

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las  
hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” frente a *Candida*  
*albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR

Bach. PEREZ PACHECO, Marleni

AYACUCHO - PERÚ

2019

A Dios por ser la luz en mi camino, por su infinito amor, a mis padres Emilliano y Marcelina por brindarme siempre el apoyo moral y económico en mi formación profesional. A mis hermanos por el apoyo incondicional que me brindaron.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme acogido en sus aulas y por ser forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a los docentes, por sus invaluables esfuerzos realizados con el objeto de transmitir conocimientos e inculcar valores para mantener siempre en alto el nombre de la profesión y servir a la sociedad.

Al Químico Farmacéutico Edwin Carlos Enciso Roca y Biólogo-Microbiólogo Víctor Luis Cárdenas López, asesor y coasesor del presente trabajo de investigación quien me brindó su valiosa colaboración y acertada dirección en el desarrollo y culminar esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes del estudio.....	3
2.2. <i>Melissa officinalis</i> L.....	9
2.3. <i>Candida albicans</i> .....	10
2.4. Antifúngico.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Tipo de investigación .....	15
3.2. Definición de la población y muestra.....	15
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos.....	15
3.4. Análisis de datos.....	19
IV. RESULTADOS.....	21
V. DISCUSIÓN.....	27
VI. CONCLUSIONES.....	33
VII. RECOMENDACIONES.....	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los antifúngicos por su estructura.	12
Tabla 2: Concentraciones decrecientes de las diluciones de los extractos de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" Ayacucho 2019.	18
Tabla 3. Metabolitos secundarios analizados en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" Ayacucho 2019.	23
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2019.	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estructura química de la Nistatina.	13
Figura 2 Mecanismo de acción fármacos antifúngicos.	14
Figura 3 Promedio de los halos de inhibición (mm) a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2019.	24
Figura 4 Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2019.	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

		página
Anexo 1	Certificación e identificación taxonómica de <i>Melissa officinalis</i> L. Ayacucho 2017.	45
Anexo 2	Certificación de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Ayacucho 2019.	46
Anexo 3	Flujograma del proceso de recolección y procesamiento de la muestra de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil”, Ayacucho 2019.	47
Anexo 4	Flujograma de la preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil”, Ayacucho 2019.	48
Anexo 5	Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil”, Ayacucho 2019.	49
Anexo 6	Concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil”, Ayacucho 2019.	50
Anexo 7	Flujograma de la activación de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Ayacucho 2019.	51
Anexo 8	Nistatina 100000 UI/mL, de laboratorio Medifarma.	52
Anexo 9	Esquema de método de difusión por disco.	53
Anexo 10	Proceso de aplicación de método de difusión por disco Ayacucho 2019.	54
Anexo 11	Halos de inhibición a concentraciones de 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil”, Ayacucho 2019.	55
Anexo 12	Tubos mostrando la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la hojas de de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil” al 10 %, Ayacucho 2019.	56
Anexo 13	Concentración mínima fungicida (CMF) de las concentraciones de 0,5 %, 5 %, 10 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil”, Ayacucho 2019.	57
Anexo 14	Diámetro de halos de inhibición (mm) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil” y porcentaje de inhibición con control de nistatina frente a	

	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho-2019.	58
Anexo 15	Análisis de varianza de los halos de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil” y del control frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2019.	59
Anexo 16	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil” y del control frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2019.	60
Anexo 17	Análisis de varianza de porcentaje de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil” y del control frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2019.	61
Anexo 18	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de porcentaje de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. “toronjil” y del control frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2019.	62
Anexo 19	Matriz de consistencia.	63



## RESUMEN

La presente investigación tiene importancia teórica y social, ya que aportará al conocimiento científico sobre la existencia de plantas medicinales con propiedad antifúngica, las cuales podrían ser una alternativa de prevención y tratamiento de las patologías más frecuentes como la candidiasis. El presente trabajo de investigación de tipo experimental tuvo por objetivo determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil", desarrollándose en los laboratorios de Farmacia y Microbiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de setiembre de 2018 hasta enero de 2019. La muestra fue recolectada en la ciudad de Huanta del departamento de Ayacucho y la cepa de ensayo fue *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Galindo y la actividad antifúngica se determinó por el método Kirby - Bauer a las concentraciones de 0,5 %; 1 %; 3 %; 5 % y 10 %; asimismo la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida. El tamizaje fitoquímico reportó la presencia de taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, catequinas y esteroides/triterpenoides. A las concentraciones de 5 % y 10 % se obtuvo mayor halos de inhibición de 9,67 mm y 10,83 mm respectivamente; mientras que la Nistatina se obtuvo 17,83 mm. La CMI y la CMF fueron 0,391 mg/ml y 0,781 mg/ml respectivamente. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. presenta actividad antifúngica.

**Palabras clave.** *Melissa officinalis* L. *Candida albicans*, Actividad antifúngica.

## I. INTRODUCCIÓN

*Melissa officinalis* L. pertenece a la familia Lamiaceae, conocida comúnmente como toronjil, citronela, limonera, es natural del sur y centro de Europa<sup>1</sup>. Es una planta medicinal muy estudiada es usada como agente carminativo, estimulante, diurético, antirreumático y tiene actividad insecticida, antifúngica, antibacteriana frente a microorganismos patógenos<sup>2</sup>, sedante<sup>3</sup>, antiespasmódico, antidiarreica<sup>4</sup> y antiviral<sup>5</sup>.

*Melissa officinalis* L. tiene sus principales compuestos: los ácidos hydroxycinámicos (rosmarinico, p-coumarico, clorogénico) y los aceites esenciales, donde los mayores constituyentes son los terpenoides como el citral (mezcla de los isómeros neral y geranial), citronelal, geraniol, nerol y linalol. Otros compuestos de interés presentes en esta especie son flavonoides y taninos. Se reportan estudios sobre los componentes del aceite esencial: citral, acetato de linalilo, citronelal, acetato de geranilo, citronelol, entre otros<sup>6</sup>.

En este contexto dichas propiedades han motivado hacer el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de *Melissa officinalis* L. frente a levaduras gram positivas de *Candida albicans* ATCC 10231, el extracto tiene metabolitos secundarios, con diferentes propiedades biológicas, entre las que se encuentra la de impedir el desarrollo y multiplicación y las que destruyen a los microorganismos, empleando técnicas instrumentales sencillas.

La presente investigación de *Melissa officinalis* L. tiene importancia teórica y social, ya que aportará al conocimiento científico sobre la existencia de plantas medicinales con propiedad antifúngica, la cual podrían ser una alternativa de prevención y tratamiento de las patologías más frecuentes la candidiasis. De esta manera, se podrían elaborar fármacos naturales que en su composición contengan compuestos químicos propios de estas plantas, gracias a las bondades de la medicina tradicional, generando así una variedad de productos de uso farmacéutico de origen natural propios de nuestra biodiversidad, los

cuales tengan actividad antifúngica. Todo ello nos permite que las poblaciones de bajos recursos económicos puedan acceder a un menor costo a alternativas de tratamiento para el control de microorganismos relacionados con la candidiasis y mejorar su calidad de vida. Las metodologías validadas para ese fin figura en la literatura especializada, como es el método de Kirby-Bauer, diseñada para que los metabolitos o sustancias químicas en general difundan a través del agar e impidan el crecimiento microbiano, el mismo que se aplicará en el presente estudio, evaluando el extracto a concentraciones crecientes. Mientras para poder determinar exactamente las concentraciones a las cuales ejerce el efecto fungistático fungicida, el método de dilución en caldo es el más apropiado, realizándose diluciones sucesivas hasta inhibir la formación de turbidez que indica el crecimiento del microorganismo. *Candida albicans* ATCC 10231 es un importante patógeno fúngico en los humanos, tanto en términos de su importancia clínica como de su uso como un modelo experimental para la investigación científica. Por ello, para la presente investigación se plantea los siguientes objetivos.

#### **Objetivo general**

Determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

#### **Objetivo específico**

- Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas *Melissa officinalis* L. “toronjil”.
- Determinar la concentración que presenta mayor actividad antifúngica en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF), del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil”.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del estudio

#### Internacional

En el año 2018 Vélez *et al*<sup>65</sup>, estudiaron los metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil) en Ecuador. Las hojas fueron lavadas, secadas, molidas y extraídas por maceración con metanol. A cada extracto se le realizaron pruebas fitoquímicas y ensayos biológicos como: actividad antimicrobiana (antibiograma: difusión en agar) y letalidad con *Artemia salina*. Los extractos de *Cymbopogon citratus* y *Melissa officinalis* revelaron la presencia de esteroides insaturados, triterpenos pentacíclicos, fenilpropanoides y catequinas. Mientras que en el de *Melissa officinalis* se detectaron, además, cumarinas y metilcetonas. Los extractos de ambas especies (soluciones de 20 y 40 mg/L) mostraron actividad antibacteriana contra las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, a excepción de los extractos metanólicos de *Melissa officinalis* (20 mg/L) y *Cymbopogon citratus* (40 mg/L) que no exhibieron actividad frente a *E. coli*. La especie *Cymbopogon citratus* mostró el mayor efecto antibacteriano contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (halos de inhibición > 15mm). Se observó una actividad antifúngica alta del extracto de *Cymbopogon citratus*, y una actividad moderada del extracto de *Melissa officinalis*, contra la cepa del hongo *Candida albicans*. *Cymbopogon citratus* y *Melissa officinalis* mostraron una actividad letal significativa (CL50 <1000 µg/ml) frente a nauplios de *Artemia salina* a las 24 h de exposición: 358,03 y 72,25 µg/ml respectivamente. La especie *Melissa officinalis* presentó la mayor letalidad, considerado altamente tóxico según CYTED.

Centeno y Carrera<sup>1</sup>, en la Universidad de Oriente de Venezuela; realizaron la presente investigación para evaluar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica

del extracto de toronjil (*Melissa officinalis*) sobre *Aspergillus flavus*, el año 2013. Dónde obtuvieron el extracto de *Melissa officinalis* utilizando etanol al 80 %. Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica mostraron que los extractos produjeron en promedio halos de inhibición de 22 mm sobre el hongo ensayado. Así mismo, presentó una concentración mínima inhibitoria de 23,30 mg/mL. El extracto redujo las concentraciones de aflatoxinas de 5,15 y 45 µg/kg en un 96,60 %, 85,33 % y 84,71 %, respectivamente. En conclusión, los extractos de *Melissa officinalis* mostraron actividad antifúngica y antiaflatoxigénica sobre *Aspergillus flavus*, inhibiendo en gran parte su crecimiento y reduciendo significativamente las concentraciones de aflatoxinas.

En la Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, en Venezuela. Del Valle<sup>8</sup>, evaluó y comparó de acuerdo al rendimiento, composición química y actividad biológica, a los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* obtenidos mediante hidrodestilación y arrastre por vapor, en el año 2013. La actividad antifúngica a 10 µl/disc de los aceites esenciales fue evaluada frente a cepas de *Aspergillus flavus*, obteniéndose halos inhibitorios de 24,33 y 13 mm de diámetro para el aceite esencial obtenido por hidrodestilación y arrastre por vapor respectivamente. El aceite esencial de *R. officinalis* extraído por hidrodestilación, presenta una actividad contra *A. flavus* 53,43 % superior a la actividad fúngica exhibida por el aceite esencial extraídos mediante arastre de vapor.

En el año 2010, Stanojevic. *et al*<sup>7</sup>. En la Universidad de Kragujevac de Serbia. Investigaron la actividad antibacteriana de extractos de *Melissa officinalis* L en agua, en etanol y en acetato de etilo, para un uso potencial en la industria alimentaria y su acción sinérgica *in vitro* con los conservantes nitrito sódico, benzoato sódico y sorbato potásico sobre una selección de bacterias que dañan los alimentos. Se detectó una acción sinérgica en casi todas las combinaciones entre los extractos de las plantas y los conservantes. Este trabajo muestra que los componentes activos de los extractos en etanol, acetato de etilo y agua de *Melissa officinalis* L. Elevaron significativamente la eficacia de los conservantes analizados. El sinérgismo fue establecido a concentraciones de los extractos de plantas y de los conservantes correspondientes a 1/4 y 1/8 de los valores de concentración inhibitoria mínima, lo que indica que se puede evitar utilizar concentraciones más elevadas de estos conservantes.

