracias a su potencial se aplica para diversos fines tal como: conservación de alimentos, terapias naturales y medicina complementaria (Keskin & Guvensen, 2018), de modo que, existe la necesidad de saber más sobre el problema en cuestión, formule una pregunta de investigación orientada a lo siguiente:

## 1.2. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*?

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto inhibitorio del extracto de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) a concentraciones de 400, 300, 200 y 100 mg/mL frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las concentraciones del extracto de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante el método de microdilución.
- Comparar la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) con discos de antibiótico de gentamicina.

## 1.4. Importancia y alcance de la investigación

La investigación desempeña un papel fundamental en la sociedad al proporcionar conocimientos y soluciones a diversos problemas y desafíos. En el campo de la microbiología, el estudio de los efectos antimicrobianos de diferentes sustancias naturales ha cobrado una importancia creciente debido al aumento de la

resistencia antimicrobiana y la urgencia de hallar alternativas efectivas para combatir las infecciones causada por grupos bacterianos. En este contexto, el “toronjil” (*Melissa officinalis*), una hierba aromática y curativa considerablemente usada en la práctica de medicina alternativa, es el foco de interés en la presente investigación. Las hojas de “toronjil” contienen varios compuestos activos, como los polifenoles y los aceites esenciales, ha demostrado que poseen propiedades antimicrobianas.

Uno de los objetivos del estudio fue determinar el efecto antimicrobiano del extracto de “toronjil” contra a bacterias uro-patógenas, como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Dichas bacterias son conocidas por causar infecciones gastrointestinales y del tracto respiratorio, respectivamente, y presentan un desafío significativo debido a su resistencia a múltiples antibióticos.

La importancia del presente estudio se justificó en la búsqueda de alternativas terapéuticas efectivas y seguras contra las infecciones bacterianas, especialmente aquellas que originan cepas resistentes a los antibióticos convencionales. El “toronjil” gracias a su actividad antimicrobiana, podría ser una opción competente para el manejo de enfermedades producidas por *E. coli* y *K. pneumoniae*.

### **1.5. Limitaciones de la investigación**

El estudio se basó en el extenso uso de *Melissa officinalis*, una planta de la familia Lamiaceae, reconocida por su variada gama de actividades biológicas, especialmente como agente antimicrobiano. El estudio buscó proporcionar evidencia científica sobre la eficacia de esta planta en la actividad antimicrobiana, lo cual tiene varias implicaciones significativas.

En primer lugar, los hallazgos obtenidos en esta investigación, podrán contribuir al desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos para diversas enfermedades. Se demostró que *Melissa officinalis* tiene una actividad antimicrobiana efectiva frente a cepas bacterianas uro-patógenas como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, se podría utilizar esta planta como base para la formulación de medicamentos más eficaces y seguros. Esto será relevante en la actualidad debido a que la resistencia antimicrobiana es un desafío creciente en el campo de la medicina.

Además, la utilización de *M. officinalis* como agente antimicrobiano podría implicar una alternativa natural y menos invasiva a los tratamientos habituales. Al aprovechar los beneficios de esta planta, se podrían disminuir los efectos secundarios asociados con algunos fármacos antimicrobianos sintéticos.

Además, esta investigación puede disminuir el uso de animales de experimentación. La eficacia de *M. officinalis* como agente antimicrobiano, abre la puerta a futuras investigaciones en el campo de la toxico-farmacología que podrían reemplazar técnicas amenazadoras contra la salud humana, así como disminuir la dependencia de modelos animales en la experimentación científica. Esto es relevante en el entorno de la preocupación por el bienestar animal y la ética en la investigación.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del estudio

Saleh et al., (2023), mencionó la utilidad de *Melissa officinalis* L. como planta medicinal por su propiedad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos. El estudio se basó en analizar el extracto acuoso y etanólico de *M. officinalis* y su acción antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. El método que utilizó para evaluar la actividad antimicrobiana fue difusión en agar en diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40 mg/mL), además se comparó con el disco estándar de gentamicina y fluconazol. Como resultados obtuvieron que el aumento de concentración de *M. officinalis* inhibió el crecimiento de las cepas seleccionadas a excepción de *C. albicans*. La inhibición fue más evidente frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*. En conclusión, ambas sustancias acuosa y etanólico de *M. officinalis* manifestó una buena inhibición frente a la mayoría de microorganismos.

Abdel-Naime et al., (2019), manifestó que *Melissa officinalis* L. es una planta perenne con diversas aplicaciones en la medicina tradicional y culinarias. Por sus propiedades curativas es usada tradicionalmente para tratar una serie de dolencias que incluyen herpes labial, mordeduras infectadas, gastritis y enfermedades parasitarias, el objetivo del trabajo fue evaluar el potencial antibacteriano del extracto etanólico de *M. officinalis* L. frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*. El método utilizado fue difusión en agar en concentraciones 0.625, 1.25, 2.50 y 5.00 mg/mL, además se comparó con el disco estándar de ampicilina, gentamicina, amikacina y augmentine para bacterias, y ketoconazol para hongos. Los resultados obtenidos destacaron notablemente el potencial antimicrobiano de *M. officinalis*, especialmente contra bacterias Gram positivas y levaduras con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.30–345.10 µg/mL. En conclusión, dicha evidencia avaló científicamente el uso medicinal de *M. officinalis* como una planta antimicrobiana con aplicación a futuro en el campo farmacéutico.

Abdellatif et al., (2014), sostuvo que *Melissa officinalis* L. proviene de la familia Lamiaceae, planta que crece en Argelia, es usada en las tradiciones medicinales para tratar indigestiones, cólicos y nerviosismo. El estudio tuvo como

objetivo medir la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de hojas de *M. officinalis* contra siete bacterias, tres bacterias Gram-positivas y cuatro Gram-negativas; utilizando el método de difusión en agar con discos de papel. Los resultados evidenciaron que el aceite esencial de *M. officinalis* tiene una alta actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos seleccionados, principalmente frente *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *S. enterica*, las cuales son bacterias patógenas humanas con una concentración inhibitorias mínimas (MIC) que oscilaron entre 1,00 y 5,00  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . En conclusión, *M. officinalis* puede ser utilizado en productos farmacéuticos y terapias naturales para combatir enfermedades infecciosas.

Rabbani et al., (2015), indica que en las infecciones posquemaduras, existe un grupo aislado de bacterias resistentes a los antibióticos, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, el cual es un problema de salud pública, ante ello el propósito de la investigación fue evaluar la acción antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Melissa officinalis* y extractos acuosos y alcohólicos de hojas en polvo de *Lawsonia inermis* frente algunas bacterias patógenas que ocasionan infección posquemadura. La metodología que usaron fue microdilución para hallar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC). Como resultados obtuvieron que todos los extractos presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus*. Asimismo, los resultados mostraron que existe efecto sinérgico del extracto hidroalcohólico de *M. officinalis* más el extracto alcohólico de *L. inermis* en polvo. En conclusión, estas manifestaciones permiten respaldar las propiedades curativas de los extractos de *M. officinalis* y *L. inermis* como tratamiento de las infecciones por quemaduras.

## **2.2. Bases teóricas de la primera y segunda variable**

### **Actividad antimicrobiana del extracto de hojas de Toronjil**

El “toronjil” (*M. officinalis*), planta medicinal aprovechada en la medicina ancestral y alternativa debido a sus propiedades terapéuticas. Entre ellas, destaca su actividad antimicrobiana, la cual ha sido analizada en diversas investigaciones científicas. En este documento se revisará la literatura disponible sobre la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de “toronjil”.

Los principios bioactivos que se encuentran en el extracto de *M. officinalis* podrían ser los responsables de su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, se ha demostrado que los ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides que contiene el extracto tienen actividad antibacteriana y antifúngica. Estos compuestos actúan inhibiendo el crecimiento de microorganismos, mediante la alteración o modificación de la composición de la membrana celular y la pared celular.

Los estudios revisados sugieren que el extracto de hojas de “toronjil” demuestra una efectividad antimicrobiana significativa contra diferentes cepas de bacterias y hongos. Los compuestos activos presentes en el extracto pueden ser responsables de esta actividad antimicrobiana, mediante la transformación de la membrana y la pared celular. Por ello, es necesario realizar más estudios para comprender como funciona los mecanismos detrás de la acción antimicrobiana del extracto “toronjil” y su potencial como agente antimicrobiano.

#### **Revisión de literatura:**

Con respecto a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son bacterias patógenas ampliamente estudiadas debido a su relevancia clínica y su capacidad de causar infecciones en humanos. Según Kaper et al. (2004), menciona que *E. coli* es una bacteria Gram-negativa, forma parte del microbiota normal de los humanos y de animales de sangre caliente. Sin embargo, ciertos tipos de *E. coli* pueden ser infecciosas y causar enfermedades gastrointestinales, como la diarrea, la gastroenteritis y las infecciones del tracto urinario. Se destaca la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), responsable de generar enfermedades transmitidas por alimentos y síndrome urémico hemolítico.

En cuanto a *Klebsiella pneumoniae*, esta bacteria Gram-negativa también se encuentra comúnmente en el intestino humano y en el medio ambiente (Podschn y Ullmann, 1998). Aunque puede ser un componente normal del microbiota, ciertas cepas de *K. pneumoniae* son patógenas y pueden causar diversas infecciones (neumonía, abscesos, infecciones del tracto urinario e infecciones del torrente sanguíneo). Además, *K. pneumoniae* se ha vuelto alarmante debido a su potencial de incrementar resistencia a múltiples antibióticos (Navon-Venezia et al., 2017), lo que dificulta su tratamiento.

Tanto *E. coli* como *K. pneumoniae* comparten características estructurales y funcionales comunes debido a su pertenencia a la familia Enterobacteriaceae (Rosner et al., 2013). Ambas bacterias poseen una membrana externa compuesta principalmente por lipopolisacáridos (LPS), la cual les confiere resistencia a ciertos compuestos antimicrobianos y les permite evadir la respuesta inmune del hospedador. Además, presentan una variedad de factores de virulencia, como fimbrias, pili y sistemas de secreción, lo que les permite adherirse a las células huésped y a evadir los mecanismos de defensa.

La resistencia antimicrobiana es una preocupación importante asociada con *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Ambas bacterias han desarrollado mecanismos para resistir los efectos de los medicamentos, lo que obstaculiza su tratamiento e incrementa la morbimortalidad asociada con las infecciones (Cai et al., 2014). Estas formas de resistencia que desarrollan las bacterias para su supervivencia abarcan la producción de enzimas que desactivan los antibióticos, modifican los sitios de unión de los antibióticos y el rechazo a la acción antagónica de los fármacos fuera de la célula bacteriana.

## **2.3. Definición de términos básicos**

### **2.3.1. Efecto antimicrobiano**

Es el proceso de matar o inhibir la reproducción de los microbios que causan alguna infección o enfermedad. Diversos agentes antimicrobianos se utilizan para este propósito. Los antimicrobianos pueden ser antibacterianos, antifúngicos o antivirales. Todos ellos tienen diferentes maneras de acción por los que intervienen para suprimir la infección (Ukimura, 2023, párr. 1).

### **2.3.2. Efecto antimicrobiano “toronjil” (*Melissa officinalis*)**

Mediante el análisis de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC-MS) se demostró que los aceites esenciales extraídos de *M. officinalis* están compuestos principalmente por citronelal, timol, citral y  $\beta$ -cariofileno. Basado en el método de ensayo de difusión en disco y microdilución, los aceites son altamente antimicrobianos contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Chen et al., 2017).