En Cuba Sanchez *et al*<sup>6</sup>, realizaron un estudio denominado "Caracterización farmacognóstica de *Melissa officinalis* L.(toronjil). En el año 2010, dónde

evaluaron muestras procedentes de cultivo al sol y de sombra parcial, diferentes momentos para efectuar la cosecha y aplicaron 3 tipos de secado. Dónde se determinaron los índices numéricos según los valores obtenidos bajo la influencia de los factores evaluados. Según los resultados el cultivo al sol, cualquiera de los métodos de secado estudiados evidenciaron los valores más altos para obtener la droga con óptima calidad. Además se efectuó la caracterización del aceite esencial por cromatografía gases acoplada a espectrofotometría de masas y se realizó el seguimiento de este metabolito por cromatografía en capa delgada. En conclusión, los resultados obtenidos permitieron recopilar la información necesaria para establecer los valores para las especificaciones de calidad de la droga vegetal.

### **Nacional**

En la Universidad Católica los Angeles de Chimbote, García<sup>38</sup>, realizó un estudio denominado “Efecto antifúngico del extracto etanólico de *oreganum vulgare* (orégano) sobre *candida albicans* ATCC 10231, Trujillo – Perú el 2018”. El estudio comparó el efecto antifúngico de cuatro concentraciones de extracto etanólico de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, los extractos etanólicos de la planta se obtuvieron por el método de maceración adquiriendo concentraciones al 25 %, 50 %, 75 %, 100 %. Para evaluar la actividad antifúngica se utilizó el método Kirby-Bauer, dónde procedió a la activación de la cepa y la preparación del inóculo a una turbidez de 0,5 en la escala Mc Farland, la siembra se realizó en 10 placa Petri con el medio de cultivo Dextrosa Sabouraud a una temperatura de 37 °C para luego proceder a la colocación de discos estériles impregnados de las diferentes concentraciones de extracto etanólico al (25 %, 50 %, 75 %, 100 %) y Nistatina como control positivo; las concentraciones presentaron un promedio de halo de inhibición 9.9 mm, 17.9 mm, 20.7 mm, 22.9 mm. Se concluyó que el extracto etanólico de *Origanum vulgare* al 100 % presentó el mayor efecto antifúngico frente a cepas de *candida albicans* ATCC 10231.

En el año 2017, en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. Dentone y Morales<sup>9</sup>, Determinaron la actividad antimicótica *in vitro* del aceite de romero (*Rosmarinus Officinalis*) sobre *Microsporum canis*. El aceite de romero se obtuvo por el método de arrastre a vapor con una concentración del 100 % de pureza. Mediante el método de difusión en pocillo, se enfrentó la cepa de *Microsporum canis* a ocho concentraciones del aceite de romero (250, 500, 1000,

2000, 5000, 10 000, 50 000 y 100 000 ppm). Los resultados indicaron una adecuada sensibilidad de *Microsporum canis* a partir de la concentración de 50 000 ppm.

En Perú Gamarra<sup>37</sup>, realizó el estudio sobre el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Salvia Officinalis* (salvia) sobre *Candida Albicans* ATCC10231. En la Facultad Medicina Humana, Escuela Profesional de Estomatología, en la Universidad Alas Peruanas. Huacho - Peru el 2017. Un estudio experimental cuya muestra está conformada por 30 placas Petri, de las cuales 10 placas tratadas con Nistatina, 10 con extracto hidroalcohólico de hojas de *salvia officinalis* al 25 % y 10 con extracto hidroalcohólico de hojas de *salvia officinalis* al 50 %. Los resultados muestran que la dosis de Nistatina de 300 ug/ml muestra la formación de halos de inhibición de  $15 \pm 1,03$  mm, el extracto hidroalcohólico de hojas de *salvia officinalis* al 25 % muestra la formación de halos de inhibición de  $16 \pm 0,96$  mm y la concentración al 50 % forma halos de inhibición de  $25 \pm 2,02$  mm. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de hojas de *salvia officinalis* posee un efecto antifúngico sobre *candida albicans*.

En el año 2013 Maravi<sup>10</sup>, determinó el efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) mediante el método de difusión en agar con disco, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028 en Perú en la Universidad Wiener; Los aceites esenciales de dichas plantas se obtuvieron por el método de arrastre por vapor de agua. Para realizar el análisis microbiológico se utilizó el aceite esencial de menta al 50 y al 100 %, de orégano al 50 y al 100 % y de hierba luisa al 50 y al 90 %. Estos aceites esenciales fueron comparados con Nistatina como control positivo (para los hongos) y gluconato de clorhexidina al 0,12 % (para las bacterias). Al realizar las pruebas de sensibilidad in vitro se obtuvieron los siguientes resultados: de los tres aceites esenciales, el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el orégano. Frente a *Lactobacillus acidophilus* y a *Candida albicans* el mayor efecto lo tuvo la hierba luisa. El aceite esencial de orégano y hierba luisa tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos clorhexidina al 0,12 % y nistatina, a excepción de la *Mentha piperita* (menta) al 50 %, cuya acción fue menor que los controles positivos.

En Perú Cano, *et al*<sup>11</sup>, Demostrarón la actividad antimicótica *in vitro* y la elucidación de algunos de los metabolitos del aceite esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (muña). En el año 2008; en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El aceite esencial se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Mediante el método de agar en difusión se evaluó la inhibición del crecimiento fúngico de *Candida albicans* y también por el método de dilución en tubo para *Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagrophytes*, *Microsporun canis*. El aceite esencial de muña inhibió completamente el desarrollo de *Trichophytum tonsurasn*, *Trichophytum mentagrophytes* y *Microsporum canis* con ambos métodos de evaluación y dosis, para *Candida albicans* ATCC 10231 se logró un halo de inhibición de 30 mm para el aceite esencial al 100 % y de 35 mm al 50 %.

### **Local**

En el año 2016 Cordova<sup>40</sup>, determinó la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. En Ayacucho, 2015; la muestra fue recolectada de la provincia de Huanta. El método de extracción del aceite esencial fue por arrastre de vapor de agua y la cepa de referencia fue *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antimicótica se evaluó por el método de disco difusión de Kirby-Bauer. Se utilizaron discos de papel embebidos con el aceite esencial a 25 %, 50 %, 75 % y 100 % respectivamente y como control se utilizó disco de Nistatina. Los halos de inhibición fueron 0,90 cm; 2,30 cm; 3,63 cm y 4,10 cm y para la Nistatina 3,38 cm respectivamente. Asimismo, la Concentración Mínima Inhibitoria fue 0,055 mg/ml y la Concentración Mínima Fungicida fue 0,11 mg/ml. Se concluye que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" tiene actividad sobre *Candida albicans* ATCC 10231 y que el efecto es dependiente de la concentración.

En 2013 Mercado<sup>39</sup>, determina la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las flores de *Matricaria chamomilla* "manzanilla" frente a Dermatofitos. Ayacucho – 2013. En Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. En Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica. La actividad antifúngica se evaluó a concentraciones de 5%, 10%, y 20% del extracto etanólico de las flores de manzanilla, mediante el método difusión en agar, la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida por dilución en caldo. Las cepas de hongos con las que se trabajó fueron: *Trichophyton mentharophytes*, *Microsporum canis*,



*Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum* La concentración del 20% presentó mejor actividad antifúngica respecto a las demás concentraciones con halos de inhibición de *Trichophyton mentharophytes* 22,4mm; *Trichophyton rubrum* 17,9 mm; *Microsporum canis* 18,8 mm y *Trichophyton tonsurans* 18,1 mm respectivamente, ligeramente menor la Terbinafina que presentó 21 mm.

En el año 2013 Galindo<sup>17</sup>, realizó el estudio sobre la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "silka" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. En Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. En Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica en el 2013. La muestra de *Bidens pilosa* L. fue recolectada en las riberas del río Huatatas y la cepa de ensayo fue *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antifúngica se determinó por el método Kirby - Bauer a las concentraciones de 0,5 %; 1,0 %; 3,0 %; 5,0 % y 10,0 %; asimismo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida por el método de dilución en caldo. A las concentraciones de 5 % y 10 % se obtuvo halos de inhibición de 18 mm y 21,33 mm respectivamente; mientras que la nistatina obtuvo sólo 17,67 mm. La CMI y la CMF fueron 0,365 mg/ml y 0,730 mg/ml respectivamente. Se concluye que el extracto de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. tienen actividad antifúngica.

En el año 2013, Montes<sup>36</sup>, realizó la investigación denominado "Actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. wayra muña sobre una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231", en la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga en el año 2013. Para la determinación de la actividad antimicótica se utilizó el método de difusión con discos (Kirby-Bauer) referido a los halos de inhibición, realizando cinco concentraciones para cada prueba y tomando como control positivo la nistatina. Se realiza Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF). El aceite esencial mostró mayor halo de inhibición a la concentración del 10 %, en tanto que el extracto hidroalcohólico a 0,5 %, ambos halos resultaron ser menores que la nistatina. La CMI y la CMF para el aceite esencial fueron de 1,198 mg/ml y 2,396 mg/ml respectivamente; en tanto que para el extracto hidroalcohólico la CMI y la CMF fueron de 0,046 mg/ml y 0,093 mg/ml respectivamente. Por todo esto se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" posee mayor actividad

antimicótica sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 que el aceite esencial de dicha planta.

Espinoza<sup>14</sup>, en el año 2004, realizó una investigación denominada. “Efecto antiespasmódico en los extracto acuoso y hidroalcoholico de *Melissa officinalis* L.” a las dosis de 5 % y 15 % para ello se utilizó el método de Magnus de órganos aislados de cobayo (cuy). En la Universidad san cristobal de Huamanga, Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica. Donde los resultados del ensayo farmacológico indican que los extractos acuoso y alcohólico de *melissa officinalis* L. Presenta efecto antiespasmódico, debido a que disminuyeron de manera dosis dependiente la amplitud de las contracciones espontaneas del ileon aislado de cobayo y las inducidas por la acetil colina en forma similar a la atropina.

## **2.2. *Melissa officinalis* L**

### **2.2.1. Clasificación taxonómica**

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	: ASTERIDAE
ORDEN	: LAMIALES
FAMILIA	: LAMIACEAE
GÉNERO	: Melissa
ESPECIE	: <i>Melissa officinales</i> l.
N. V.	: “toronjil”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Humangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas; UNSCH-2017 (Anexo 1)

### **2.2.2. Descripción botánica**

El toronjil, también es conocido como toronjina, limonera, hoja de limón, verde-limón, melisa. *Melissa officinalis* L. es una planta herbácea, vivaz, de una altura variable entre 30-90cm. Sus tallos cuadrangulares son ramificados y derechos, las hojas son opuestas y ovales, cordiformes, pecioladas, suavemente dentadas, de color verde oscuro por el haz. El fruto es un tetraquenio, las hojas desprenden un olor agradable que recuerda al limón y un sabor cálido y amargo. Flores axilares, pequeñas, blancas con matices rosáceos. Florece en primavera y en verano<sup>12</sup>.

### **Hábitat**

La *Melissa officinalis* L. “toronjil” crece en lugares frescos y umbrosos, frecuentemente asilvestrada, prefiere el clima templada o templado cálido; teme las heladas y prefiere la exposición a mediodía, si es posible, a media sombra, en cuanto al suelo es mejor los de consistencia media, profundos, frescos, permeables, así como los de aluvión, fértiles y con buen drenaje<sup>12</sup>.

### **2.2.3. Composición química**

Aceite esencial: monoterpenos (citronelal, geranial, peral, citronelol, geraniol, nerol y beta ocimeno); sesquiterpenos (beta cariofileno, germacreno D).

Triterpenos: ácidos ursólico y oleanólico.

Flavonoides: luteolina, quercetina, apigenina y camferol.

Polifenoles: ácidos protocatéquico e hidroxicinámico, ác. cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico<sup>13</sup>.

### **2.2.4. Usos medicinales**

Las propiedades que se le atribuyen son las estimulantes y antiespasmódicas, sedantes, bradicárdicas, algo somníferas, estomáquicas, carminativas, diaforéticas, coleréticas, antivirales, germicidas, antioxidantes de alimentos. Por tanto se le emplea al toronjil para reanimar a los desmayos, apaciguar el corazón alterado, calmar los nervios, facilitar las digestiones difíciles en ciertos estados nerviosos, contra la histeria, vómitos de las embarazadas, menstruaciones difíciles<sup>14</sup>.

Su virtud principal es la de relajar y apaciguar los nervios. La infusión de hojas y flores se recomienda para aliviar los espasmos gástricos, dando calor a los estómagos fríos. También es útil para quitar las melancolías y angustias. Para las mordeduras de perros rabiosos, antiguamente en Tejeda (Gran Canaria), daban a beber un cocimiento hecho con vino y hojas de toronjil<sup>13</sup>.

### **2.3. *Candida albicans***

El género *Candida* contiene aproximadamente 200 especies, cifra que sigue en aumento gracias a los avances tecnológicos que afectan la taxonomía existente y ayudan al descubrimiento de nuevas especies. No obstante, menos de 20 especies han sido implicadas en infecciones clínicas, algunas con más frecuencia que otras (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*). Varias especies de *Candida* forman parte de la flora endógena y son comensales de las mucosas, del tracto digestivo y genitourinario del hombre, de la piel y las uñas. La colonización en piel y uñas es transitoria con predominio de las especies *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*<sup>15</sup>.

*Candida albicans* es conocida por ser un hongo oportunista en el entorno de cualquier tipo de organismo vivo, es un modulador de pH en el biofilm y no se considera como un cariogénico, pero uno de sus hábitats es la cavidad oral de los seres humanos, coloniza de manera asintomática diversas partes del cuerpo, específicamente los tractos gastrointestinal y genitourinario de personas sanas. Es un hongo comensal, sin embargo, en individuos inmunocomprometidos es un posible patógeno oportunista que es capaz de causar infecciones de las mucosas y sistémicas<sup>16</sup>.

### 2.3.1. Ubicación taxonómica

REINO	: FUNGI
DIVISIÓN	: MYCOTA
SUBDIVISIÓN	: DEUTEROMYCOTINA
CLASE	: DEUTEROMYCETES
SUBCLASE	: BLASTOMYCETIDAE
FAMILIA	: CTYPTOCACEAE
GÉNERO	: <i>Candida</i>
ESPECIE	: albicans
NOMBRE CIENTIFICO:	<i>Candida albicans</i>
SINONIMOS	: monilia, oidium <sup>17</sup> .

### 2.3.2. Morfología

Todas las especies del género *Candida* se desarrollan como células levaduriformes ovaladas (3 a 5 µm) que forman yemas o blastoconidias; producen también pseudohifas e hifas verdaderas. Por otra parte, *Candida albicans* genera tubos germinales y clamidoconidias terminales de pared gruesa<sup>17</sup>.

Los hongos levaduriformes dan lugar a colonias semejantes a las bacterianas, cremosas, opacas, en general de crecimiento relativamente rápido (24-72 horas). Los hongos filamentosos dan lugar a colonia de mayor tamaño (10-30mm), que crecen radialmente de modo progresivo, de aspecto inconfundible, vellosas, algodonosos o pulverulentas, de vistosos y variados colores, que deben ser observadas en el anverso y reverso, donde puede verse si el pigmento difunde al medio<sup>18</sup>.

### 2.3.3. Patogenia y patología

La candidiasis depende de las alteraciones primarias del huésped, así como de las propiedades patógenas del hongo, por lo cual las infecciones por *C. albicans*

son poco frecuentes en individuos sanos. La candidiasis se favorece por modificaciones de “terrenos” en el huésped, como: Terapéutica con antibióticos, corticoides, citotóxicos u hormonas sexuales (anticonceptivos); desequilibrios hormonales como embarazo, diabetes o insuficiencia tiroidea; enfermedades debilitantes como neoplasias, infecciones, inanición, SIDA; factores locales múltiples como prótesis dentarias mal ajustadas que ocasionan pérdida del espacio interdental; humedad, heridas y quemaduras; factores fisiológicos como embarazo, edad avanzada, lactancia, intervenciones quirúrgicas y otras medidas: cirugía, cateterismo, traqueotomía y etc. Los factores de virulencia expresados por las especies de *Candida* varían dependiendo del tipo, etapa y sitio de infección, y de la naturaleza de la respuesta inmune del hospedero<sup>19</sup>.

Patologías frecuentes en el hospedador inmunocompetente son: vulvovaginitis, candidiasis oral, conjuntivitis, dermatitis del área del pañal, paroniquias e intertrigo. En el sujeto inmunocomprometido es frecuente la esofagitis y se pueden presentar miocarditis, abscesos hepato-esplénicos, infecciones pulmonares, infecciones del sistema nervioso central (SNC), endoftalmitis e incluso formas crónicas de la enfermedad<sup>20</sup>.

#### **2.3.4. Epidemiología**

La candidiasis es un cosmopolita, sin tener una predilección en cuanto a edad y sexo: ataca por igual a todas las edades y a los dos sexos, siempre cuando se presentan los factores de oportunismo. La fuente de infección es el hombre mismo, aunque los animales también lo pueden tener como habitante normal; igualmente puede ser a partir de fomites. Se dice que la vía de entrada es endógena, es decir, que el individuo tiene el hongo en un sitio de su cuerpo, y de ahí invade otros tejidos cuando existe la oportunidad<sup>21</sup>.

#### **2.4. Antifúngico**

##### **a. Definición**

Antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped<sup>22</sup>.

##### **b. Clasificación**

La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (Tabla 1)<sup>22</sup>.

Tabla 1. Clasificación de los antifúngicos por su estructura<sup>22</sup>.

Polienos	Nistatina, natamicina, amfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol
	Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazole
	Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenos glicosilados
	Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

### C. Nistatina

La Nistatina es un miembro importante de un grupo relativamente grande y variado de antibióticos antifúngicos altamente insaturados que se aísla de cultivos de *Streptomyces noursei*. Por su estructura química y para diferenciarla de otros antibióticos con propiedades antifúngicas, se la incluye dentro del grupo denominado antibióticos antifúngicos de tipo poliénico. Este fármaco presenta tres formas polimórficas, denominadas Tipo A, Tipo B y Tipo C. Los polimorfos tipo A y B son los más comunes y pueden interconvertirse por efecto de condiciones ambientales. Su fórmula química es  $C_{46}H_{77}NO_{19}$ , se representa en la Figura 1<sup>23</sup>.

Es un antibiótico que por vía oral apenas se absorbe y que no debe administrarse por vía parenteral ya que por vía IM es muy irritante y por vía IV es muy tóxico. Por vía tópica es bien tolerada usándose en el tratamiento de las micosis superficiales, sobre todo en la candidiasis de piel y mucosas<sup>24</sup>.

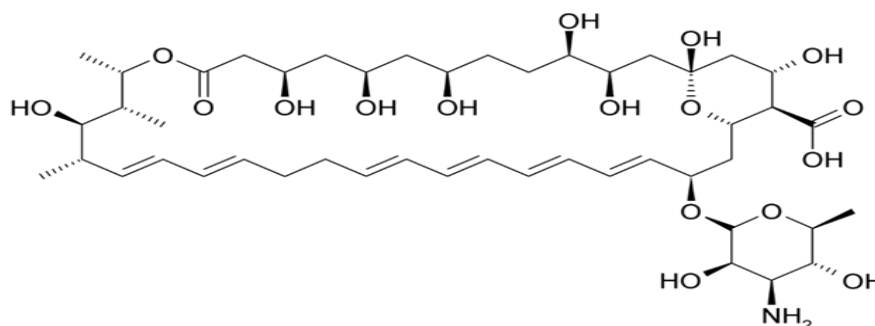


Figura 1. Estructura química de la nistatina<sup>23</sup>.

### C.1. Mecanismo de acción de Nistatina.

Como todos los polienos, la nistatina se une de manera irreversible a los esteroides presentes en las especies susceptibles de *Candida*. Las moléculas de polienos presentan mayor afinidad por los esteroides fúngicos, incluyendo el ergosterol, que por los esteroides humanos, lo que permite una toxicidad selectiva relativa<sup>25</sup>, como se muestra en la figura 2<sup>26</sup>. Esta unión irreversible altera la permeabilidad de la membrana y posibilita la salida de componentes intracelulares esenciales y, como consecuencia, la muerte celular. En bajas concentraciones la nistatina es fungistática, mientras que en concentraciones más elevadas tiene actividad fungicida<sup>25</sup>.

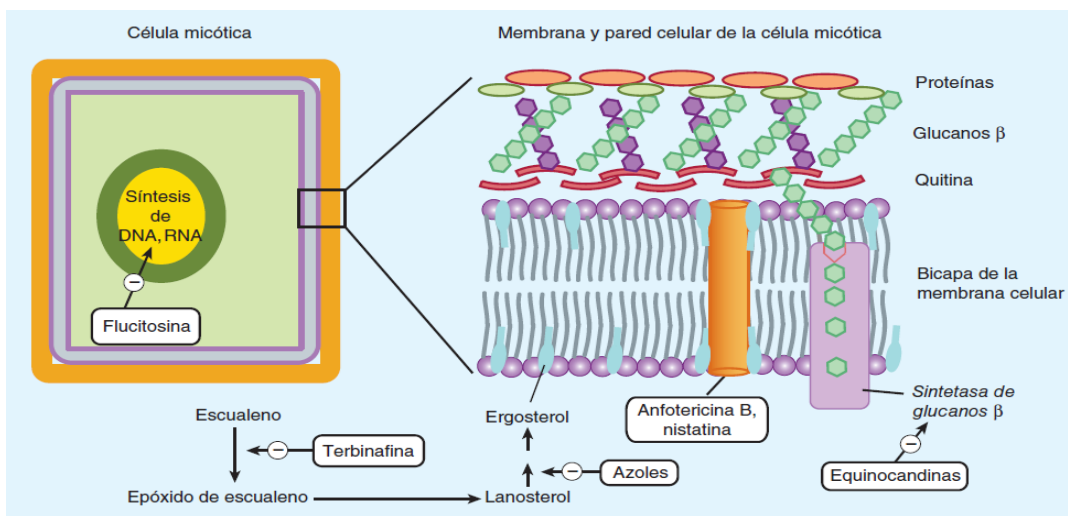


Figura 2. Mecanismo de acción fármacos antifúngicos<sup>26</sup>.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Tipo de investigación

Experimental

#### 3.2. Definición de la población y muestra

##### 3.2.1. Población

Hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” que crecen en el distrito de Huanta, provincia de Huanta, región Ayacucho. Ubicación a 2642 m.s.n.m

##### 3.2.2. Muestra

6 kg de hojas frescas de *Melissa officinalis* L. “toronjil”, recolectado en el distrito de Huanta, provincia de Huanta, región Ayacucho.

##### 3.2.3. El tipo de muestreo

No probabilístico, por conveniencia.

##### 3.2.4. Microorganismo de ensayo

Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 proporcionadas por el Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

#### 3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

##### 3.3.1. Recolección y procedimientos de la muestra

Las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” se recolectaron en horas de la mañana, luego se lavaron con abundante agua. La muestra se hizo secar a la sombra en un ambiente con buena ventilación y sobre papel Kraff para mantener sus propiedades químicas y farmacológicas por un periodo de 15 días<sup>27</sup>. Una muestra herborizada fue enviada al *Herbarium Huamangensis* de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su clasificación e identificación taxonómica.

##### 3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas

Se maceró 800 g de la muestra en etanol al 80 % en un frasco de color ámbar por dos semanas, cubriendo la muestra por encima de 4 cm, durante el proceso, se



agito el frasco periódicamente por 14 días. Se procedió al filtrado con un sistema al vacío y finalmente se concentró en un rotavapor hasta obtener un extracto seco<sup>17</sup>.

### **3.3.3. Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios**

Se realizaron las pruebas de: Baljet, Liberman - Burchard, espuma, cloruro férrico, Shinoda, Kedde, catequina, Dragendorf, Mayer, Wagner, Fehling y antocianidina, para la identificación cualitativa de los principales metabolitos secundarios, directamente sobre el extracto de la planta con reacciones simples específicas de coloración y precipitación<sup>28</sup>.

### **3.3.4. Determinación de la actividad antimicótica**

#### **3.3.4.1. Activación de *Candida albicans* ATCC 10231**

Para activar la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, se procedió a inocular en un tubo con 10 mL de caldo nutritivo e incubar a temperatura de 37 °C por 48 horas. Para utilizar la cepa se procedió a repicar en agar Sabourand contenido en tres viales, y se dejaron incubar a temperatura de 37 °C por 48 horas<sup>29</sup>.

#### **3.3.4.2. Preparación del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231.**

Se procedió a seleccionar las colonias de los viales, se tocó la colonia de *Candida albicans* ATCC 10231 con una asa de kolle esteril y el crecimiento se transfirió a un tubo con 4 a 5 mL de caldo nutritivo, se incubó a 37 °C por 48 horas. La turbidez del caldo se ajustó con el caldo nutritivo obteniéndose así un turbidez ópticamente similar al estándar de 0,5 de la escala de McFarland. Se realizó este paso visualmente, teniendo en cuenta la luz adecuada, comparando así el inóculo con el estándar de 0,5 de la escala de Mc Farland<sup>29</sup>.