### **2.3.3. Bacterias patógenas**

Son aquellas bacterias que originan una enfermedad, estas pueden transmitirse por contacto directo con un huésped infectado, mediante la ingesta de aguas o alimentos contaminadas, o por medio de la acción de un huésped intermediario o vector de enfermedades (Schroeder & Wuertz, 2003).

### **2.3.4. *Escherichia coli***

*Escherichia coli*, bacteria Gram-negativa que pertenece a la familia taxonómica Enterobacteriaceae, tiene forma de bastón. Se encuentra principalmente en la parte inferior del intestino ya que pertenece al microbiota normal de los animales de sangre caliente y humanos, es liberada con frecuencia al medio ambiente a través en las heces (Jang et al., 2017).

### **2.3.5. *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae*, bacteria Gram-negativa, vive de manera natural en las superficies mucosas de los animales, humanos o en el ambiente (como agua, suelo, etc.), se encuentra principalmente en el tracto gastrointestinal y la nasofaringe. La bacteria puede ingresar al torrente sanguíneo u otros tejidos a través de la cavidad nasal para causar una infección (G. Wang et al., 2020).

### III. HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis

El extracto etanólico de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

#### 3.2. Variables

- Independiente: Concentración del extracto de hojas de “toronjil”
- Dependiente: Efecto inhibitorio frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

### 3.3.Operacionalización de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Reactivos ítems	Instrumento
V.I. Concentración del extracto de hojas de "toronjil" ( <i>Melissa officinalis</i> )	Sustancia obtenida de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> .	Capacidad del extracto de hojas de "toronjil" ( <i>Melissa officinalis</i> ) para inhibir el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Concentración del extracto a 100, 200, 300 y 400 mg/mL	Efectividad de control	Rango de concentración	mg/mL
V.D. Efecto inhibitorio frente a <i>Escherichia coli</i>	Bacteria oportunista Gram-negativa	Presencia o ausencia de <i>Escherichia coli</i> en el medio de cultivo después del tratamiento con el extracto de hojas de "toronjil".	Sensible, Intermedio, Resistente	Tamaño del halo de inhibición.	Medición del diámetro del halo de inhibición en mm. Observación de la presencia o ausencia de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> en el medio de cultivo.	Observación directa Vernier digital
V.D. Efecto inhibitorio frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacteria oportunista Gram-negativa	Presencia o ausencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en el medio de cultivo después del tratamiento con el extracto de hojas de "toronjil".	Sensible, Intermedio, Resistente	Tamaño del halo de inhibición.	Observación del cambio de color del medio de cultivo.	Ficha de registro

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1. Enfoque de la investigación

- Enfoque cuantitativo.

### 4.2. Tipo de investigación

- La investigación es de tipo aplicada y de nivel explicativo.

### 4.3. Diseño de investigación

- El diseño que se aplicó en la investigación fue experimental.

G<sub>E1</sub> ----- O<sub>1</sub> ----- X<sub>1</sub> ----- O<sub>2</sub>

G<sub>E2</sub> ----- O<sub>3</sub> ----- (+) ----- O<sub>4</sub>

G<sub>C3</sub> ----- O<sub>5</sub> ----- (-) ----- O<sub>6</sub>

G<sub>E</sub>: Grupos de cepas de *Escherichia coli* / *Klebsiella pneumoniae*

X<sub>1</sub>: Tratamiento con extracto de hojas *Melissa officinalis* L. a 100, 200, 300 y 400 mg/mL

G<sub>C</sub>: Grupo control

(+): Tratamiento con control positivo (Antibiótico gentamicina)

O: Observación

(-): Tratamiento con control negativo (Ausencia de estímulo)

### 4.4. Método

- **Prueba de sensibilidad antimicrobiana**

Se empleó el método de difusión en pocillos en agar, el cual permite evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de plantas o de algún agente antimicrobiano. Consistió en realizar la siembra en superficie de un inóculo microbiano en un medio de cultivo estandarizado para luego hacer orificios de 6 a 8 mm de diámetro utilizando un perforador estéril y colocar un volumen (20 uL a 100 uL) de agente antimicrobiano o del extracto a la concentración deseada en el pocillo, las placas se incubaron bajo las condiciones apropiadas, lo que permitió que el agente antimicrobiano se disperse en el agar y detenga la proliferación de los microorganismos (Balouiri et al., 2016).

- **Dilución en caldo: Microdilución**

La concentración mínima inhibitoria (CIM) de agentes antimicrobiano se define como la menor concentración de un agente antimicrobiano en condiciones

*in vitro*, que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo dentro de un tiempo determinado (Committee et al., 2003).

La CMI se determina mediante el método de dilución en caldo, es una técnica básica para la prueba de sensibilidad antimicrobiana. Este procedimiento consiste en realizar diluciones dobles, es decir se reduce a la mitad el agente antimicrobiano (1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/mL) en un medio de cultivo líquido distribuido en volúmenes pequeños utilizando una placa de 96 pocillos (microdilución), a cada pocillo se le coloca inóculo microbiano estandarizada a la escala de 0.5 de McFarland, posterior a ello se incuba a una temperatura adecuada según el microorganismo en estudio (Balouiri et al., 2016).

- **Procedimientos**

- a) **Obtención del extracto etanólico de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*)**

La recolección de las hojas de “toronjil” (Figura 1) se realizó en el centro poblado Chomza Alta, ubicado en el distrito de la Peca en las coordenadas 5°37'02.07" S y 78°23'59.90" O, provincia de Bagua, región Amazonas. Se coordinó días antes con la propietaria del huerto para la adquisición de la muestra, aproximadamente se recolectó 500 g de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis* L).

**Figura 1**

*Planta de Melissa officinalis.*



El transporte de las hojas desde Chomza Alta hasta el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua, se realizó en bolsas de polietileno.

El material biológico se deshojó separando las hojas del tallo, se seleccionó las hojas en buen estado, enseguida se lavó, se desinfectó con hipoclorito al 1%, y nuevamente se enjuagó con agua destilada estéril, se dejó secar a temperatura ambiente por 2 días.

Las hojas una vez secas, se trituraron con ayuda de un pulverizador para convertirlo en polvo. Se colocó en un envase ámbar, se añadió etanol al 96 °, en una proporción 1:2. Se dejó macerar por 48 horas en agitación. Completado el tiempo establecido, se filtró con papel filtro Whatman N°2 para que no quede residuos en el extracto, luego se colocó en bandejas para secarlo en el horno a 35°C por 3 días. Finalmente, se obtuvo el extracto seco y se mantuvo conservado en refrigeración para su posterior uso.

**b) Concentraciones del extracto etanólico de hojas de “toronjil”**

Se pesó 500 mg. del extracto seco y se diluyó en 1 mL DMSO al 99.9 % (Dimethyl Sulfoxide) logrando tener una concentración madre de 500 mg/mL como se muestra en la Figura 2. A partir de la concentración madre, se realizó diluciones para obtener concentraciones de 400, 300, 200 y 100 mg/mL.

**Figura 2**

*Concentración del extracto “toronjil”.*



**c) Solicitud dirigida al HAB**

Se redactó una solicitud dirigida hacia el Servicio de Patología Clínica – Área de Microbiología del HAB, con el propósito de que faciliten la entrega de las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*

*pneumoniae*. Asimismo, en la solicitud se indicó el uso de dichas cepas bacterianas (Anexo 5).

**d) Método difusión en pocillos en agar**

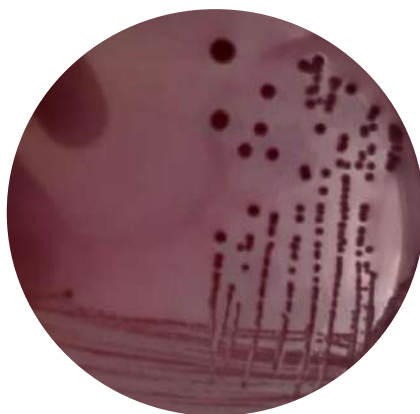
**1. Reactivación de las Cepas Bacterianas**

Los cultivos puros de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* se aislaron a partir de muestras orinas y fueron entregados por el Servicio de Patología Clínica – Área de Microbiología del HAB (Tabla 1).

En condiciones estériles, para la activación de ambas cepas se realizó en Caldo Tripticasa de Soya y se incubó a 37 °C por 18 horas. Luego se cultivaron en Agar MacConkey para obtener colonias aisladas (Figura 3 y 4).

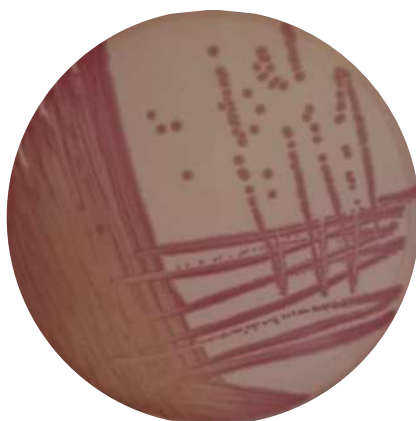
**Figura 3**

*Cepa de Escherichia coli aislada en Agar MacConkey.*



**Figura 4**

*Cepa de Klebsiella pneumoniae aislada en Agar MacConkey.*



**Tabla 1**

*Codificación de cepas entregadas por el Servicio de Patología Clínica – Área de Microbiología del HAB.*

<b>Cepa Bacteriana</b>	<b>Muestra Clínica</b>	<b>Código</b>
<i>Escherichia coli</i>	Orina choro medio	EC.C1
		EC.C2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina choro medio	KP.C1
		KP.C2

Las cepas certificadas, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, que estaban criopreservadas en glicerol al 30 %, se reactivaron con el mismo procedimiento detallado anteriormente.

## 2. Suspensión bacteriana

En un tubo estéril, se añadió 5mL de solución salina estéril, luego se diluyó de una a dos colonias bacterianas, el inóculo (Figura 5) se estandarizó a una turbidez de 0.5 en escala de Mc Farland que es equivalente a una suspensión bacteriana que contiene  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (INS, 2002).

**Figura 5**

*Suspensión bacteriana a la escala 0.5 de Mc. Farland.*



### 3. Siembra de las cepas bacterianas

Se preparó Agar Müller Hinton, según las instrucciones del fabricante (Condalab, 2020), y se vertió en placas Petri estériles. Las placas se sembraron con un hisopo estéril impregnado con el inóculo, se realizó siembra por superficie.

Se procedió a realizar los pocillos usando un perforador de corcho estéril de 6 mm de diámetro:

- 1 pocillo: 40  $\mu$ L DMSO (control negativo)
- 1 disco: antibiótico común (control positivo)
- 4 pocillos: 40  $\mu$ L de cada concentración del extracto a 100, 200, 300 y 400 mg/mL

Se incubaron las placas a 35 °C por 18 – 24 horas, pasado el tiempo transcurrido se registró lo observado y se midió los halos de inhibición.

#### e) Método de Microdilución

Se preparó una solución concentrada (solución madre) de extracto a una concentración de 500 mg/mL que luego se diluyó a una concentración inicial de 400 mg/mL para realizar las diluciones seriadas.

- El control positivo (C+) 100  $\mu$ L de Caldo Tripticasa de Soya (CTS) + 10  $\mu$ L de inóculo bacteriano
- El control negativo (C-) 100  $\mu$ L de extracto de hojas de toronjil.
- Se colocará 100  $\mu$ L de CTS en los 8 pocillos:
  - Dilución 1: 100  $\mu$ L de extracto de toronjil a concentración 400 mg/mL + 100  $\mu$ L CTS = 200 mg/mL
  - Dilución 2: 100  $\mu$ L dilución 2 + 100  $\mu$ L CTS = 100 mg/mL
  - Dilución 3: 100  $\mu$ L dilución 3 + 100  $\mu$ L CTS = 50 mg/mL
  - Dilución 4: 100  $\mu$ L dilución 4 + 100  $\mu$ L CTS = 25 mg/mL
  - Dilución 5: 100  $\mu$ L dilución 5 + 100  $\mu$ L CTS = 12.50 mg/mL
  - Dilución 6: 100  $\mu$ L dilución 6 + 100  $\mu$ L CTS = 6.25 mg/mL
  - Dilución 7: 100  $\mu$ L dilución 7 + 100  $\mu$ L CTS = 3.125 mg/mL
- Se añadió 10  $\mu$ L de suspensión bacteriana a cada pocillo que contiene las diluciones de extracto + CTS.

Luego, se incubó todos los pocillos por 24 horas a una temperatura de 37 °C. La CIM se determinó por la mínima concentración de extracto “toronjil” en el pocillo, cuya solución mostró ausencia de crecimiento bacteriano o turbidez.

#### 4.5. Población y muestra

- **Población:** Cepas bacterianas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y las hojas de *Melissa officinalis*.
- **Muestra:** La muestra estuvo constituida por seis cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, cuatro fueron aisladas de muestras de orinas entregadas por el Servicio de Patología Clínica – Área de Microbiología del HAB y dos cepas certificadas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), 5 kg de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) recolectadas del centro poblado Chomza Alta, distrito de la Peca - Bagua.

**Criterios para la selección de las hojas de “toronjil”:** Las hojas recolectadas no presentaron lesiones de daño o infección, fueron muestras frescas y recogidas directamente de las plantas.

- **Muestreo:** No probabilístico por conveniencia.

#### 4.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

- **Técnica:** para el estudio se aplicó la observación directa, dicha técnica permitió que el investigador observe y recoja información a través su conveniente observación (Tamayo, 2004, p. 183)

- **Instrumento de recolección de datos**

**Vernier digital:** instrumento de alta precisión que permite medir con exactitud distancias internas como externas (Gupta, 2022). Instrumento que será útil para hallar el tamaño del halo de inhibición.

**Ficha de registro:** sirve para recoger datos e información de fuentes analizadas; las fichas se crean, diseñan y se proyectan considerando la información necesaria para el estudio (Arias, 2020).

#### 4.7. Validez y confiabilidad de instrumentos

- **Validez del instrumento:** la ficha de registro (ANEXO 1) fue validada mediante Constructo y Contenido. Este instrumento fue elaborado con el propósito de recolectar las medidas en milímetros de los diámetros de halos de inhibición del

extracto etanólico de hojas de *M. officinalis* (“toronjil”) contra seis cepas bacterianas (*E. coli* y *K. pneumoniae*), dicho instrumento fue evaluado bajo la opinión de tres expertos que tienen conocimientos en la línea de investigación. Los expertos analizaron y verificaron que los indicadores incluidos en el instrumento están alineados con los objetivos de la investigación, asegurando que los datos recogidos sean pertinentes con el efecto inhibitorio del extracto (ANEXO 3). Como resultado de la validez, se obtuvo un coeficiente de 85 lo cual es mayor a 76, criterio tomado de Valderrama y León (2009), se concluyó la validez de la propuesta porque sirvió para recolectar las medidas del constructo de interés.

- **Confiabilidad del instrumento:** los datos recogidos de manera reiterada y bajo las mismas condiciones experimentales en la prueba piloto del presente estudio, se obtuvo un coeficiente de 0.97 en la prueba de confiabilidad de Alfa de Cronbach, lo que indica que la ficha de registro presenta una alta confiabilidad, permitiendo una consistencia en las mediciones de los halos de inhibición, dichos criterios facilitaron que el instrumento sea confiable para el recojo de los datos (ANEXO 4).

#### **4.8. Constatación de hipótesis**

El extracto de *Melissa officinalis* (“toronjil”) tiene un notable efecto antimicrobiano significativo (halo y CMI) hacia algunas bacterias patógenas, gracias a los principios bioactivos presentes, como ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides. Por lo tanto, se anticipa con base teórica y estudios similares que las diversas propiedades antimicrobianas del extracto etanólico de Toronjil impide la proliferación de las bacterias evaluadas.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Presentación y análisis de los resultados

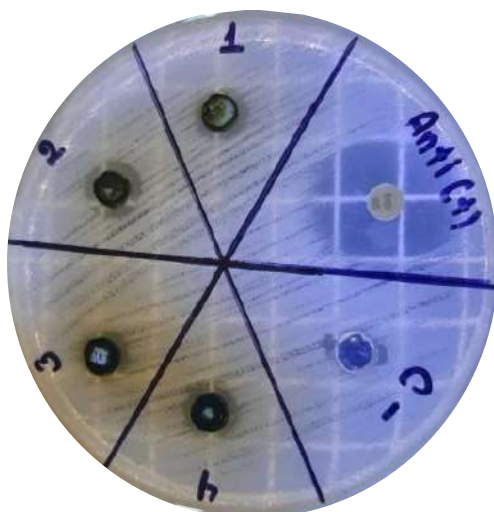
#### 5.1.1. Efecto inhibitorio del extracto de hojas de “toronjil” (*Melissa officinalis*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

El efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* se evaluó mediante el método de difusión en pocillo en agar (Figura 6 y 7), los resultados obtenidos muestran que los grupos bacterianos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* fueron inhibidos por el extracto, asimismo se observó que, a mayor concentración del extracto, mayor es el efecto inhibitorio.

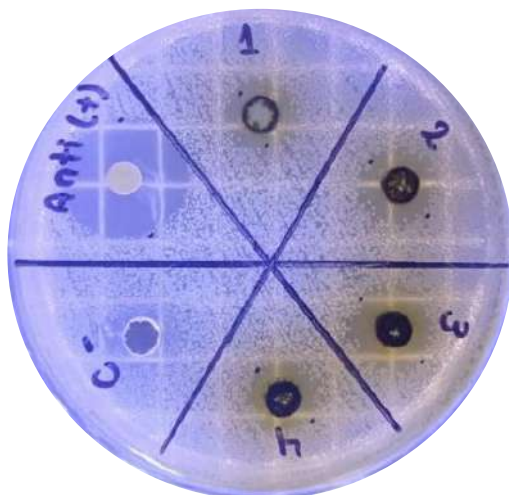
#### Figura 6

Actividad antibacteriana del extracto de “toronjil” en cepas de *Escherichia coli* (a. EC. ATCC 25922, b. EC.C1, c. EC.C2)

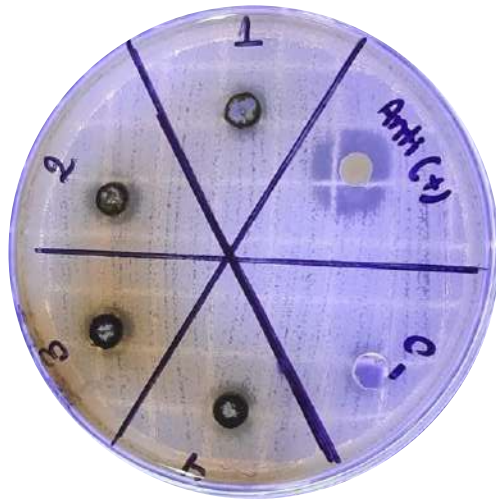
a. EC. ATCC 25922



b. EC.C1



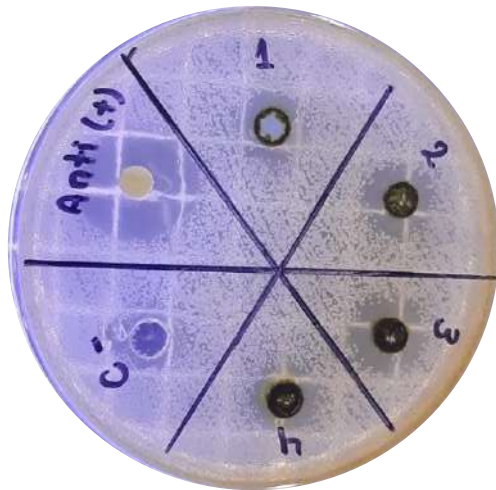
c. EC.C2



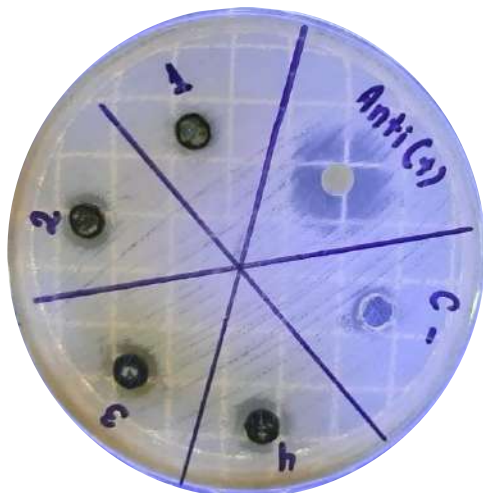
**Figura 7**

*Actividad antibacteriana del extracto de "toronjil" frente a cepas de Klebsiella pneumoniae (a. KP. ATCC 700603, b. KP.C1, c. KP.C2)*

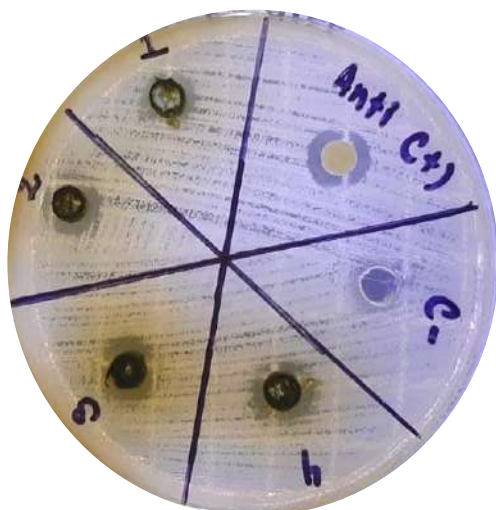
a. KP. ATCC 700603



b. KP.C1



c. KP.C2



En la Tabla 2 se indican los promedios de los halos de inhibición, las cepas que tuvieron mayor sensibilidad fue EC.C1 con una zona de 14.2 mm de diámetro y KP.C2 con halo de 12.6 mm.

**Tabla 2**

*Promedio de los halos de inhibición de las cuatro concentraciones del extracto de hojas de “toronjil” (Melissa officinalis) frente a Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae.*

Tratamientos	Promedio halos de inhibición (mm)*					
	EC ATCC 25922	EC.C1	EC. C2	KP ATCC 25922	KP.C1	KP.C2
400 mg/mL	12	14.2	11.4	12	12.2	12.6
300 mg/mL	11.6	13.4	10.8	11.4	12	12
200 mg/mL	11.2	12	10.2	11.4	11.4	11.6
100 mg/mL	10.4	10.6	9.2	10.4	10	10.4

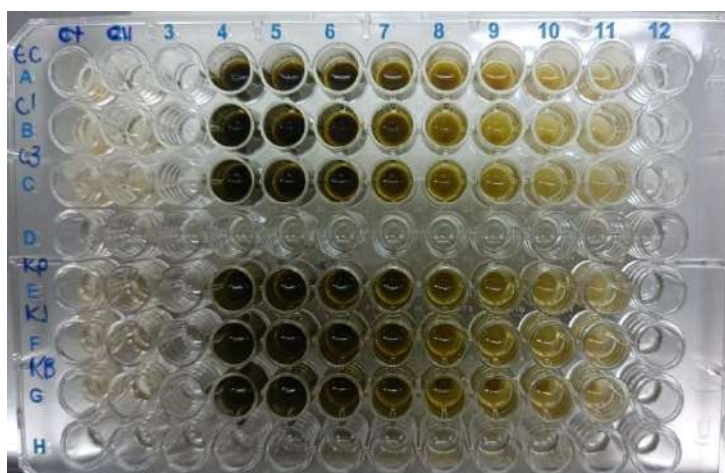
\*promedio de cinco repeticiones

### 5.1.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas *Melissa officinalis* frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

El extracto etanólico de *Melissa officinalis* presentó una CMI sobre las seis cepas bacterianas (Figura 8), con una concentración mínima de 6.25 mg/mL en las cepas de EC ATCC 25922 y KP.C2, y como valor máximo de 25 mg/mL en las cepas de KP ATCC 700603 y KP.C2 (Tabla 3).