#### **3.3.4.3. Determinación del halo de inhibición**

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido lo que se evidencia con la formación de halos de inhibición; de forma que cuanto más susceptibles sea el microorganismo frente a los tratamientos, más amplia sera la zona de crecimiento inhibido<sup>29</sup>.

#### **Procedimiento**

- En cada placa Petri se colocó 20 mL de agar Mueller Hinton.
- Se introdujo un hisopo estéril en el inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231, exprimiendo el exceso de caldo sobre la pared del tubo, luego se siembra en la placa en cuatro direcciones: horizontal, vertical, diagonal y en forma circular alrededor de la periferia.

- Se impregnaron los discos de papel Whatman, de 6 mm de diámetro, con el control positivo y las diferentes concentraciones del extracto.
- Posteriormente se deposita los discos sobre agar.
- Se incubó a 37 °C durante 48 horas.
- Transcurrido las 48 horas, se determinó el efecto antimicótico luego se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la muestra y el control positivo con una regla milimétrica<sup>29</sup>.

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de la muestra (mm)}}{\text{Diámetro del halo del control (mm)}} \times 100$$

### Diseño experimental

El diseño experimental que se emplea según el diseño de posprueba únicamente con un grupo control, además de los grupos experimentales y un grupo blanco.

$$G_e \quad X \quad O_e$$

$$G_b \quad - \quad O_b$$

$$G_c \quad X \quad O_c$$

Dónde:

G<sub>e</sub>: Grupo experimental.

G<sub>b</sub>: Grupo blanco.

G<sub>c</sub>: Grupo control.

X: Tratamiento con extracto.

O: Crecimiento fungicida (halos de inhibición).

Se utilizó un diseño totalmente randomizado por tratamiento con seis repeticiones para cada uno de ellos, los que fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- Grupo I: Control positivo tratado con Nistatina ó fluconazol.
- Grupo II: Tratado con extracto a 0,5 % de concentración.
- Grupo III: Tratado con extracto a 1, % de concentración.
- Grupo IV: Tratado con extracto a 3 % de concentración.
- Grupo V: Tratado con extracto a 5 % de concentración.
- Grupo VI: Tratado con extracto a 10 % de concentración.

#### 3.3.4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se define como la cantidad o la concentración mínima de un agente químico antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo<sup>31</sup>.

##### Procedimiento

Para hallar la CMI se prepararon 15 tubos previamente esterilizados y numerados del 1 al 15:

- A partir del tubo N°1 hasta el tubo N°15, se agregó 1 mL del caldo nutritivo.
- Posteriormente agregó 1 mL de las concentraciones de los extractos al tubo N°1, a partir del cual se traspasó 1 mL al tubo N°2 y así sucesivamente hasta el tubo N°14, del tubo N°14 se extrajo 1 mL y descarta. El tubo N°15 no recibe extracto, siendo este el control.
- Luego se agregó 1 ml del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 a todos los tubos y se llevó a incubación a 37 °C por 24 horas.

Tabla 2: Concentraciones decrecientes de las diluciones de los extractos de las hojas de *Melissa officinalis* L." toronjil" Ayacucho 2019.

Tubos	Extracto de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" (mg/mL)		
	0,5 %	5 %	10 %
1	2,500	25,000	50,000
2	1,250	12,500	25,000
3	0,625	6,250	12,500
4	0,313	3,150	6,250
5	0,156	1,563	3,150
6	0,078	0,781	1,563
7	0,039	0,391	0,781
8	0,020	0,195	0,391
9	0,010	0,098	0,195
10	0,005	0,049	0,098
11	0,002	0,024	0,049
12	0,001	0,012	0,024
13	0,0006	0,006	0,012
14	0,0003	0,003	0,006

#### **3.3.4.5. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)**

Se define como la concentración más baja de antimicótico que produce la muerte del 99,9 % del microorganismo probado y solo permite la supervivencia del 0,1 % del microorganismo en cultivo<sup>31</sup>.

#### **Procedimiento**

Para determinar la concentración mínima fungicida se determinará a partir de la concentración mínima inhibitoria, de la siguiente manera:

- Una vez observado la turbidez a simple vista, al determinar la CMI; se procede a sembrar con la ayuda del hisopo esteril, los caldos no turbios en las placas con agar Sabouraud.
- Posteriormente se incubó a 37 °C por 24 horas.

#### **3.4. Análisis de datos**

Los resultados se representaron en cuadros y se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Se empleó el programa estadístico SPSS. V22.



## **IV. RESULTADOS**



Tabla 3. Metabolitos secundarios analizados en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil " Ayacucho 2019.

<b>Metabolitos</b>	<b>Ensayos</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde intenso
Triterpenoides	Libermann	++	Coloración verde oscura
esteroides	Burchard		
Lactonas	Baljet	-	No hay precipitado rojo
Cumarinas			
Saponinas	Espuma	++	Formación de espuma
Glucósidos cardiotónicos	Kedde	-	No hay coloración violáceo
Catequinas	Catequinas	+++	Mancha verde carmelita a luz UV
Alcaloides	Mayer	-	No hay precipitado
Flavonoides	Shinoda	+++	Fase amilica de color marron
Flavonoides (secuencia c6-c3-c6)	Antocianidinas	+++	La fase amilica de color marron

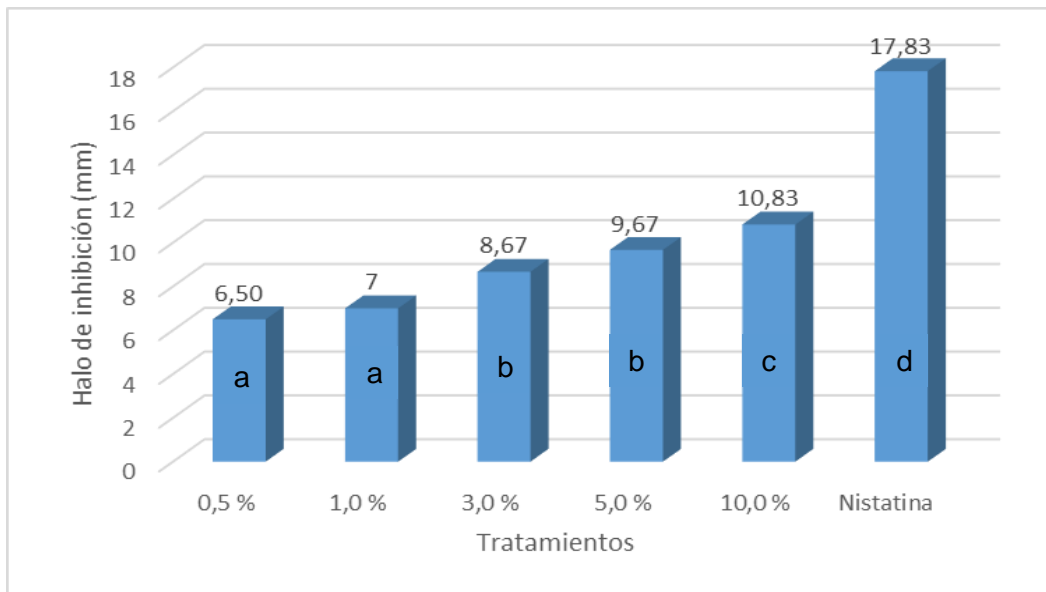
Leyenda :

(+) : Escasa / Leve

(++) : Regular

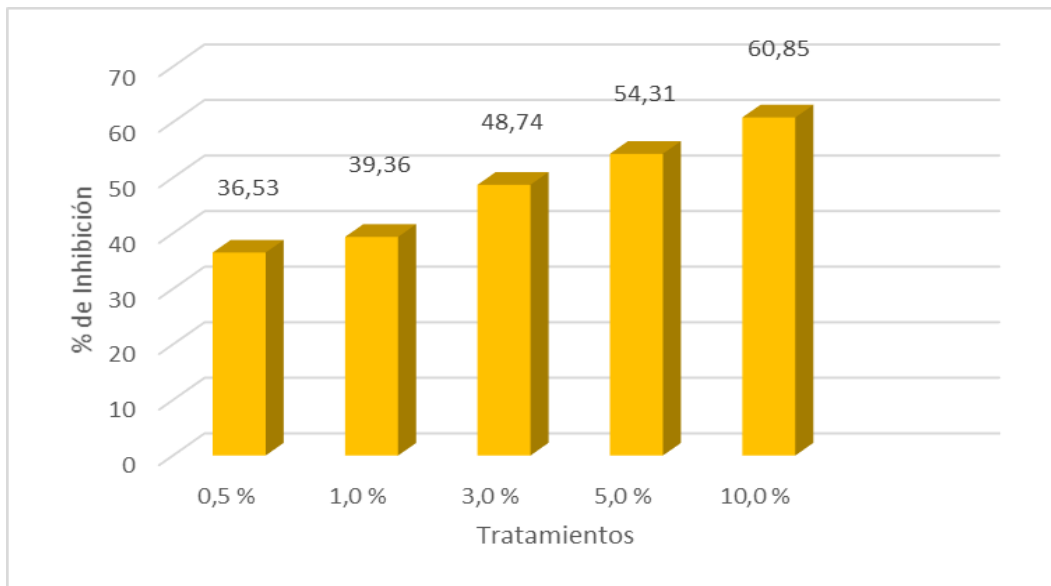
(+++): Abundante / Intenso





( ANOVA )  $p < 0,05$

Figura 3. Promedio de los halos de inhibición (mm) a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.



(ANOVA )  $p < 0,05$

Figura 4: Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida del extracto hidroalcohólica de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.

Tubos	Extracto de <i>Melissa officinalis</i> L. toronjil (mg/mL)					
	0,5 %		5 %		10 %	
1	2,500	S	25,000	S	50,000	S
2	1,250	S (CMF)	12,500	S	25,000	S
3	0,625	R (CMI)	6,250	S	12,500	S
4	0,315	R	3,125	S	6,250	S
5	0,156	R	1,563	S	3,125	S
6	0,078	R	0,781	S (CMF)	1,563	S
7	0,039	R	0,391	R (CMI)	0,781	S (CMF)
8	0,019	R	0,195	R	0,391	R (CMI)
9	0,010	R	0,098	R	0,195	R
10	0,005	R	0,049	R	0,098	R
11	0,002	R	0,024	R	0,049	R
12	0,001	R	0,012	R	0,024	R
13	0,0006	R	0,006	R	0,012	R
14	0,0003	R	0,003	R	0,006	R

Leyenda:

(S) : Sensible

(R) : Resistente

(CMI) : Concentración mínima inhibitoria

(CMF) : Concentración mínima fungicida

## V. DISCUSIÓN

En nuestro país desde periodo muy remotos y ancestrales, se han utilizado con fines terapéuticos las diversas plantas medicinales, que son cultivadas o silvestres en nuestro ámbito territorial, esto ha influido en el desarrollo de nuevos fármacos denominados fitofármacos los cuales contribuyen de manera satisfactoria en la curación de diferentes enfermedades.

En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional y, dentro de esta, la medicina herbolaria, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones. Pero, hay poco uso de medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; sus tratamientos están basados únicamente en fármacos sintéticos, incluso, en el tratamiento de problemas de salud diagnosticadas como enfermedades leves<sup>32</sup>.

En la presente investigación se buscó evidenciar de forma experimental la propiedad antimicótica de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Melissa officinales* L. "toronjil" a las concentraciones de 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 % y 10 %, todas estas concentraciones comparadas con un estándar de Nistatina, frente a una cepa patógena de *Candida albicans* ATCC 10231.

Para la elaboración del extracto de la planta se utilizó el método de maceración, en este caso particular se utilizó la metodología descrita por Galindo 2013. La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempo definidos<sup>34</sup>, se utiliza una extracción de etanol a 80 % al ser un solvente muy polar, tiene la capacidad de extraer en su gran mayoría los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Melissa officinales* L. "toronjil" (Anexo 3).