**Figura 8**

*CMI frente a Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae.*



**Tabla 3**

*Promedio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Melissa officinalis sobre las seis cepas bacterianas.*

Concentraciones del extracto etanólico (mg/mL) *						
EC ATCC 25922	EC.C1	EC.C2	KP ATCC 700603	KP.C1	KP.C2	
400 (-)	400 (-)	400 (-)	400 (-)	400 (-)	400 (-)	
200 (-)	200 (-)	200 (-)	200 (-)	200 (-)	200 (-)	
100 (-)	100 (-)	100 (-)	100 (-)	100 (-)	100 (-)	
50 (-)	50 (-)	50 (-)	50 (-)	50 (-)	50 (-)	
25 (-)	25 (-)	25 (-)	<b>25 (-)</b>	<b>25 (-)</b>	25 (-)	
12.5 (-)	<b>12.5 (-)</b>	<b>12.5 (-)</b>	12.5 (+)	12.5 (+)	12.5 (-)	
<b>6.25 (-)</b>	6.25 (+)	6.25 (+)	6.25 (+)	6.25 (+)	<b>6.25 (-)</b>	
3.125 (+)	3.125 (+)	3.125 (+)	3.125 (+)	3.125 (+)	3.125 (+)	

Control: 100 uL Caldo Trypticase de Soya + 10 uL de inóculo)

(+): turbidez (crecimiento)

(-): No hay crecimiento

\*promedio de tres repeticiones

### 5.1.3. Comparación del extracto de hojas *Melissa officinalis* y discos de antibióticos de gentamicina frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Para evaluar la efectividad de los tratamientos en la inhibición del crecimiento bacteriano se realizó un diseño experimental factorial, ya que este diseño permitió analizar la influencia de dos factores (tratamientos (A) y bacterias (B)) con diferentes niveles y sus interacciones entre sí para afectar la inhibición.

Factor A: Tratamientos

Control positivo (Gentamicina)

Tratamiento a 400 mg/mL

Tratamiento a 300 mg/mL

Tratamiento a 200 mg/mL

Tratamiento a 100 mg/mL

Factor B: Cepas Bacterianas

EC. ATCC 25922

EC.C1

EC.C2

KP. ATCC 700603

KP.C1

KP.C2

## **Hipótesis**

### **Factor A: Tratamientos**

H0: No existen diferencias significativas entre los tratamientos (gentamicina y las concentraciones del extracto etanólico de *Melissa officinalis*).

H1: Existen diferencias significativas entre los tratamientos (gentamicina y las concentraciones del extracto etanólico de *Melissa officinalis*).

### **Factor B: Bacterias**

H0: No existe diferencias significativas entre las cepas bacterianas en estudio.

H1: Existe diferencias significativas entre las cepas bacterianas en estudio.

### **Interacción A x B**

H0: No existen diferencias significativas entre los tratamientos y la inhibición cepas bacterianas estudiadas.

H1: Existen diferencias significativas entre los tratamientos y la inhibición las cepas bacterianas estudiadas.

El efecto inhibitorio según la prueba “F” del análisis de varianza del factorial 5 x 6 demostró significancia ( $p < 0,05$ ) en el efecto principal entre los tratamientos (A) y las bacterias (B), así como la interacción A x B, lo que evidenció que existió efecto de los tratamientos en la inhibición microbiana (Tabla 4). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ) demostró que EC.C1, EC ATCC 25922 y KP.C2 presentaron mayor inhibición en comparación con las otras bacterias. Estos resultados indican que EC.C1, EC ATCC 25922 y KP.C2 son las bacterias más sensibles a los tratamientos evaluados (Tabla 5). En el caso de los tratamientos, demostró que el mayor efecto inhibitorio se alcanzó con la gentamicina con diferencias significativas frente a las diversas concentraciones del extracto de *Melissa officinalis* (Tabla 6). Respecto a la interacción A x B el mejor efecto inhibitorio se alcanzó con la gentamicina en las cepas bacterianas EC ATCC 25922, EC.C1, EC.C2 y KP.C1. Sin embargo, las diferentes concentraciones del extracto tuvieron un mejor efecto inhibitorio en las cepas bacterias KP ATTC 700603 y KP.C2 (Figura 9).

**Tabla 4**

*Análisis de varianza de los halos de inhibición (mm) por seis bacterias frente a cinco tratamientos; disco de antibiótico de gentamicina y cuatro concentraciones (100, 200, 300 y 400 mg/mL) de extracto etanólico de las hojas de Melissa officinalis.*

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1170,373 <sup>a</sup>	29	40,358	52,640	,000
Intersección	22521,627	1	22521,627	29376,035	,000
Tratamientos	485,773	4	121,443	158,404	,000
Bacterias	162,773	5	32,555	42,463	,000
<b>Tratamiento * Bacteria</b>	521,827	20	26,091	34,032	,000
Error	92,000	120	,767		
Total	23784,000	150			
Total corregido	1262,373	149			

a. R al cuadrado = ,927 (R al cuadrado ajustada = ,910)

**Tabla 5**

*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del promedio de los halos de inhibición (mm) de las seis bacterias experimentales frente a los tratamientos.*

Cepas bacterianas	N	Promedio de los halos de inhibición	
		1	2
KP.C1	25	11,080	
KP ATCC 700603	25	11,120	
EC.C2	25	11,520	
KP.C2	25		12,880
EC ATCC 25922	25		13,400
EC.C1	25		13,520
Sig.		,485	,109

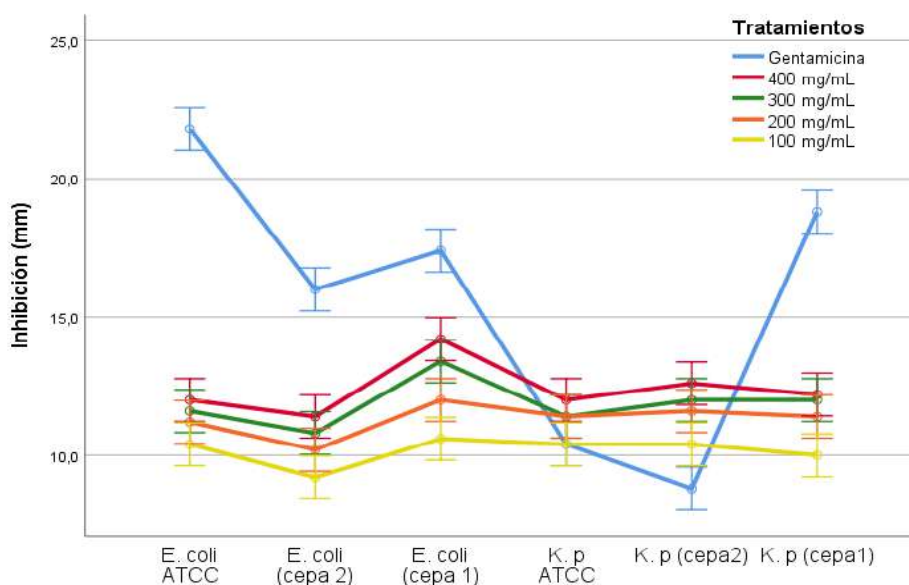
**Tabla 6**

*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del efecto inhibitorio (mm) de los cinco tratamientos; disco de antibiótico de gentamicina y cuatro concentraciones (100, 200, 300 y 400 mg/mL) de extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis*.*

Tratamientos	N	Promedio de los halos de inhibición (mm)			
		1	2	3	4
100 mg/mL	30	10,167			
200 mg/mL	30		11,300		
300 mg/mL	30		11,867	11,867	
400 mg/mL	30			12,400	
Gentamicina	30				15,533
Sig.		1,000	,096	,134	1,000

## Figura 9

Promedio estimado del efecto inhibitorio (mm) en la interacción del factor tratamientos (A) y el factor bacterias (B).



## 5.2. Discusión de resultados

La creciente percepción de los efectos adversos de cepas resistentes a los antibióticos ha llevado a demandar fármacos naturales y seguros, dando importancia a las plantas medicinales como una alternativa por sus propiedades farmacológicas para la salud. Actualmente, el uso de extractos que provienen de plantas naturales con fines terapéuticos ha aumentado notablemente debido a los efectos negativos de los medicamentos sintéticos y la resistencia entre los microorganismos patógenos (Lone et al., 2024). En el presente estudio se analizó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico *Melissa officinalis* (“toronjil”), una planta medicinal ancestral reconocida por sus diversas propiedades, como efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos. Asimismo, Shakeri et al., (2016) y Petrisor et al., (2022), han demostrado que *M. officinalis* tiene diversas actividades biológicas que ayudan a las aplicaciones farmacológicas como hipoglucémicas, hipolipidémicas, anticancerígenas, antidepresivas, ansiolíticas, antinociceptiva y espasmolíticas.

El extracto etanólico de *M. officinalis* es particularmente atractivo debido a su amplia gama de compuestos bioactivos, principalmente se caracteriza por la presencia de cuatro componentes dominantes: citronelal, timol, citral y  $\beta$ -cariofileno (Ehsani et al., 2017). Diversos estudios mencionan que *M. officinalis* contiene

terpenos: monoterpenos, triterpenos y sesquiterpenos; y compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, taninos y flavonoides (Mencherini et al., 2007)(Shakeri et al., 2016) (Miraj et al., 2017). Estas propiedades hacen que sea una planta de interés para el desarrollo de agentes antimicrobianos alternativos.

Según Muhammad & Muhammad, (2005), gracias a la investigación que realizaron en plantas medicinales, estudiando la actividad antibacteriana frente a bacterias que causan infección posquemadura, determinaron que si una planta causa una zona de inhibición mayor a 6 mm, está planta se considera activa contra microorganismos.

### **5.2.1. Efecto inhibitorio del extracto de hojas de “toronjil”**

El hallazgo obtenido en la investigación, determinó que el extracto etanólico de *Melissa officinalis* (“toronjil”), tiene capacidad antimicrobiana sobre cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, donde se observó susceptibilidad a los cuatro tratamientos (100, 200, 300 y 400 mg/mL) con halos de 14.2 mm y 12.6 mm respectivamente como se muestra en la Tabla 2. Asimismo, estudios realizados por Saleh et al. (2023) sobre extractos acuosos y etanólicos de *M. officinalis*, mostraron que a diversas concentraciones obtuvieron diámetros entre 10 a 23 mm frente a cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*; resaltando que *E. coli* fue más sensible a los extractos, obteniendo halos de 16 a 21 mm para extracto acuoso y 12 a 23 mm para extracto etanólico, a comparación de *C. albicans* donde no mostró inhibición. Del mismo modo Rabbani et al. (2015), trabajó con extracto hidroalcohólico de *M. officinalis* por método de difusión en pocillo, su actividad antimicrobiana fue notoria en *S. aureus* con halos de inhibición de 7 a 15 mm y para *E. coli* de 7 a 10 mm.

A diferencia de Abdellatif et al.(2014) que trabajó con el aceite de *M. officinalis* probando su efectividad frente a siete cepas bacterias: *S. aureus*, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. enterica*; teniendo como resultados halos de inhibición que oscilaron entre 17 a 18 mm para Gram-positivas, y 14 a 21 mm para Gram-negativas. También probó su efectividad frente a *C. albicans* (36 mm) y dos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum albedinis* y *Fusarium oxysporum lini*, la actividad antifúngica del aceite esencial (34 a 38 mm) fue más potente al control positivo, nistatina (20 a 24 mm).

En contraste con lo reportado por Abdel-Naime et al. (2019), su investigación mostró que el extracto etanólico de *M. officinalis*, inhibió el desarrollo de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, sin embargo, no mostró actividad antibacteriana frente a *K.*

*pneumoniae* y *E. coli*. Por otro lado, Ehsani et al. (2017), también encontró resultados similares para el aceite esencial de *M. officinalis*, que tiene efecto antibacteriano significativo contra *S. typhimorium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, siendo la última la más sensible, con un halo de 15 mm, a comparación de *E. coli*, que fue la cepa más resistente al aceite esencial. Asimismo, el grupo de investigación de Korcan et al., (2018), replicó el experimento, y encontró resultados totalmente diferentes, enfatizando las propiedades del aceite esencial de *M. officinalis*.

Otro estudio, donde trabajaron con diferentes solventes, determinó que el extracto de cloroformo de *M. officinalis* logró inhibir el crecimiento de *C. albicans* (27 mm), en comparación al resto de microorganismos ensayados: *A. hydrophyla*, *S. faecalis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *B. cereus*, que obtuvieron halos de inhibición de 11 a 23 mm (Keskin & Guvensen, 2018). Zazharskyi et al., (2019), realizó una investigación de 50 plantas medicinales entre ellas *M. officinalis*, dicho extracto etanólico confirmó la acción inhibitoria sobre *S. typhimurium* (7,4 mm), y también encontró efecto antibacteriano sobre *K. pneumoniae* (4,6 mm).

### **5.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico.**

En la Tabla 3 se muestran los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Melissa officinalis* frente a seis cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados evidencian que a concentraciones elevadas (400, 300, 200 y 100 mg/mL) el extracto logró inhibir el crecimiento bacteriano, mientras que a partir de 6.25 mg/mL se comenzó a observar actividad inhibitoria. La CMI varió entre 6.25 y 25 mg/mL, dependiendo de la cepa evaluada.

Se destaca que las cepas EC ATCC 25922 y KP.C2 mostraron inhibición a la menor concentración probada (6,25 mg/mL), lo que indica una mayor sensibilidad al extracto. Por el contrario, cepas como EC.C2, EC.C, KP.C1 y KP ATCC 700603 requirieron concentraciones más altas para inhibir su crecimiento, lo cual sugiere una resistencia relativa.

Estos hallazgos evidencian que el extracto etanólico de *Melissa officinalis* posee un efecto antimicrobiano dependiente de la concentración, y que la respuesta varía según la cepa bacteriana. Además, se observa una ligera tendencia a una mayor sensibilidad en cepas clínicas frente a las cepas de referencia ATCC, lo que podría deberse a diferencias genéticas y adaptativas entre ambas.

### 5.2.3. Comparación del extracto etanólico de “toronjil” con el antibiótico.

La Tabla 4 muestra el análisis de varianza (ANOVA) la cual muestra diferencias altamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los halos de inhibición tanto entre los tratamientos como entre las cepas bacterianas evaluadas, así como en la interacción tratamiento x bacteria. Este resultado demuestra que la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Melissa officinalis* depende no solo de la concentración utilizada, sino también de la susceptibilidad particular de cada microorganismo.

El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,927$ ) indica que el modelo estadístico explica el 92,7% de la variabilidad observada en los datos, lo cual es un valor elevado y refleja la capacidad explicativa del modelo. Este resultado se debe a que los factores evaluados (tratamiento y tipo de bacteria) ejercieron un efecto marcado y consistente sobre el crecimiento microbiano, mientras que el error experimental fue mínimo (media cuadrática del error = 0,767).

Asimismo, en la Tabla 5 se presentan los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, aplicada a los promedios de los halos de inhibición generados por seis cepas bacterianas frente a los tratamientos evaluados. Se observa que las cepas KP.C1 (11,08 mm), KPATCC 700603 (11,12 mm) y EC.C2 (11,52 mm) conforman un mismo grupo homogéneo (grupo 1), lo que indica que no existen diferencias significativas entre ellas. Estas cepas mostraron los valores más bajos de inhibición, lo que sugiere una menor susceptibilidad al tratamiento. Por otro lado, las cepas KP.C2 (12,88 mm), EC ATCC 25922 (13,40 mm) y EC.C1 (13,52 mm) se agrupan en el segundo conjunto (grupo 2), con halos de inhibición significativamente mayores, evidenciando una mayor sensibilidad. En términos generales, se aprecia que las cepas de *Escherichia coli* manifestaron mayor susceptibilidad en comparación con las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

En la Tabla 6 se presentan los promedios de los halos de inhibición obtenidos con los diferentes tratamientos: cuatro concentraciones del extracto etanólico de *Melissa officinalis* (100, 200, 300 y 400 mg/mL) y el antibiótico gentamicina como control positivo. Los resultados muestran un incremento progresivo del efecto inhibitorio en función de la concentración del extracto, pasando de 10,167 mm en la concentración más baja (100 mg/mL) a 12,40 mm en la concentración más alta (400 mg/mL). No obstante, el halo de inhibición generado por la gentamicina (15,53 mm)

fue significativamente superior a todas las concentraciones del extracto (Figura 9), lo que confirma su alta potencia como antibiótico de referencia. En contraste, el extracto etanólico de *Melissa officinalis* mostró un efecto inhibitorio menor, aunque evidente y dependiente de la concentración: a mayor dosis (400 mg/mL), se alcanzaron los valores más altos de inhibición, mientras que las concentraciones de 100 y 200 mg/mL mostraron los halos más reducidos.

Asimismo, se evidenció variabilidad en la respuesta según el microorganismo evaluado. En EC.C1 el extracto alcanzó un leve incremento en la inhibición, mientras que en KP.C2 la gentamicina presentó una disminución en su eficacia, lo que sugiere la posible resistencia de esta cepa. Por su parte, el extracto mantuvo un patrón más uniforme entre las cepas de ambas bacterias, aunque sin superar al antibiótico.

Los estudios analizados demuestran que *M. officinalis* tiene acción bactericida sobre diversos microorganismos, gracias a los compuestos bioactivos presente en la planta y que le permite ser una eficacia antimicrobiana contra bacterias resistentes a diferentes medicamentos. No obstante, su efecto dosis-dependiente y la estabilidad frente a diferentes cepas respaldan la posibilidad de considerarlo como una alternativa complementaria o coadyuvante en el control de infecciones bacterianas.

El presente estudio resalta la importancia de explorar alternativas naturales frente a la creciente resistencia bacteriana. Además, estudios adicionales podrían investigar la combinación de este extracto con antibióticos convencionales para evaluar posibles efectos sinérgicos. Se espera que este estudio conduzca al establecimiento de algunos compuestos que podrían utilizarse para formular nuevos y más potentes fármacos antimicrobianos de origen natural.

## VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que el extracto etanólico *Melissa officinalis* presentó efecto inhibitorio *in vitro* a una concentración de 400 mg/mL frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con halos de inhibición de 14.2 mm y 12.6 mm respectivamente.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas de *Melissa officinalis* oscilaron entre 6.25 mg/mL a 25 mg/mL para cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.
- Se determinó que el extracto de hojas de *Melissa officinalis* a concentración de 400 mg/mL presentó un mayor efecto inhibitorio a comparación de los discos de gentamicina 10 µg frente a las cepas en de *Klebsiella pneumoniae*.

## VII. RECOMENDACIONES

- Caracterizar e identificar los compuestos bioactivos del extracto etanólico de *Melissa officinalis* según la región geográfica mediante cromatografía.
- Evaluar la citotoxicidad del extracto de *Melissa officinalis* en líneas celulares.
- Evaluar las interacciones sinérgicas del extracto etanólico de “toronjil” con antibióticos convencionales frente cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*.
- Realizar nuevas investigaciones sobre el efecto inhibitorio frente a otros microorganismos de interés.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Naime, W. A., Fahim, J. R., Fouad, M. A., & Kamel, M. S. (2019). Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies of *Melissa officinalis*. *South African Journal of Botany*, *124*, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.011>
2. Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A., & Hassani, A. (2014). CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FROM LEAVES OF ALGERIAN MELISSA OFFICINALIS L. *Chemistry of Natural Compounds*, *52*(6), 1113–1115. <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1878-y>
3. Aminul, P., Anwar, S., Molla, M. M. A., & Miah, M. R. A. (2021). Evaluation of antibiotic resistance patterns in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Bangladesh. *Biosafety and Health*, *3*(6), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2021.11.001>
4. Arias, J. L. (2020). *Técnicas E Instrumentos De Investigación Científica Enfoques Consulting Eirl* (ENFOQUES CONSULTING (ed.); Primera ed). Biblioteca Nacional del Perú.
5. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
6. Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *48*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
7. Cai JC, Zhang R, Hu YY, Zhou HW, Chen G. 2014. Emergence of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates Producing KPC-2 Carbapenemase in China. *Antimicrob Agents Chemother* *58*: <https://doi.org/10.1128/aac.00912-13>
8. Cesur, S., & Demiröz, A. (2013). ANTIBIOTICS AND THE MECHANISMS OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, *21*(4), 138–142. <https://doi.org/10.33564/ijeast.2021.v06i08.016>
9. Chen, S. G., Leu, Y. L., Cheng, M. L., Ting, S. C., Liu, C. C., Wang, S. Der, Yang, C. H., Hung, C. Y., Sakurai, H., Chen, K. H., & Ho, H. Y. (2017). Anti-enterovirus 71 activities of *Melissa officinalis* extract and its biologically active constituent rosmarinic acid. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12388-2>
10. Condalab. (2020). *Ficha Técnica: Agar Mueller Hinton*. 5–7.
11. Committee, E., Testing, S., Microbiology, C., & Escmid, I. D. (2003). Determination

- of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), ix–xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
12. Ehsani, A., Alizadeh, O., Hashemi, M., Afshari, A., & Aminzare, M. (2017). Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 8(3), 223–229.
  13. European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—annual epidemiological report 2019. ECDC, Stockholm.
  14. Gajdács, M., & Albericio, F. (2019). Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics*, 8(3), 8–11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030129>
  15. Gupta, P. (2022). Important Topic of Physics: Vernier Calipers. Infinity Learn; <https://infinitylearn.com/surge/blog/iit-jee/vernier-calipers/>
  16. Habboush, Y., & Guzman, N. (2022). Antibiotic Resistance. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
  17. INS. (2002). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Serie de Normas Técnicas N ° 30*.
  18. Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
  19. Joy, R., Malar, J., Johnson, M., M. M. U., & Arthy, A. (2011). Antibacterial activity of ethanolic extracts of selected medicinal plants against human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S76–S78. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60128-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60128-7)
  20. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
  21. Keskin, D., & Guvensen, N. (2018). Comparative analysis of phytochemical composition and antimicrobial properties of different solvent extracts of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Environmental Biology*, 28(3).
  22. Korcan, S. E., Aksoy, B., Erdoğan, S. F., & Çiğerci, İ. H. (2018). *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Melissa officinalis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin ve DNA Koruyucu Kapasitesinin Araştırılması Investigation of Antimicrobial Activity and DNA Protective Capacity of Melissa o. 18*, 757–762.