Para realizar el Screening fitoquímico del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Melissa officinalis* L., se utilizaron tubos de ensayo; en los que se colocaron el

extracto en estudio y gotas se dispensaron de los reactivos de coloración. Los resultados de la identificación cualitativamente de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinales* L. "toronjil" se reportan como presencia o ausencia del metabolito. En la Tabla 3 se muestra presencia de taninos, compuestos fenólicos (cloruro férrico), flavonoides (Shinoda) (antocianidinas), saponinas (espuma), catequinas (catequinas), esteroides/triterpenoides (Liebermann Burchard) y ausencia de lactonas/cumarinas (Baljet), glucosidos/cardiotónicos (Kedde), alcaloides (Mayer); nuestros hallazgos se corroboran en el tamizaje fitoquímico realizado por Buendía y Espinoza quienes reportan similares metabolitos en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinales* L. "toronjil".<sup>3,14</sup> Resultados que evidencian que estos metabolitos secundarios ya sea de manera independiente o posiblemente por el efecto sinérgico entre ellos, son los responsables de la actividad antifúngica a través de diferentes mecanismos. Además esta planta, está asociada con diversas actividades biológicas, como antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, leishmanicida, entre otras.<sup>1</sup>

La investigación emprendida utiliza como organismo de prueba *Candida albicans*, un patógeno fúngico oportunista para evaluar la actividad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. En la Figura 3 se observa que los extractos a concentraciones 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 % y el control Nistatina, muestran promedios de halos de inhibición de 6,50 mm, 7,00 mm, 8,67 mm, 9,67 mm y 10,83 mm respectivamente, siendo valores menores a la Nistatina que mostró 17,83 mm de halo de inhibición, donde se puede apreciar que todas las concentraciones mostraron inhibición frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 (anexo 10). Teniendo evidencia científica vigente sobre las propiedades antimicóticas del *Melissa officinalis* L., y en la presente investigación se demuestra la eficacia contra la cepa de *Candida albicans*, se pueden aprovechar para tratar enfermedades con infecciones micóticas.

Azuero *et al*<sup>33</sup>. evaluaron la actividad antimicótica, utilizando cepas de un hongo patógeno (*Candida albicans*) de origen clínico; evaluaron 12 plantas medicinales, los extractos de las especies estudiadas contra *C. albicans*, mostraron que todos tienen acción fungicida alta, a excepción de uno con un menor efecto inhibitorio del crecimiento fúngico; demostrando que *Melissa officinalis* tiene acción fungicida alta frente a la cepa *C. albicans* indicando así la eficacia de esta planta. Velez *et al*<sup>35</sup>. investigó las especies vegetales de *Cymbopogon citratus* (hierba

luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). Los extractos de ambas especies (soluciones de 20 y 40 mg/mL) mostraron actividad antibacteriana contra las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, a excepción de los extractos metanólicos de *M. officinalis* (20 mg/mL) y *C. citratus* (40 mg/mL) que no exhibieron actividad frente a *E. coli*. La especie *C. citratus* mostró el mayor efecto antibacteriano contra las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* (halos de inhibición > 15mm). Se observó una actividad antifúngica alta del extracto de *C. citratus*, y una actividad moderada del extracto de *M. officinalis*, contra la cepa del hongo *Candida albicans*. *C. citratus* y *M. officinalis* mostraron una actividad letal significativa (CL50).

El análisis de varianza (ANOVA) de los grupos calculados de 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 % y el control de Nistatina, nos indica que existe diferencia estadística significativa entre ellas ( $p < 0,05$ ) es decir que al menos un grupo experimental se diferencia de las demás, (Anexo 14), en efecto luego de realizar la prueba de comparaciones múltiples de HSD Tukey (Anexo 15).

Se realizó las pruebas de comparaciones múltiples de las medidas de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de hojas *Melissa officinales* "toronjil" con la prueba de HSD Tukey (anexo 15), basado en el grado de parecido existentes entre sus medias, a concentración de 0,5 % es estadísticamente similar ( $p = 0,659$ ) a la concentración de 1 %. Mientras la concentración de 3 % es estadísticamente similar ( $p = 0,052$ ) a la concentración de 5 %.

En la figura 4 nos muestra el porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinales* L. "toronjil" frente a *Candida albicans* ATCC 10231 donde el extracto hidroalcohólico al 0,5 % presenta un porcentaje de inhibición de 36,46 % y que a 1 %, 3 %, 5 % y 10 % de extracto hidroalcohólico presentaron porcentajes de 39,26 %, 48,63 %, 54,23 % y 60,74 % respectivamente, la figura indica que tanto los extractos hidroalcohólico de 5 % y 10 % presentaron los mejores resultados de inhibición, estos datos obtenidos en contraste con el grupo patrón la Nistatina. Los resultados mostrados provienen dependientemente del grupo control. También se puede apreciar donde todas las concentraciones mostraron un buen porcentaje de inhibición.

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de inhibición, nos indican que existe diferencia estadística significativa entre ellas ( $p < 0,05$ ) es decir que al menos un grupo experimental se diferencia de las demás, (Anexo 17), en efecto luego de realizar la prueba de comparaciones múltiples de HSD

Tukey (Anexo 18).

Se realizó las pruebas de comparaciones múltiples de las medidas de porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de hojas *Melissa officinales* “toronjil” con la prueba de HSD Tukey (anexo 15), a concentración de 0,5 % es estadísticamente similar ( $p=0,747$ ) a la concentración de 1 %, mientras la concentración de 3 % es estadísticamente similar ( $p=0,156$ ) a la concentración de 5 % y a su vez la concentración de 5 % es estadísticamente similar ( $p=0,068$ ) a la concentración de 10 %.

En la Tabla 4, podemos apreciar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinales* “toronjil” frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, la tabla muestra las tres concentraciones estudiadas 0,5 %, 5 % y 10 %, mostrando que concentración mínima fungicida (CMF) a la concentración de 0,5 % la dilución es de 1,250; y a las concentraciones de 5 % y 10 % las diluciones es 0,781; y donde la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la concentración 0,5 % la dilución es 0,625; y a las concentraciones de 5% y 10% las diluciones del extracto hidroalcohólico es de 0,391; estos resultados nos indican que el ensayo estudiados a diferentes concentraciones y diluciones presentaron en ambos casos concentración mínima fungicida y concentración mínima inhibitoria aceptable para el extracto hidroalcohólico de esta especie. Respectivamente determinando que estas concentraciones tienen efecto antimicótico, se sostiene que el tubo transparente que contenga la concentración de droga más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMI de la droga. Si los organismos no crecen en las placas señala decir que hay actividad fungicida. Esta concentración de la droga será fungicida. El tubo con la concentración fungicida más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMF de la droga (anexo 11 y 12).

Centeno y Carrera<sup>1</sup>, realizaron el estudio de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos contra el hongo *Aspergillus flavus*. El extracto hidroalcohólico de *Melissa officinalis* “toronjil” mostró que a concentración 0,58 % produjo en promedio halos de inhibición de 22 mm sobre el hongo *Aspergillus flavus*. Así mismo, presentó una concentración mínima inhibitoria de 23,30 mg/ml. El extracto redujo las concentraciones de aflatoxinas de 5, 15 y 45  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en un 96,60 %, 85,33 % y 84,71 %, respectivamente. Con este estudio confirmamos la sensibilidad de los hongos y actividad antifúngica con el extracto de *Melissa officinalis*.

De acuerdo con lo descrito por Galindo<sup>17</sup>, una cepa es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12,5 mg/mL, de mediana sensibilidad, entre 12,5 y 50 mg/ml y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 a 100 mg/ml. Según esta escala la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 presento alta sensibilidad frente al extracto hidroalcohólico se *Melissa officinales* “toronjil”.

En otras especies estudiadas *in vitro* que pertenecen a la familia lamiaceae como *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" el extracto a concentraciones de 10 %, 5 %, 3 %, 1 % y 0,5 % mostraron porcentaje de inhibición de 30,15 %, 34,40 %, 36,65 %, 54 % y 59,6 % respectivamente<sup>36</sup>, extracto hidroalcohólico de hojas de *Salvia officinalis* (salvia) al 25 % y 50 % de concentración muestra la formación de halos de inhiación de  $16 \pm 0,96$  mm y de  $25 \pm 2,02$  mm<sup>37</sup>, extracto etanólico de *Origanum vulgare* “oregano” a concentraciones al 25 %, 50 %, 75 % y 100 % las concentraciones presentaron un promedio de halo de inhibición 9,9mm, 17,9mm, 20,7mm, 22,9mm<sup>38</sup>, estas especies demostraron la actividad antifungica frente a *Candida albicans*, se puede decir que la familia lamiaceae tiene un rol importante al tener la actividadada antifungica.

Los resultados demuestran que los extractos hidroalcoholicos de las hojas de *Melissa officinales* “toronjil” a concentraciones de 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 % y 10 %, poseen efecto antimicótico frente a *Candida albicans* ATCC 10231 probado en el modelo *in vitro* por disco difusión. Y que a mayores concentraciones de los extractos presentan mejores concentraciones mínimas Fungicidas (CMF) y concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Por lo tanto el efecto antimicótico del extracto hidroalcohólico *Melissa officinales* “toronjil” queda comprobado de manera experimental.





## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinales* “toronjil” tiene actividad antifúngica frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinales* “toronjil” contiene: taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, catequinas y esteroides/triterpenoides.
3. El extracto hidroalcohólico al 5 % y 10 % presentaron mayor actividad antifúngica, respecto a los demás concentraciones, con halos de inhibición de 9,67 mm y 10,83 mm respectivamente; inferior a la Nistatina que presentó un halo de inhibición de 17,83 mm.
4. La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida fue 0,391 mg/ml y 0,781 mg/mL respectivamente frente a *Candida albicans* ATCC 10231.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la investigación sobre el estudio de *Melissa Ofcinalis L.* de las hojas de toronjil, con la finalidad de determinar si tiene actividad en otras especies de hongos y bacterias patógenas.
2. Aislar los compuestos activos que le confieren la actividad antimicótica de *Melissa Ofcinalis L.* de las hojas de toronjil, para un mejor estudio y elaborar una forma farmacéutica.
3. Estudiar otros partes de la planta de *Melissa Ofcinalis L.* “toronjil” con la finalidad de determinar si tiene actividad contra hongos y bacterias patógenas.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centeno S, Carrera Y. Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *Melissa officinalis* (Lamiaceae) sobre *Aspergillus flavus*. Rev. Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente Venezuela [revista en internet]. 2013 [citado 13 de julio de 2018] 25(2): 185-191. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4277/427739462008.pdf>
2. Acevedo D, Navarro M, Montero P. Composición Química del Aceite Esencial de las Hojas de Toronjil (*Melissa officinalis* L.). Colombia. Articulo Researchgate [Articulo en internet]. 2013 [Citada 13 de julio de 2018] 24(4): 49-54. Disponible en: [file:///C:/Users/algui/Downloads/Composicion\\_Quimica\\_del\\_Aceite\\_Esencial\\_de\\_las\\_Hoj.pdf](file:///C:/Users/algui/Downloads/Composicion_Quimica_del_Aceite_Esencial_de_las_Hoj.pdf)
3. Buendía J. Efecto sedante del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” MAS *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre la ansiedad inducida en ratones albinos. [tesis de pregrado]. Lima-Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
4. Céspedes A, De la Paz J, Sebazco C, Martínez M. Efectos de la tintura de *Melissa officinalis* L. sobre íleon aislado y en modelo de diarreas. Rev Cub Med. [revista en internet] 1996 [citado 16 de julio de 2018]; 25(1). Disponible en:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65571996000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65571996000100005)
5. Amin F, Oliva P. Estudio Comparativo entre Terapia con *Melissa officinalis* vs. Tratamiento Convencional con Aciclovir Tópico al 5% para Lesiones Herpéticas Tipo 1. Revista Int. J. Odontostomat. Chile [revista en internet] 2014 [citado 16 de julio de 2018]; 8(3):323-328. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-381X201400300002](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X201400300002)
6. Sánchez E, León M, Chávez D, Hechevarría I, Pino J. Caracterización farmacognóstica de *Melissa officinalis* L. (toronjil). Rev Cubana Plant Med. [Revista en internet] 2010 [Citado 16 de julio de 2018]; 15(4). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-4796201000040003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-4796201000040003)
7. Stanojevic D, Comic Lj, Stefanovic O, y Solujic S. *in vitro* synergistic antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. and some preservatives. Universidad de Kragujevac, Serbia [Revista en internet] 2010 [Citado 09 de

- setiembre del 2018]; 8(1): 109-115.disponible en:  
<http://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/1149>
8. Del Valle M. Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (*lamiaceae*) contra *Aspergillus flavus*. [Tesis de pregrado]. Cumana-venezuela. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre. Departamento de química. Escuela de Ciencias. 2013.
  9. Dentone S, Morales S. Determinación *in vitro* de la actividad antimicótica del aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporum canis*. Rev. investig. vet. Perú [Rev. en int]. 2017 [Cit. 17 de jul. de 2018]; 28(1). Disp. en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-9117201000100005](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-9117201000100005)
  10. Maravi G. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. [Tesis de pregrado]. Lima-Perú: Universidad Wiener. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Académica Profesional de Odontología; 2013.
  11. Cano C, Bonilla P, Roque M y Ruiz J. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Rev Perú Med [Rev en int]. 2008 [Cit 18 de jul de 2018]; 25(3): 298-301. Disp. en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/artrevista/pdf/prueba.2008.3.8.pdf>
  12. Font Quer, 1981;" Plantas medicinales" Edit. Labor S.A Barcelona-España.
  13. Cruz J. "Más de 100 Plantas Medicinales en Medicina Popular Canaria". Las Palmas. Obra Social de La Caja de Canarias. España 2007.
  14. Espinoza P. Efecto antiespasmodico de los extractos de *Melissa officinales* L. "toronjil". [Tesis de pregrado]. Ayacucho-Perú. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad Ciencias Biológicas. Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2004..
  15. De Bedout C, Gómez B. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. Colombia. Revista infectio [Revista en internet]. 2010 [Citado 19 de julio de 2018]; 14(S2): S159-S171. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a08.pdf>
  16. Cruz S, Díaz P, Mazón G, Arias D, Calderón M y Herrera A. Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas. Colombia. Revista salud uninorte [Revista en internet]. 2017 [Citado 19 de julio de 2018]; 33 (3): 438-450.

Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/817/81753881018.pdf>

17. Galindo I. Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bildens pilosa* L. "silkau" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. [Tesis de pregrado] Ayacucho-Perú. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad Ciencias Biológicas. Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2013.
18. Prats G. Microbiología clínica. 1ra ed. España: Editorial panamericana; 2005. Pag. 94.
19. Tapia M. Actividad antifúngica del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* "arrayán" Y de sus hongos endófitos frente a *Candida albicans* ATCC 18804. [Tesis de pregrado] Arequipa-Perú. Universidad Católica de Santa María. Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas; 2013.
20. De la Parte M, Mendoza M, Brito A. Identificación de especies de levaduras del género *Candida* provenientes de pacientes con vulvovaginitis. Venezuela. Artículo VITAE [Artículo en internet]. 2006 [Citado 19 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?va06014>
21. Romero R. Microbiología y parasitología humana. 3ra ed. Mexico: Medica panamericana; 2007. Pag. 1199.
22. Gregorí B. Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev Cubana Farm. [Revista en internet]. 2005 [citado 23 de julio de 2018]. 39(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000200012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012)
23. Lescano G, Pettigrosso R, Llabot J. Determinación de propiedades fisicoquímicas de Nistatina comercial empleando técnicas de caracterización de materiales. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. [Revista en internet]. 2014 [Citado 23 de julio de 2018]. 45(2);31-36. disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57932294004.pdf>
24. De Ahumada J, Santana M, Serrano J. Farmacología practica. 1ra ed. Madrid-España: Diaz de Santos; 2002. Pag. 278.
25. Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrist B, Paller A, Leffell D. Dermatología en medicina general. 7ma ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana; 2009. Pag. 2120.
26. Katzung B, Trevor A, Masters S. Farmacología básica y clínica. 11a ed. México; 2008. Pag. 837.



27. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid – España; Editorial Sintesis S.A; 1999
28. Lock O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales. 2da ed: Fondo Editorial de la PUCP. Lima-Perú 1994.
29. Lozina L, Boehringer S, Acosta O. Extrapolación en una forma posológica de valores obtenidos *in vitro* sobre actividad anti fungica del propoleo. Argentina. Universidad Nacional del Noreste Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas [revista en internet] 2005 [citado 19 de setiembre del 2018];V-018. Disp. en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-018.pdf>
30. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación, 4a edición, Barcelona España, Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. 2008. pp. 189 – 191.
31. Acharte D. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. “naranja” frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. [Tesis de pregrado] Ayacucho-Perú. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad Ciencias Biológicas. Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2010.
32. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de babahoyo, Ecuador. Revista anales de la facultad de medicina. [Revista en internet]. 2016 [Citado 2 de Julio de 2019]; 77 (4). Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832016000400002](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002)
33. Azuero A, Jaramillo C, San Martín D, D’Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI [Revista en internet]. 2016 [14 julio de 2019]; 9(20): 11-18. Disponible en: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-AnalisisDelEfectoAntimicrobianoDeDocePlantasMedici-5774769.pdf>
34. Sierra M, Barros R, Gómez D, Mejía A, Suarez D. PRODUCTOS NATURALES: METABOLITOS SECUNDARIOS Y ACEITES ESENCIALES. 1ª Ed. Editorial UNIAGRARIA. Fundación Universitaria Agraria de Colombia. Bogotá, Colombia-2018.
35. Vélez R, D’Armas H, Jaramillo C, Vélez E. Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)

- y *Melissa officinalis* (toronjil). Ecuador. Revista FACSALUD UNEMI [Revista en Internet]. 2018 [26 de Julio de 2019]; 2(2): 31-39. Disponible: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/727-2045-1-PB%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/727-2045-1-PB%20(3).pdf)
36. Montes E. Actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" sobre una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Facultad de Ciencias Biológicas. EFP Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho 2013.
  37. Gamarra R. Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Salvia Officinalis* (salvia) sobre *Candida Albicans* ATCC10231. Facultad Medicina Humana y Ciencia de la Salud. Escuela Profesional de Estomatología. Universidad Alas Peruanas. Huacho-Peru 2017.
  38. Garcia A. Efecto antifúngico del extracto etanólico de *origanum vulgare* (Orégano) sobre *candida albicans* ATCC 10231. Escuela Profesional de Odontología. Facultad de Ciencias de la Salud Universidad Católica los Angeles de Chimbote. Trujillo – 2018.
  39. Mercado D. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las flores de *Matricaria chamomilla* "manzanilla" frente a Dermatofitos. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho – 2013.
  40. Cordova H. Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "oregano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho - 2016.



## **ANEXOS**



## Anexo 1

Certificación e identificación taxonómica de *Melissa officinalis* L. Ayacucho 2017.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
"SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Marleni, PÉREZ PACHECO**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	LAMIALES
FAMILIA	:	LAMIACEAE
GENERO	:	Melissa
ESPECIE	:	<i>Melissa officinalis</i> L.
N.V.	:	"toronjil"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 11 de Setiembre del 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Blga. Laura Aucasiene Medina  
JEFE

## Anexo 2

### Certificación de *Candida albicans* ATCC 10231 Ayacucho 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

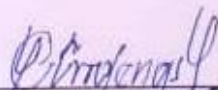
El Jefe del Laboratorio de Bacteriología, del Área Académica de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga;

### CERTIFICA:

Que se ha proporcionado la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 a la Srta. **Marleni PÉREZ PACHECO**, bachiller, egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica a fin de que desarrolle la tesis titulada: **Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil" frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.**

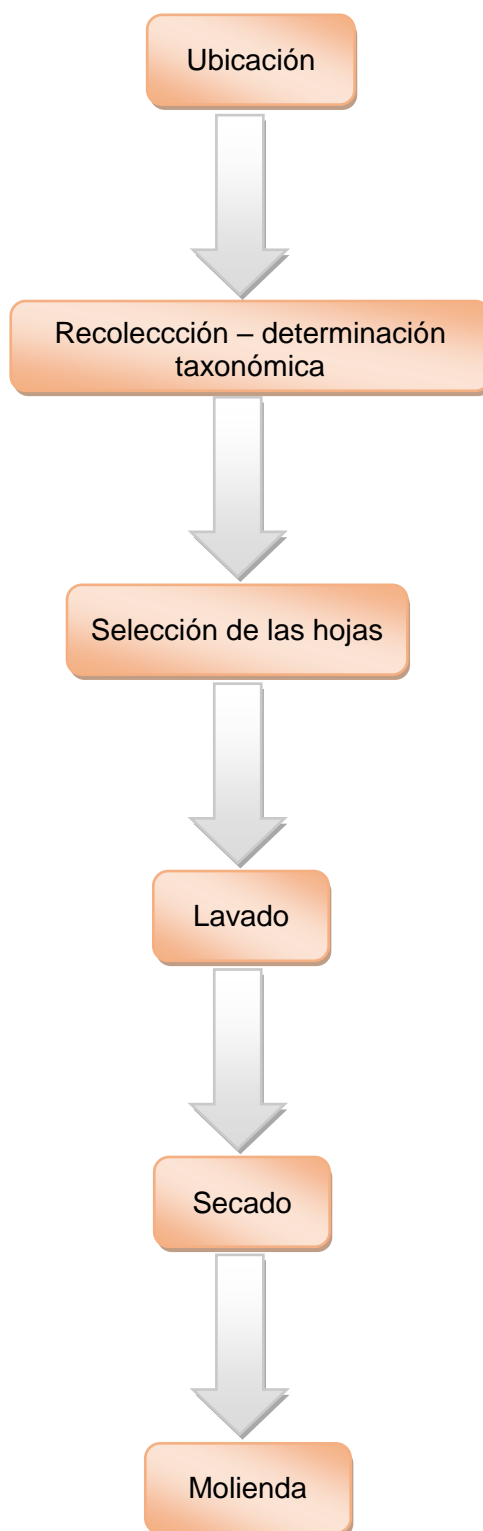
Se expide el presente certificado a solicitud de la interesada para los fines que crea conveniente.

Ayacucho, 15 de agosto de 2019

  
Dr. Víctor L. Cárdenas López  
Jefe del Laboratorio de Bacteriología  
Área Académica de Microbiología

### Anexo 3

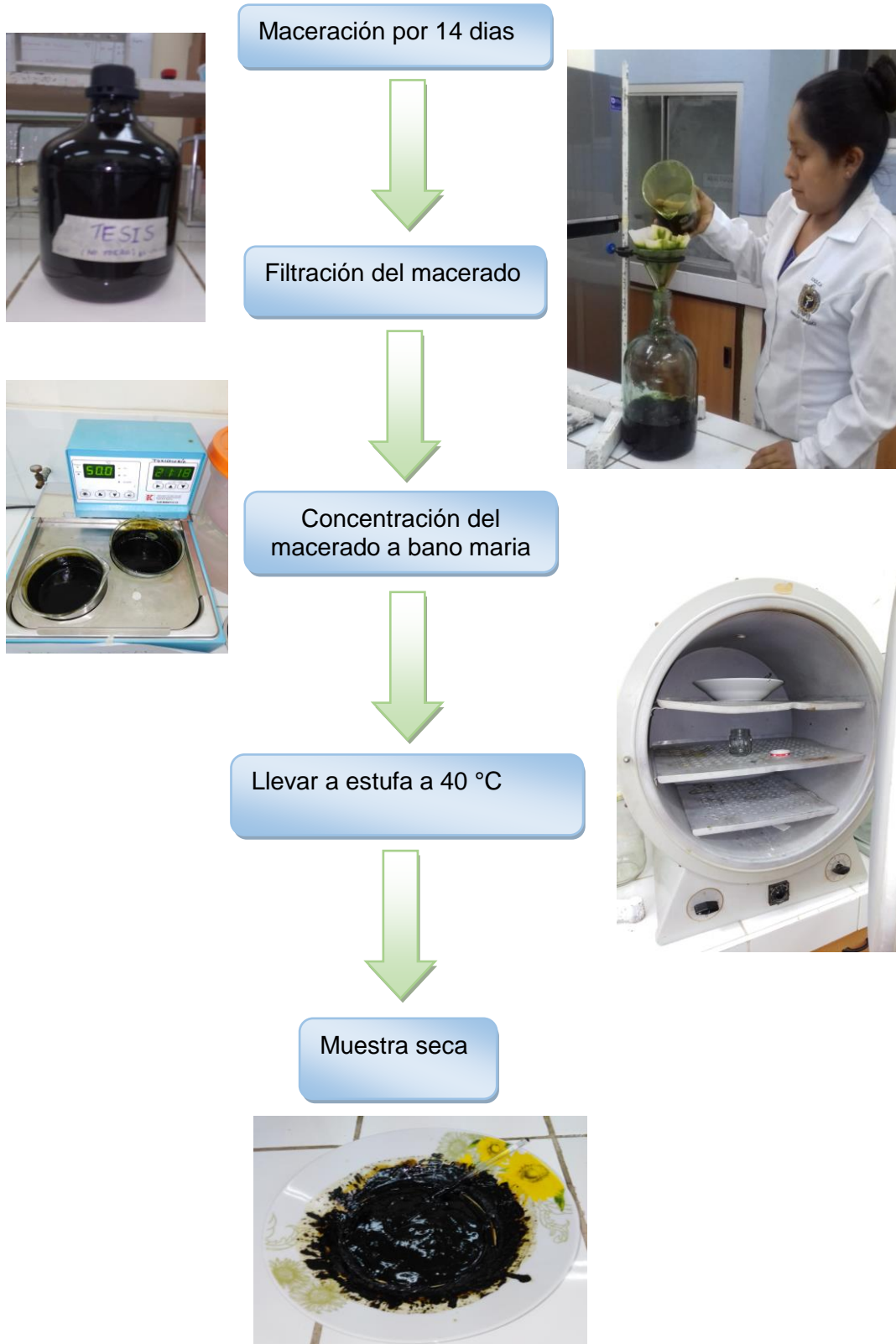
Flujograma del proceso de recolección y procedimiento de la muestra de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil", Ayacucho 2019.