23. Lone, A. S., Ravindran, K. C., & Jeandet, P. (2024). Evaluation of antimicrobial activity and bioactive compound analysis of *Verbascum thapsus* L. A folklore medicinal plant. *Phytomedicine Plus*, 4(3), 100560. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100560>
24. Mahtab, T., Jyoti, A., Khusro, A., Redwan, B. M., Zidan, M., Mitra, S., Bin, T., Dhama, K., Hossain, K., Gajdacs, M., Umar, M., Sahibzada, K., Hossain, J., & Koirala, N. (2021). Journal of Infection and Public Health Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14, 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
25. Mbuni, Y. M., Wang, S., Mwangi, B. N., Mbari, N. J., Musili, P. M., Walter, N. O., Hu, G., Zhou, Y., & Wang, Q. (2020). Medicinal Plants and Their Traditional Uses in Local Communities around Cherangani Hills, Western Kenya. *Plants*, 9, 1–16.
26. Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., & Aquino, R. (2007). Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *Journal of Natural Products*, 70(12), 1889–1894. <https://doi.org/10.1021/np070351s>
27. Miraj, S., Rafieian-Kopaei, & Kiani, S. (2017). *Melissa officinalis* L: A Review Study with an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(3), 385–394. <https://doi.org/10.1177/2156587216663433>
28. Muhammad, H. S., & Muhammad, S. (2005). *The use of Lawsonia inermis* linn. (*henna*) in the management of burn wound infections. 4(September), 934–937.
29. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252-275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
30. Petrisor, G., Motelica, L., Craciun, L. N., Oprea, O. C., Ficai, D., & Ficai, A. (2022). *Melissa officinalis*: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms23073591>
31. Rabbani, M., Etemadifar, Z., Karamifard, F., & Borhani, M. S. (2015). Assessment of the antimicrobial activity of *Melissa officinalis* and *Lawsonia inermis* extracts against some bacterial pathogens. *Comparative Clinical Pathology*, 25(1), 59–65. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2140-x>
32. Rosner, B. M., Werber, D., Höhle, M., & Stark, K. (2013). Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-

- based study, Germany 2009-2010. *BMC Infectious Diseases*, 13, 236. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-236>
33. Saleh, R. H., Omran, A. M., & Bash, H. S. (2023). Chemical composition and antimicrobial effect of *Melissa officinalis* and *Angelica sylvestris* on selected microbial pathogens. *Biodiversitas*, 24(3), 1871–1877. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240363>
  34. Schroeder, E., & Wuertz, S. (2003). Pathogenic Bacteria. In *Handbook of Water and Wastewater Microbiology* (pp. 57–68). <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50004-2>
  35. Seyfried, D., & Hughes, C. (2014). AAFP ICD-9 to ICD-10 referential flash cards: top 825 primary care diagnoses. *American Family Physician*, 51.
  36. Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
  37. Tamayo, M. (2004). El proceso de la investigación científica incluye evaluación y administración de proyectos de investigación. In *Limusa* (4a. ed.). Limusa. [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=BhymmEqkkJwC&oi=fnd&pg=PA13&dq=nivels+y+tipos+de+investigación+científica&ots=TrdH9o25oH&sig=L uUy8OrcuTqx2cp7NTQENjLPSmM#v=onepage&q=nivels y tipos de investigación científica&f=false%0Ahttps://books.google.c](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=BhymmEqkkJwC&oi=fnd&pg=PA13&dq=nivels+y+tipos+de+investigación+científica&ots=TrdH9o25oH&sig=L uUy8OrcuTqx2cp7NTQENjLPSmM#v=onepage&q=nivels+y+tipos+de+investigación+científica&f=false%0Ahttps://books.google.c)
  38. Ukimura, A. (2023). Antimicrobial Activity. *Clinical Microbiology: Open Access*. <https://www.walshmedicalmedia.com/scholarly/antimicrobial-activity-journals-articles-ppts-list-3252.html>
  39. Valderrama, S., & León, L. R. (2009). Técnicas e instrumentos para la obtención de los datos en la investigación científica. Lima: San Marcos.
  40. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
  41. Wang, W., Xu, J., Fang, H., Li, Z., & Li, M. (2020). Advances and challenges in medicinal plant breeding. In *Plant Science* (Vol. 298). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110573>
  42. WHO. (2020, July 31). *Antibiotic Resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
  43. Yoo, G., Lee, I. K., Park, S., Kim, N., Park, J. H., & Kim, S. H. (2018). Optimization

of Extraction Conditions for Phenolic Acids from the Leaves of *Melissa officinalis* L. Using Response Surface Methodology. *Pharmacogn Magazine*, 14(54), 155–161. <https://doi.org/10.4103/pm.pm>

44. Zazharskyi, V. V., Davydenko, P., Kulishenko, O., Borovik, I. V., & Brygadyrenko, V. V. (2019). Antimicrobial activity of 50 plant extracts. *Biosystems Diversity*, 27(2), 163–169. <https://doi.org/10.15421/011922>

## ANEXOS

### Anexo 1. Instrumento de investigación

Cepa bacteriana: \_\_\_\_\_

N°	Extracto de hojas de "toronjil" ( <i>Melissa officinalis</i> )											
	100 mg/mL			200 mg/mL			300 mg/mL			400 mg/mL		
Items	Halo de inhibición (mm)	Ausencia o presencia de bacterias	Cambio de color del medio de cultivo	Halo de inhibición (mm)	Ausencia o presencia de bacterias	Cambio de color del medio de cultivo	Halo de inhibición (mm)	Ausencia o presencia de bacterias	Cambio de color del medio de cultivo	Halo de inhibición (mm)	Ausencia o presencia de bacterias	Cambio de color del medio de cultivo
1												
2												
3												
4												
5												

Cepa bacteriana: \_\_\_\_\_

N°	Controles					
	Gentamicina 10 µg			Etanol 96°		
Items	Halo de inhibición (mm)	Ausencia o presencia de bacterias	Cambio de color del medio de cultivo	Halo de inhibición (mm)	Ausencia o presencia de bacterias	Cambio de color del medio de cultivo
1						
2						
3						
4						
5						

## Anexo 2. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p><b>PROBLEMA GENERAL</b></p> <p>¿Qué efecto antimicrobiano tiene el extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>?</p> <p><b>PROBLEMA ESPECÍFICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las concentraciones al 100, 200, 300 y 400 mg/mL del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>?</li> <li>- ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las concentraciones del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>?</li> </ul>	<p><b>OBJETIVO GENERAL</b></p> <p>Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar el efecto inhibitorio del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) a concentraciones de 400, 300, 200 y 100 mg/mL frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</li> <li>- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las concentraciones del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> mediante el método de microdilución.</li> </ul>	<p><b>HIPÓTESIS GENERAL</b></p> <p>El extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) tiene efecto inhibitorio sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p> <p><b>HIPÓTESIS ESPECÍFICAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Existe efecto inhibitorio del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) a concentraciones de 400, 300, 200 y 100 mg/mL frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</li> <li>- Existe una la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las concentraciones del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> mediante el método de microdilución.</li> </ul>	<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p>Concentración del extracto de hojas de “toronjil”.</p> <p>➤ <b>Indicadores de la V.I:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Efectividad de control.</li> </ul> <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE</b></p> <p>Efecto inhibitorio frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p>➤ <b>Indicadores de la V.D:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tamaño del halo de inhibición</li> </ul>	<p><b>Tipo de Investigación:</b></p> <p>Aplicada y de nivel explicativo</p> <p><b>Diseño de Investigación:</b></p> <p>Experimental</p> <p>GE1 ----- O1 ----- X1 ----- O2            GE2 ----- O3 ----- (+) ----- O4            GC3 ----- O5 ----- (-) ----- O6</p> <p>GE: Grupos de cepas de <i>Escherichia coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>            X1: Tratamiento con extracto de hojas <i>Melissa officinalis</i> L. a 100, 200, 300 y 400 mg/mL            GC: Grupo control            (+): Tratamiento con control positivo (Antibiótico gentamicina)            O: Observación            (-): Tratamiento con control negativo (Ausencia de estímulo)</p> <p><b>Población y Muestra:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Población:</b> cepas bacterianas (<i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>) y las hojas de <i>Melissa officinalis</i>.</li> </ul>

<p>mediante el método de microdilución?</p> <p>- ¿Qué diferencia existe entre actividad antimicrobiana de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) con discos de antibiótico de gentamicina?</p>	<p>- Comparar la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) con discos de antibiótico de gentamicina.</p>	<p>- Existe diferencia entre la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) con discos de antibiótico de gentamicina.</p>		<p>- <b>Muestra:</b> La muestra estará formada por seis cepas de <i>Escherichia Coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> brindadas por Servicio de Patología Clínica – Área de Microbiología del HAB y dos cepas certificadas (<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603) y 5kg de hojas de “toronjil” (<i>Melissa officinalis</i>) recolectada del centro poblado Chomza Alta, distrito de la Peca - Bagua.</p>
--	--	---	--	---

### Anexo 3. Carta de solicitud de validación e informe de juicio de expertos

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

Bagua, 17 de julio del 2023

CARTA N°. 001-2023-UNIFSLB/FCNA/MSCT

Señora: **Mg. Silvia Isabel Suarez Chavarri**

Presente.-

#### ASUNTO: OPINIÓN DE EXPERTO

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para saludarla cordialmente y a la vez manifestarle que, conocedor de su trayectoria académica-científica y profesional, solicito su atención al elegirlo como **JUEZ EXPERTO** para revisar los instrumentos que pretendo utilizar en el trabajo de investigación que vengo realizando para obtener el título profesional de **BIOTECNÓLOGO**; por lo que, con la finalidad de determinar la validez de su contenido y la confiabilidad, solicito marcar con una equis (X) los indicadores del instrumento de acopio de datos, de acuerdo a su amplia experiencia y conocimientos. Para tal efecto, como anexos se adjunta:

1. Matriz de consistencia
2. Instrumentos de investigación
3. Informe de opinión de expertos de los instrumentos de investigación

Agradezco anticipadamente su colaboración y estoy seguro que su opinión y criterio de experto servirán para los fines propuestos.

Atentamente,



**Bach. Maryori S. Castañeda Terrones**

DNI: 75884206

Anexo 3.

**INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE LOS INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN**

TÍTULO DE LA TESIS: “ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE HOJAS DE TORONJIL (*Melissa officinalis*) FRENTE A *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*”

PRESENTADO POR (Tesisista): Bach. Maryori Sarain Castañeda Terrones

**I. DATOS GENERALES DEL EXPERTO NRO: 01**

- 1.1. Apellidos y Nombres del experto: Suarez Chavarri Silvia Isabel
- 1.2. Grado Académico : Magister
- 1.3. Cargo e Institución donde Labora: Jefa del Laboratorio Clínico y Patológico – Hospital de Apoyo Gustavo Lannatta Lujan

**II. VALIDACIÓN**


INDICADORES	CRITERIOS Sobre los ítems del instrumento	Muy Malo	Malo	Regular	Bueno	Muy Bueno
		1	2	3	4	5
1. CLARIDAD	Están formulados con lenguaje apropiado.				X	
2. OBJETIVIDAD	Están expresados en conductas observables y medibles.				X	
3. ACTUALIDAD	Es adecuado al avance de la ciencia y tecnología.				X	
4. ORGANIZACION	Existe una organización lógica en los contenidos y relación con la teoría.				✓	
5. SUFICIENCIA	Son suficientes la cantidad y calidad de ítems presentados en los instrumentos.				✓	
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del sistema metodológico y científico.				✓	
7. CONSISTENCIA	Se basa en aspectos teóricos, científicos acordes a la ciencia.				✓	
8. COHERENCIA	Entre el problema y los objetivos de la investigación.				X	
9. METODOLOGÍA	Responde al propósito del trabajo bajo los objetivos a lograr.				X	
10. PERTINENCIA	Las categorías de respuestas y sus valores son apropiados.				X	
SUMATORIA PARCIAL						
SUMATORIA TOTAL						

**III. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN**

3.1 Promedio de valoración: .....

3.2 Opinión de aplicabilidad: Favorable ( ) Debe mejorar ( ) No favorable ( )

3.3 Observaciones: Se recomienda usar cepas Certificadas: Escherichia Coli (ATCC 35218) (25922), para Klebsiella, ATCC (700603)

Firma del experto:  Mg. Silvia I. Suárez Chavarri

BIÓLOGO - MICROBIOLOGO  
ESP. LABORATORIO CLÍNICO Y BIOLÓGICOS

Fecha: 24.07/2023

DNI: 19246078

Celular: GRP: 3060 RNBE: 0360  
981809911

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

Bagua, 13 de julio del 2023

CARTA N°. 002-2023-UNIFSLB/FCNA/MSCT

Señor(a): **Dra. María Margarita Mora Costilla**

Presente.-

**ASUNTO: OPINIÓN DE EXPERTO**

---

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para saludarlo(a) cordialmente y a la vez manifestarle que, conocedor de su trayectoria académica-científica y profesional, solicito su atención al elegirlo como **JUEZ EXPERTO** para revisar los instrumentos que pretendo utilizar en el trabajo de investigación que vengo realizando para obtener el título profesional de **BIOTECNÓLOGO**; por lo que, con la finalidad de determinar la validez de su contenido y la confiabilidad, solicito marcar con una equis (X) los indicadores del instrumento de acopio de datos, de acuerdo a su amplia experiencia y conocimientos. Para tal efecto, como anexos se adjunta:

1. Matriz de consistencia
2. Instrumentos de investigación
3. Informe de opinión de experto de los instrumentos de investigación

Agradezco anticipadamente su colaboración y estoy seguro que su opinión y criterio de experto servirán para los fines propuestos.

Atentamente,

  
\_\_\_\_\_  
**Bach. Maryori S. Castañeda Terrones**

DNI: 75884206

Anexo 3.

**INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE LOS INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN**

TÍTULO DE LA TESIS: “ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE HOJAS DE TORONJIL (*Melissa officinalis*) FRENTE A *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*”

PRESENTADO POR (Tesista): Bach. Maryori Sarain Castañeda Terrones

**I. DATOS GENERALES DEL EXPERTO NRO: 02**

1.1. Apellidos y Nombres del experto: Mora Costilla María Margarita

1.2. Grado Académico : Doctora

1.3. Cargo e Institución donde Labora: Docente – Universidad Nacional Intercultural

Fabiola Salazar Leguía de Bagua

**II. VALIDACIÓN**


INDICADORES	CRITERIOS Sobre los ítems del instrumento	Muy Malo	Malo	Regular	Bueno	Muy Bueno
		1	2	3	4	5
1. CLARIDAD	Están formulados con lenguaje apropiado.					X
2. OBJETIVIDAD	Están expresados en conductas observables y medibles.					X
3. ACTUALIDAD	Es adecuado al avance de la ciencia y tecnología.				X	
4. ORGANIZACION	Existe una organización lógica en los contenidos y relación con la teoría.					X
5. SUFICIENCIA	Son suficientes la cantidad y calidad de ítems presentados en los instrumentos.					X
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del sistema metodológico y científico.					X
7. CONSISTENCIA	Se basa en aspectos teóricos, científicos acordes a la ciencia.				X	
8. COHERENCIA	Entre el problema y los objetivos de la investigación.					X
9. METODOLOGÍA	Responde al propósito del trabajo bajo los objetivos a lograr.					X
10. PERTINENCIA	Las categorías de respuestas y sus valores son apropiados.					X
SUMATORIA PARCIAL					8	40
SUMATORIA TOTAL						48

**III. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN**

3.1 Promedio de valoración: 48

3.2 Opinión de aplicabilidad: Favorable (X) Debe mejorar ( ) No favorable ( )

3.3 Observaciones: Por favor, precisar mejor el término “antibiótico común “

Firma del experto:   
 María Margarita Mora Costilla  
 BIOLOGA - MICROBIOLOGA  
 Dra. Ciencias Ambientales

Fecha: 17/07/2023

DNI: 19215260

Celular: 949614240

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

Bagua, 13 de julio del 2023

CARTA N°. 003-2023-UNIFSLB/FCNA/MSCT

Señor(a): **DR. Julio Cesar Montenegro Juárez**

Presente.-


**ASUNTO: OPINIÓN DE EXPERTO**

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para saludarlo(a) cordialmente y a la vez manifestarle que, conocedor de su trayectoria académica-científica y profesional, solicito su atención al elegirlo como **JUEZ EXPERTO** para revisar los instrumentos que pretendo utilizar en el trabajo de investigación que vengo realizando para obtener el título profesional de **BIOTECNÓLOGO**; por lo que, con la finalidad de determinar la validez de su contenido y la confiabilidad, solicito marcar con una equis (X) los indicadores del instrumento de acopio de datos, de acuerdo a su amplia experiencia y conocimientos. Para tal efecto, como anexos se adjunta:

1. Matriz de consistencia
2. Instrumentos de investigación
3. Informe de opinión de expertos de los instrumentos de investigación

Agradezco anticipadamente su colaboración y estoy seguro que su opinión y criterio de experto servirán para los fines propuestos.

Atentamente,

  
\_\_\_\_\_  
**Bach. Maryori S. Castañeda Terrones**  
DNI: 75884206

Anexo 3.

**INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE LOS INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN**

TÍTULO DE LA TESIS: "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE HOJAS DE TORONJIL (*Melissa officinalis*) FRENTE A *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*"

PRESENTADO POR (Tesista): Bach. Maryori Sarain Castañeda Terrones

**I. DATOS GENERALES DEL EXPERTO NRO: 03**

1.1. Apellidos y Nombres del experto: Montenegro Juárez Julio Cesar

1.2. Grado Académico : Doctor

1.3. Cargo e Institución donde Labora: Docente – Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua

**II. VALIDACIÓN**

INDICADORES	CRITERIOS Sobre los ítems del instrumento	Muy Malo	Malo	Regular	Bueno	Muy Bueno
		1	2	3	4	5
1. CLARIDAD	Están formulados con lenguaje apropiado.				X	
2. OBJETIVIDAD	Están expresados en conductas observables y medibles.				X	
3. ACTUALIDAD	Es adecuado al avance de la ciencia y tecnología.				X	
4. ORGANIZACION	Existe una organización lógica en los contenidos y relación con la teoría.				X	
5. SUFICIENCIA	Son suficientes la cantidad y calidad de ítems presentados en los instrumentos.				X	
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del sistema metodológico y científico.				X	
7. CONSISTENCIA	Se basa en aspectos teóricos, científicos acordes a la ciencia.				X	
8. COHERENCIA	Entre el problema y los objetivos de la investigación.				X	
9. METODOLOGÍA	Responde al propósito del trabajo bajo los objetivos a lograr.				X	
10. PERTINENCIA	Las categorías de respuestas y sus valores son apropiados.				X	
SUMATORIA PARCIAL					40	
SUMATORIA TOTAL						40

**III. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN**

3.1 Promedio de valoración: .....

3.2 Opinión de aplicabilidad: Favorable (X) Debe mejorar ( ) No favorable ( )

3.3 Observaciones: .....

Firma del experto:  .....

Fecha: 17/07/2023

DNI: 41458587

Celular: 983994985

## Anexo 4. Resultados de validación del instrumento

*Validez del instrumento mediante Constructo y Contenido*

Validez de la propuesta por opinión de juicio de experto						
Indicadores	N°	Expertos			Puntaje Promedio	%
		1	2	3		
1. CLARIDAD	1	4	5	4	13	86.7%
2. OBJETIVIDAD	2	4	5	4	13	86.7%
3. ACTUALIZACIÓN	3	4	4	4	12	80.0%
4. ORGANIZACION	4	4	5	4	13	86.7%
5. SUFICIENCIA	5	4	5	4	13	86.7%
6. INTENCIONALIDAD	6	4	5	4	13	86.7%
7. CONSISTENCIA	7	4	4	4	12	80.0%
8. COHERENCIA	8	4	5	4	13	86.7%
9. METODOLOGÍA	9	4	5	4	13	86.7%
10. PERTINENCIA	10	4	5	4	13	86.7%
<b>TOTAL</b>						<b>853.3%</b>

$$\Sigma = \frac{853.3\%}{10}$$

$$\Sigma = 85\%$$

### Interpretación

Como 85 es mayor que 76, se valida la propuesta.

(Criterio tomado de Valderrama y León, 2009)

*Confiabilidad del instrumento según el Coeficiente de Alfa de Cronbach*

<b>Indicadores</b>											
<b>Expertos</b>	<b>Ind. 1</b>	<b>Ind. 2</b>	<b>Ind. 3</b>	<b>Ind. 4</b>	<b>Ind. 5</b>	<b>Ind. 6</b>	<b>Ind. 7</b>	<b>Ind. 8</b>	<b>Ind. 9</b>	<b>Ind. 10</b>	<b>TOTAL</b>
<b>1</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	<b>40</b>
<b>2</b>	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	<b>48</b>
<b>3</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	<b>40</b>
<b>Total</b>	13	13	12	13	13	13	12	13	13	13	<b>128</b>
<b>Varianza <math>\sum S^2</math></b>	0.333	0.333	0	0.333	0.333	0.333	0	0.333	0.333	0.333	<b>2.6667</b>

Varianza total = St 21.333

Nº de Indicadores K = 10  
 K-1 = 9

$$\alpha = \frac{K}{K-1} \left[ 1 - \frac{\sum S_i^2}{S_T^2} \right]$$

Donde  
 Alfa de Cronbach  $\alpha = 0.972$

El cálculo del Alfa de Cronbach es de 0.97, esto quiere decir que el instrumento presenta una alta confiabilidad; por lo tanto, cumple con los criterios de aplicación para el presente estudio.

## Anexo 5. Carta dirigida al Servicio de Patología Clínica del HAB



UNIVERSIDAD NACIONAL  
INTERCULTURAL FABIOLA SALAZAR  
LEGUÍA DE BAGUA

VICEPRESIDENCIA  
ACADÉMICA

DIRECCIÓN DE LA ESCUELA  
PROFESIONAL DE  
BIOTECNOLOGÍA

"Año de la Unidad, la Paz y el Desarrollo"

**CARTA N° 015-2023-UNIFSLB-VPA/FCNA-DEPB**

**A** : Mg. SILVIA ISABEL SUAREZ CHAVARRI  
Jefa del servicio de patología clínica – área de microbiología del HAB.

**ASUNTO** : SOLICITO DOS CEPAS BACTERIANAS

**FECHA** : Bagua, 04 de setiembre de 2023



Es grato dirigirme a usted para expresarle mi cordial saludo en nombre de la Dirección de la Escuela Profesional de Biotecnología de la Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua (UNIFSLB), y a la vez hacerle llegar el pedido de la Estudiante **Castañeda Terrones, Maryori Sarain**, donde solicita dos cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el marco de su proyecto de tesis titulado: "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE HOJAS DE TORONJIL (*Melissa officinalis*) FRENTE A *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*" con la finalidad de ser ejecutado para obtener el título profesional de Biotecnólogo. Espero contar con su apoyo ya que la referida estudiante ha demostrado responsabilidad, deseos de aprender y dedicación en la investigación y cuenta con el total apoyo y confianza de la Escuela Profesional de Biotecnología.