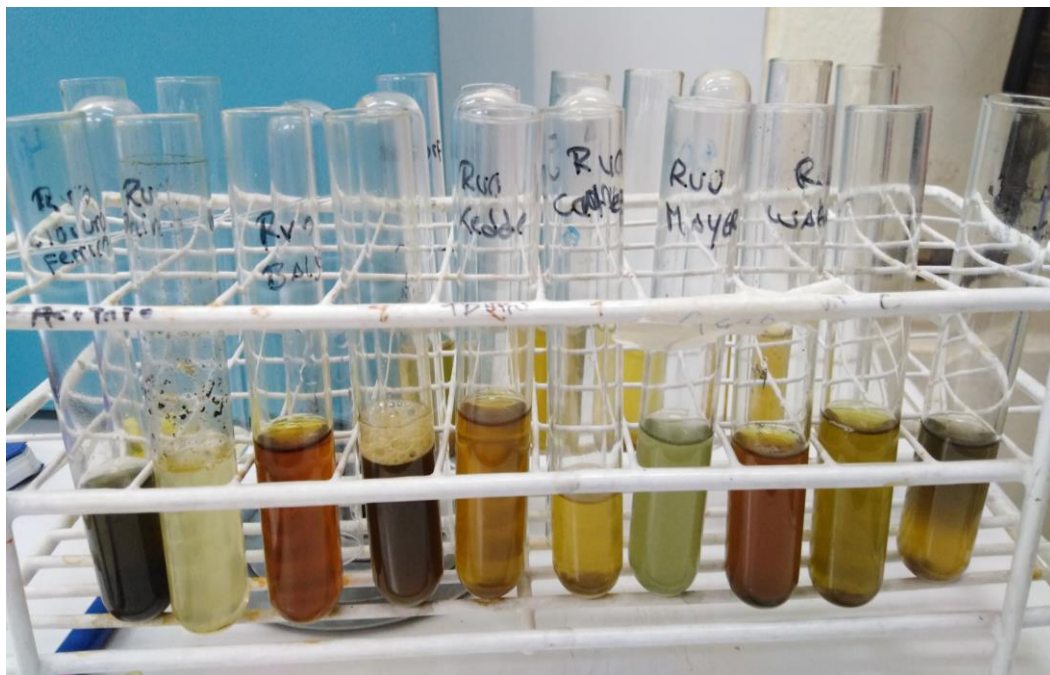
## Anexo 4

Flujograma de la preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil", Ayacucho 2019.



## Anexo 5

Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil", Ayacucho 2019.



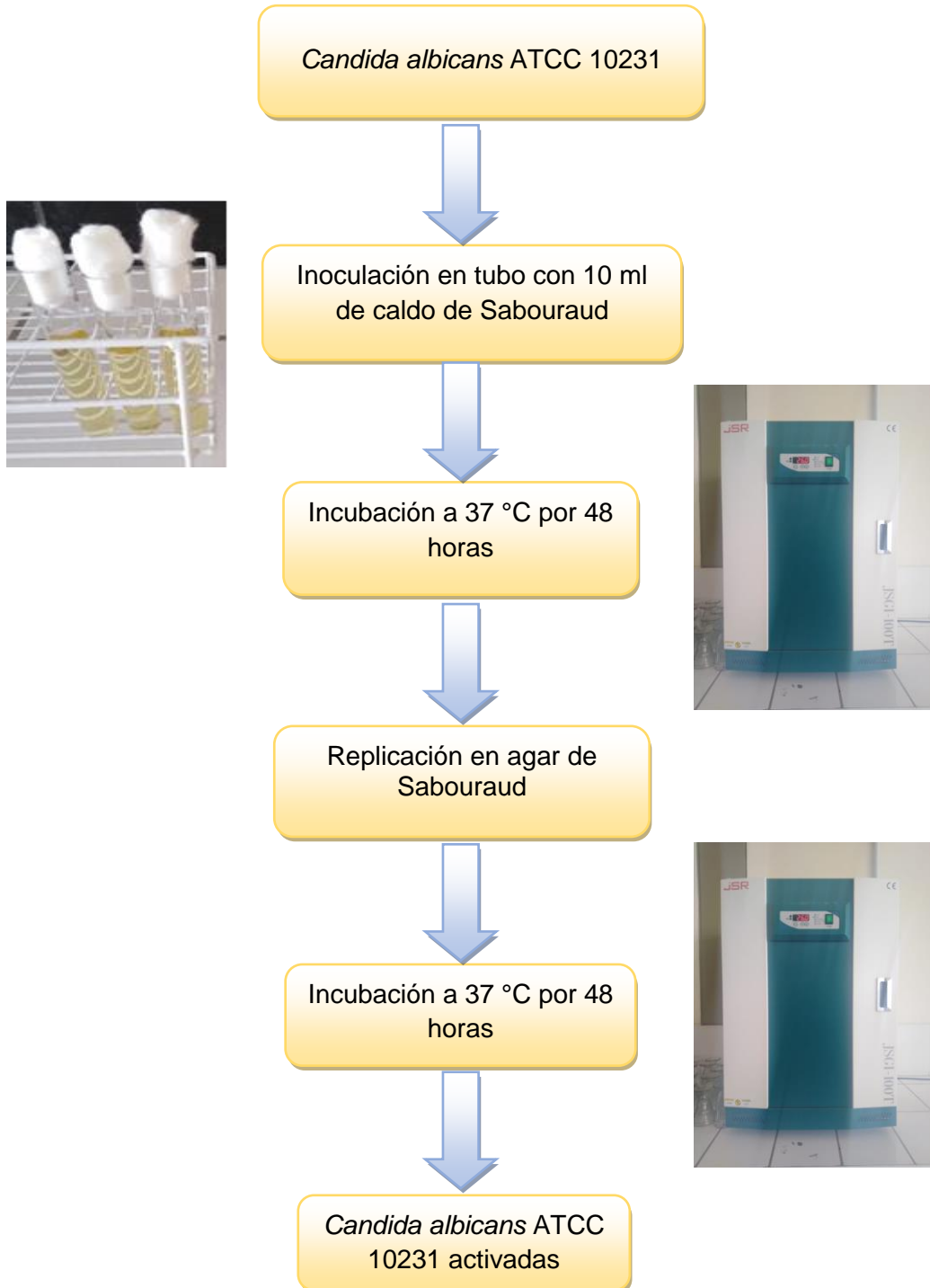
## Anexo 6

Concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L.  
"toronjil", Ayacucho 2019.



Anexo 7

Flujograma de la activación de *Candida albicans* ATCC 10231 Ayacucho 2019



Anexo 8

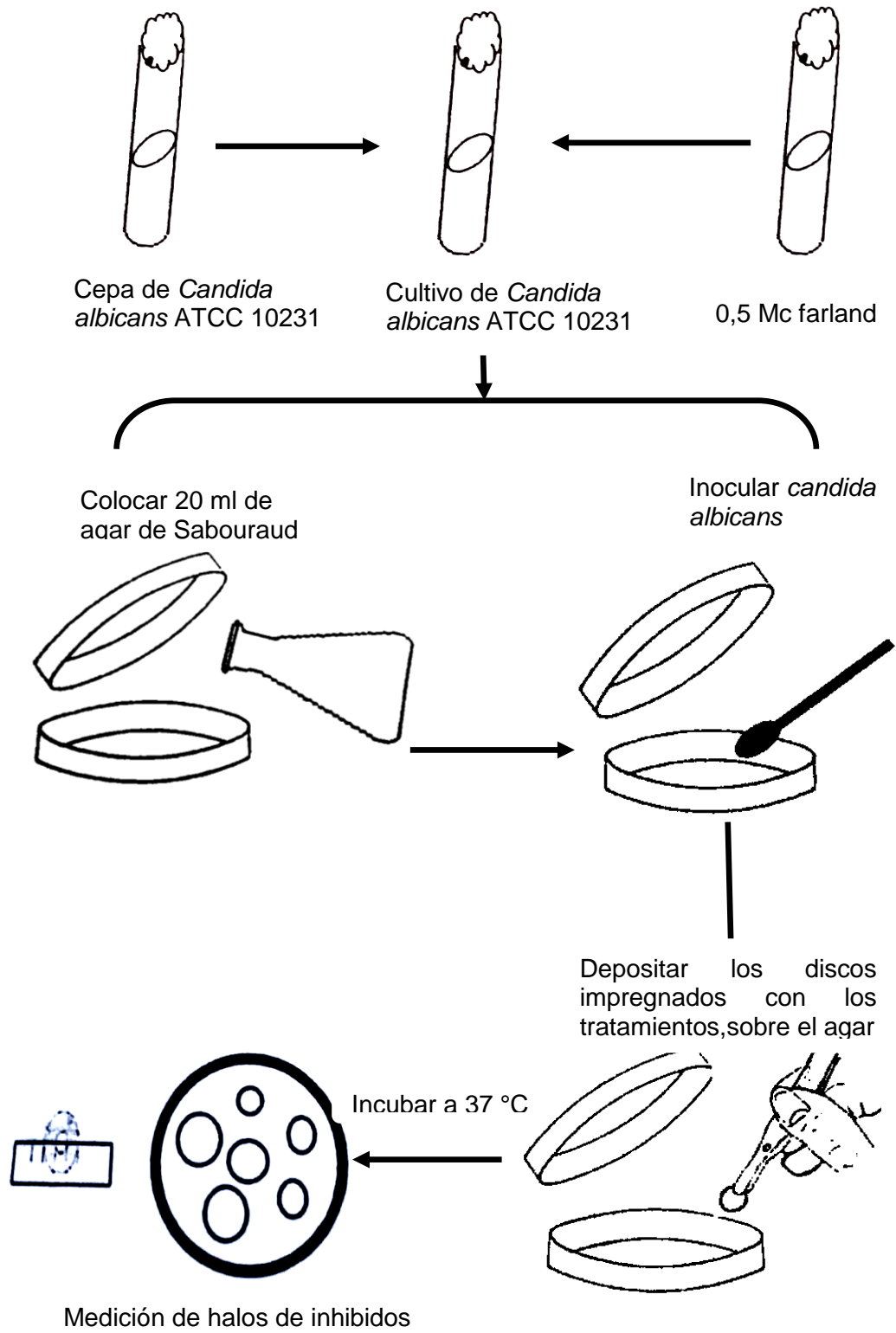
Nistatina 100000 UI/ML, de laboratorio Medifarma