Agradeciendo la atención a la presente, hago propicia la ocasión para renovarle las muestras de mi especial consideración.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL  
"FABIOLA SALAZAR LEGUÍA" DE BAGUA

  
DRA. LIZBETH MARIBEL CORDOVA ROJAS  
DIRECTORA DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

c. Archiv.

www.unibagua.edu.pe

Jr. Ancash N° 520  
Bagua Amazonas, Perú

## Anexo 6. Evidencias fotográficas del experimento

- Cultivos puros de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* entregadas por el Servicio de Patología Clínica – Área de Microbiología del HAB.



- Medios de cultivos.



- Cepas reactivadas en caldo Tripticasa de Soya.



- Reactivación de cepas.



- Secado a temperatura ambiente las hojas de “toronjil”.



- Triturado de las hojas secas de “toronjil”.



- Preparado del extracto etanólico.



- Macerado del extracto etanólico de las hojas de “toronjil”.



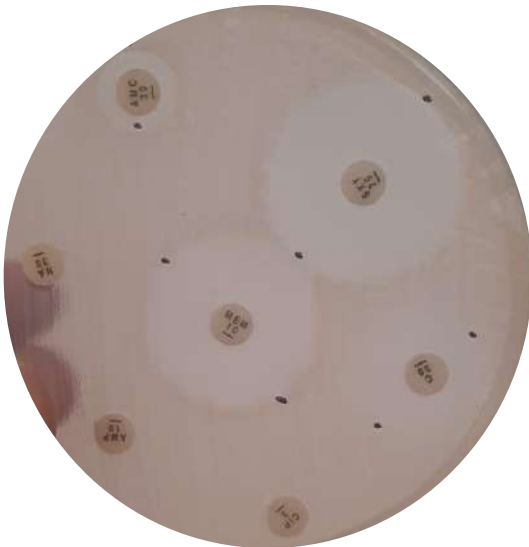
- Filtrado del extracto etanólico de las hojas de “toronjil”.



- Secado del extracto en el horno a 37 °C.



- Prueba de sensibilidad de cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a diversos antibióticos.





## CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD AVALADO POR EL ASESOR

**1. Tesista:**

Maryori Sarain Castañeda Terrones

**DNI:**

75884206

**Escuela Profesional:**

Biología

**2. Asesor:**

Lizbeth Maribel Córdova Rojas

**3. Grado académico o título profesional:**

Bachiller  Título profesional

Maestro  Doctor

**4. Denominación del título profesional:**

Licenciado en Biología

**5. Tipo de Investigación:**

Tesis  Trabajo de investigación  Trabajo de suficiencia profesional

Trabajo académico

**6. Título de Trabajo de Investigación:**

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO DE HOJAS DE  
"TORONJIL" (*Melissa officinalis*) FRENTE A *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

**7. Fecha de evaluación:** 18/09/2025

**8. Software antiplagio:**  TURNITIN

**9. Porcentaje de Informe de Similitud:** 23%

**10. Resultado de la Evaluación de Similitud:**

APROBADO  PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES

DESAPROBADO

Fecha Emisión: 18/09/2025

Firma y/o Sello  
Emisor Constancia

**Lizbeth Maribel Córdova Rojas**  
DNI: 45048533

# Titulo Maryori

## INFORME

 Quick Submit

 Quick Submit

 Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua

---

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::1:3343494603

Fecha de entrega

18 sep 2025, 8:58 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

18 sep 2025, 10:28 a.m. GMT-5

Nombre del archivo

ORIGINAL\_INFORME\_DE\_TESIS\_2025\_\_MARYORI\_CASTA\_EDA.docx

Tamaño del archivo

11.3 MB

65 páginas

10.430 palabras

60.341 caracteres




# 23% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

## Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía

## Fuentes principales

- 22%  Fuentes de Internet
- 7%  Publicaciones
- 8%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Marcas de integridad

### N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## Fuentes principales

- 22% Fuentes de Internet
- 7% Publicaciones
- 8% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

<b>1</b>	Internet		
hdl.handle.net		4%	
<b>2</b>	Internet		
repositorio.unprg.edu.pe		1%	
<b>3</b>	Internet		
repositorio.une.edu.pe		<1%	
<b>4</b>	Internet		
repositorio.unapiquitos.edu.pe		<1%	
<b>5</b>	Internet		
repositorio.unsch.edu.pe		<1%	
<b>6</b>	Trabajos del estudiante		
Universidad Nacional de Educacion Enrique Guzman y Valle		<1%	
<b>7</b>	Internet		
repositorio.ug.edu.ec		<1%	
<b>8</b>	Trabajos del estudiante		
Universidad Católica de Santa María		<1%	
<b>9</b>	Trabajos del estudiante		
Universidad Cesar Vallejo		<1%	
<b>10</b>	Internet		
1library.co		<1%	
<b>11</b>	Internet		
repositorio.ucv.edu.pe		<1%	

12	Internet	repositorio.uap.edu.pe	<1%
13	Internet	repositorio.undac.edu.pe	<1%
14	Internet	www.coursehero.com	<1%
15	Internet	dgsa.uaeh.edu.mx:8080	<1%
16	Trabajos del estudiante	Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua	<1%
17	Internet	repositorio.urp.edu.pe	<1%
18	Trabajos del estudiante	Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	<1%
19	Internet	repositorio.upla.edu.pe	<1%
20	Internet	doczz.com.br	<1%
21	Internet	www.dspace.uce.edu.ec	<1%
22	Internet	es.scribd.com	<1%
23	Internet	repositorio.unibagua.edu.pe	<1%
24	Internet	patents.google.com	<1%
25	Internet	www.slideshare.net	<1%

26	Publicación	"Proceedings of the 4th Biotechnology World Symposium", Mexican Journal of Bi...	<1%
27	Internet	sedici.unlp.edu.ar	<1%
28	Internet	www.microbesome.com	<1%
29	Internet	docplayer.es	<1%
30	Internet	repositorio.uia.ac.cr:8080	<1%
31	Internet	www.revistas.unitru.edu.pe	<1%
32	Internet	doczz.es	<1%
33	Internet	naturopatiadigital.eu	<1%
34	Internet	noesis.uis.edu.co	<1%
35	Internet	unibagua.edu.pe	<1%
36	Internet	rdu.unc.edu.ar	<1%
37	Trabajos del estudiante	Corporación Universitaria Minuto de Dios,UNIMINUTO	<1%
38	Trabajos del estudiante	Coventry University	<1%
39	Trabajos del estudiante	Universidad Catolica Los Angeles de Chimbote	<1%

40	Trabajos del estudiante	Ilerna Online Blackboard	<1%
41	Publicación	Tanea Maria Bisognin Garlet, Bettina Monika Ruppelt. "Medicinal plants with pot..."	<1%
42	Trabajos del estudiante	Universidad Señor de Sipan	<1%
43	Trabajos del estudiante	Universidad de las Islas Baleares	<1%
44	Internet	helvia.uco.es	<1%
45	Internet	repositorio.uisek.edu.ec	<1%
46	Internet	www.encb.ipn.mx	<1%
47	Trabajos del estudiante	Universidad Catolica De Cuenca	<1%
48	Internet	bdigital.unal.edu.co	<1%
49	Internet	repositorio.uigv.edu.pe	<1%
50	Internet	repository.ub.ac.id	<1%
51	Internet	repository.usu.ac.id	<1%
52	Internet	www.semanticscholar.org	<1%
53	Trabajos del estudiante	Universidad Santiago de Cali	<1%

54	Internet	jeb.co.in	<1%
55	Internet	pesquisa.bvsalud.org	<1%
56	Internet	polodelconocimiento.com	<1%
57	Internet	repositorio.uns.edu.pe	<1%
58	Internet	www.ingentaconnect.com	<1%
59	Publicación	Lana Y.M. Juee, Sargul H. Sofi, Aveen N. Adham. "Melissa officinalis gastroprotecti..."	<1%
60	Internet	alicia.concytec.gob.pe	<1%
61	Internet	docs.bvsalud.org	<1%
62	Internet	dspace.univ-bba.dz	<1%
63	Internet	issuu.com	<1%
64	Internet	repositorio.espam.edu.ec	<1%
65	Internet	repositorio.udl.edu.pe	<1%
66	Internet	repositorio.xoc.uam.mx	<1%
67	Internet	riull.ull.es	<1%

68	Internet	www.frontiersin.org	<1%
69	Internet	ALBUQUERQUE U.P., CORNATOSKY M.A., DUARTE M.C.T., FATTOUCH Sami(1) et al. ...	<1%
70	Trabajos del estudiante	B.S.Abdur Rahman Crescent Institute of Science & Technology	<1%
71	Internet	doczz.net	<1%
72	Internet	dspace.unitru.edu.pe	<1%
73	Internet	dspace.unl.edu.ec	<1%
74	Internet	dspace.ups.edu.ec	<1%
75	Internet	link.springer.com	<1%
76	Internet	renati.sunedu.gob.pe	<1%
77	Internet	repositorio.uma.edu.pe	<1%
78	Publicación	Catalina Rivas-Morales, María Azucena Oranday-Cárdenas, María Julia Verde-Star....	<1%
79	Publicación	Diego Miguel Dasí Camaró. "Estudio del agua como fuente de entrada y dispersió...	<1%
80	Trabajos del estudiante	Instituto Superior Pedagógico Público Sagrado Corazón de Jesús	<1%
81	Publicación	Ma. Nieves Trujillo Tapia, María Eugenia Hidalgo Lara, Ramón Alberto Batista Gar...	<1%

82	Publicación	Maria Eugenia Cecchini, Dardo Andrés Roma, Lucía Pussetto, Delvis Iglesias et al. ...	<1%
83	Internet	bibliometria.us.es	<1%
84	Internet	dogadergi.ksu.edu.tr	<1%
85	Internet	kerwa.ucr.ac.cr	<1%
86	Internet	pdfs.semanticscholar.org	<1%
87	Internet	repositorio.essalud.gob.pe	<1%
88	Internet	repositorio.unfv.edu.pe	<1%
89	Internet	repositorio.unicach.mx	<1%
90	Internet	repositorio.uwiener.edu.pe	<1%
91	Internet	repositorioinstitucional.uaslp.mx	<1%
92	Internet	www.mdpi.com	<1%
93	Internet	www.researchgate.net	<1%
94	Internet	www.sciencegate.app	<1%
95	Publicación	Martyna A. Posluszny, Magdalena Chłopecka, Sorphon Suor-Cherer, Sekhou Cisse,...	<1%

96	Publicación	"Novel Drug Targets With Traditional Herbal Medicines", Springer Science and Bu...	<1%
97	Publicación	Silvio Alejandro Lopez-Pazos, Leanis Pitre-Ruiz, Deycis Galván-Ayala, Kelly Johann...	<1%
98	Internet	biblio.ugent.be	<1%
99	Internet	repositorio.unsaac.edu.pe	<1%