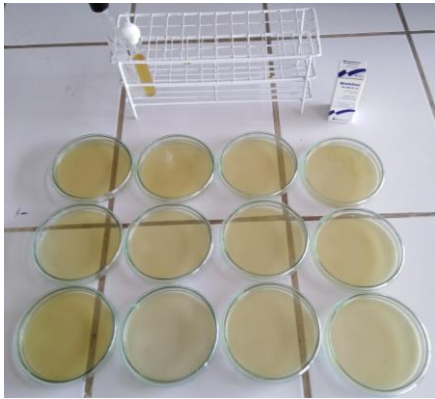
Anexo 9

Esquema de método de difusión por disco



Anexo 10

Proceso de aplicación de método de difusión por disco Ayacucho – 2019



Plaqueado agar de sabouraud



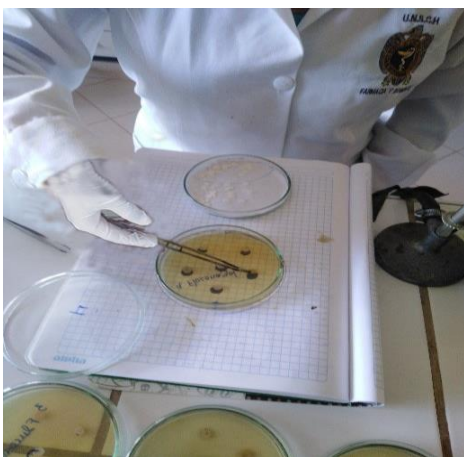
Impregnando *candida albicans*



Inoculando *candida albicans*



Impregnando los discos con los tratamientos



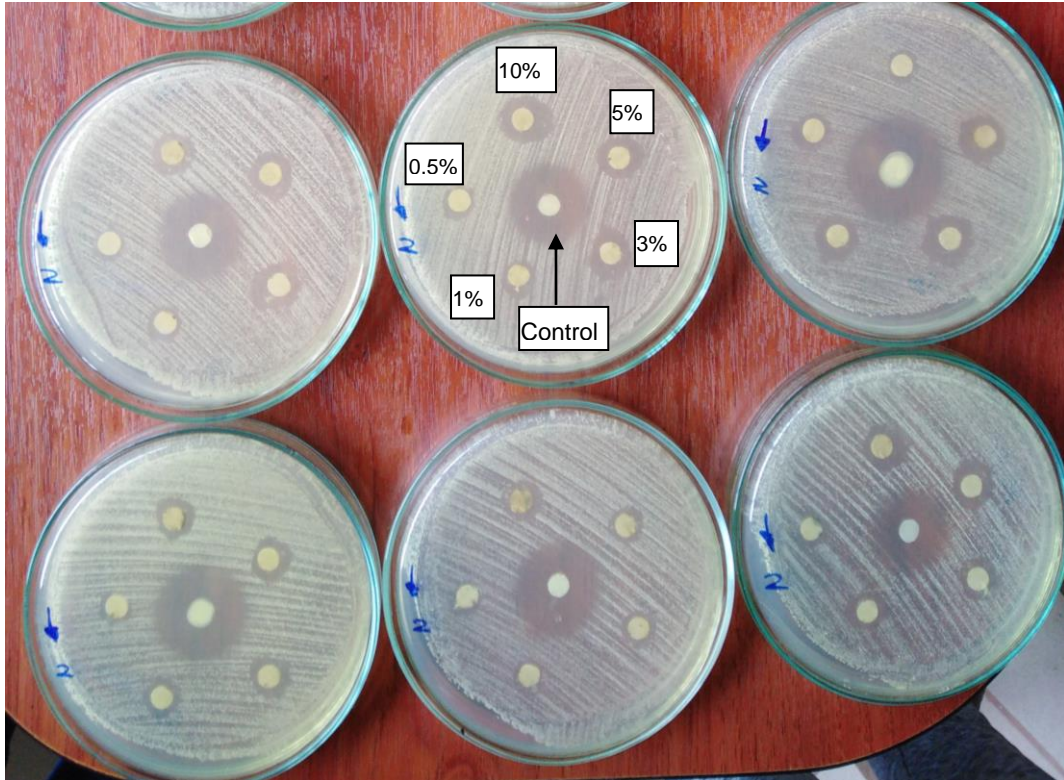
Colocando los discos



Incubación a 37 °C por 48 horas

### Anexo 11

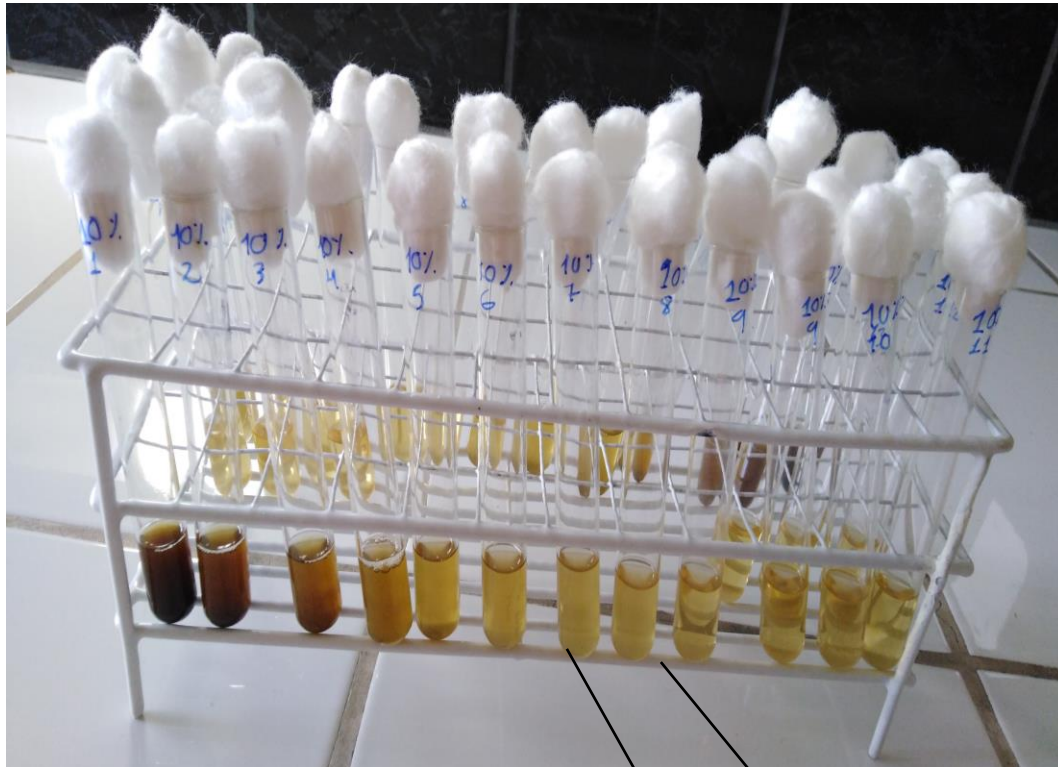
Halos de inhibición a concentraciones de 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil", Ayacucho 2019.





## Anexo 12

Tubos mostrando la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la hojas de de *Melissa officinalis* L. "toronjil" al 10 %, Ayacucho 2019.

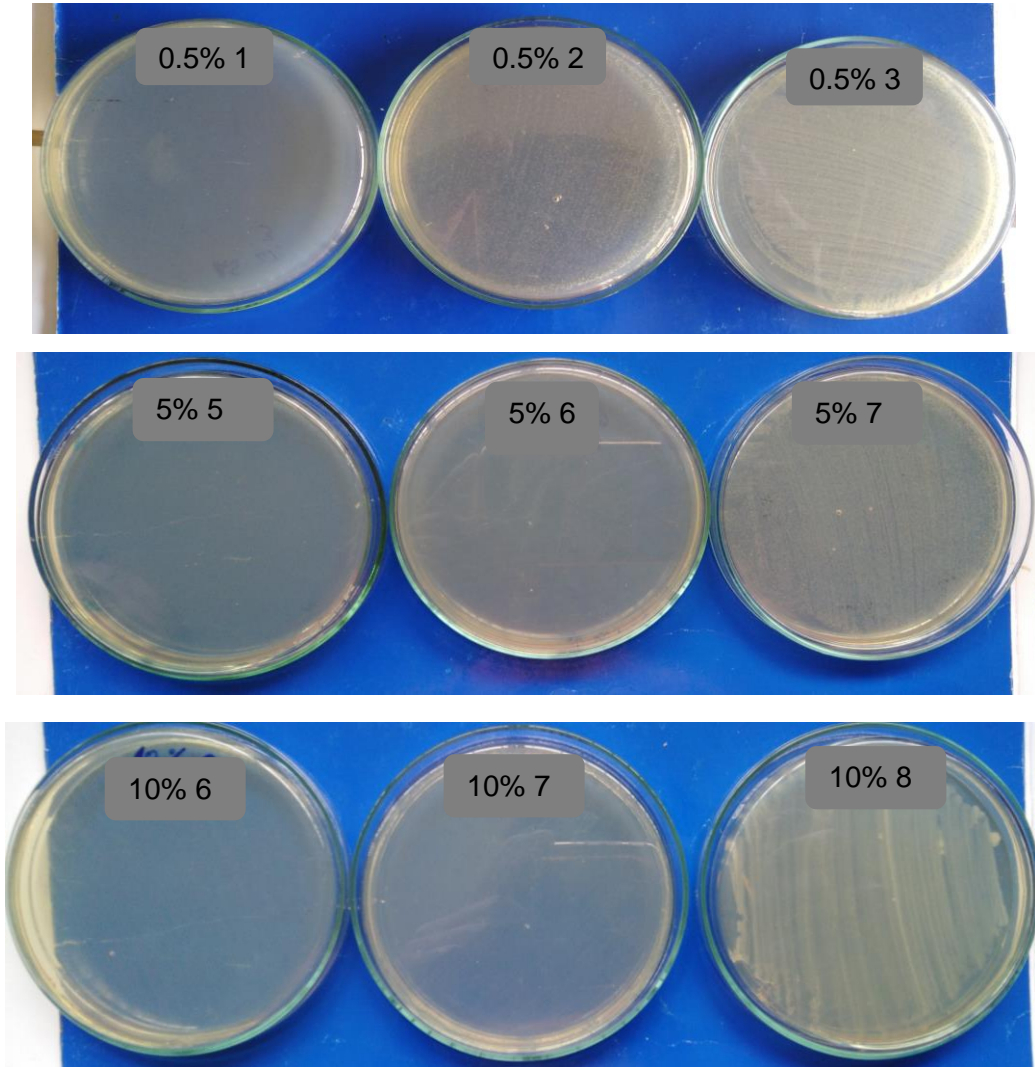


Concentración mínima  
inhibitoria

Concentración mínima  
fungicida

Anexo 13

Concentración mínima fungicida (CMF) de las concentraciones de 0,5 %, 5 %, 10 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil", Ayacucho 2019.



#### Anexo 14

Diámetro de halos de inhibición (mm) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil" y porcentaje de inhibición con control de nistatina frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho-2019.

Repitición	CONCENTRACIONES					CONTROL (Nistatina)
	0,5 %	1 %	3 %	5 %	10 %	
	Halos (mm)					
1	6	6	8	10	11	19
2	6	7	9	10	11	17
3	7	7	8	9	11	18
4	7	7	9	10	11	18
5	7	7	9	10	11	17
6	6	8	9	9	10	18

## Anexo 15

Análisis de varianza de los halos de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil" y del control frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.

### ANOVA de un factor

Halos

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	510,917	5	102,183	311,746	,000
Intra-grupos	9,833	30	,328		
Total	520,750	35			

Anexo 16

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. "toronjil" y del control frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.

**Halos de inhibición (mm)**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
0,5 %	6	6,50			
1 %	6	7,00			
3 %	6		8,67		
5 %	6		9,67		
10 %	6			10,83	
Nistatina	6				17,8333
Sig.		,659	,052	1,000	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

### Anexo 17

Análisis de varianza de porcentaje de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” y del control frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.

#### ANOVA de un factor

Porcentaje

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2469,930	4	617,482	37,447	,000
Intra-grupos	412,242	25	16,490		
Total	2882,172	29			

Anexo 18

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de porcentaje de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. “toronjil” y del control frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2019.

**Porcentaje de inhibición**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
0,5 %	6	36,5267		
1 %	6	39,3600		
3 %	6		48,7383	
5 %	6		54,3050	54,3050
10 %	6			60,8483
Sig.		,747	,156	,068

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

Anexo 19  
Matriz de consistenci

Titulo	Problema	Objetivo	Marco teórico	Hipótesis	Variable	Metodología
Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho 2019.	¿Cual será la Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	<p><b>General</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</li> </ul> <p><b>Específico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil".</li> <li>● Determinar la concentración que presenta mayor actividad antifúngica en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</li> <li>● Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y concentración Mínima Fungicida (CMF), en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil".</li> </ul>	<p><b>Melissa officinalis</b> L. "toronjil": Descripción botánica. Composición química. Usos.</p> <p><b>Candida albicans</b> Morfología Patogenia y patología Epidemiología</p> <p><b>Antifúngico</b> Definición Clasificación Nistatina Mecanismo de acción de nistatina</p>	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" tiene actividad antifúngica frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	<p><b>Variable independiente</b></p> <p>El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil"</p> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 0,5%</li> <li>● 1,0%</li> <li>● 3,0%</li> <li>● 5,0%</li> <li>● 10,0%</li> </ul> <p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Actividad antifungicá del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil"</p> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Halos de inhibición</li> <li>● Concentración Mínima Inhibitoria</li> <li>● Concentración Mínima Fungicida</li> </ul>	<p><b>Tipo de investigación</b></p> <p>Experimental</p> <p><b>Muestra biológica</b></p> <p>Seis kg de hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. "toronjil" recolectada en provincia de Huanta, departamento Ayacucho.</p> <p><b>Microorganismo de ensayo</b></p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p><b>Métodos instrumentales para la recolección de datos</b></p> <p>Pruebas cualitativas de los metabolitos secundarios. segun : Lock de Ugaz O. Determinación de la actividad antifungica:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Mayor actividad antifunjica</li> <li>● Concentración mínima inhibitoria, Concentración Mínima Fungicida</li> </ul> <p><b>Análisis de datos</b></p> <p>Los resultados se procesaran en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Se empleara el programa estadístico SPSS. V22..</p>



