



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



## **Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional**

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de Informe final de tesis es:

**Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***

Presentado por:

**CCAHUANA GONZALES, DOLLY MARLENE**

De la Facultad de FARMACIA Y BIOQUÍMICA. El resultado obtenido es 7% por el cual se otorga el calificativo de:

**APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.**

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Ica, 25 de Abril de 2024

.....  
Dra. JOSEFA BERTHA PARI OLARTE  
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN  
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas  
de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia*  
*coli*

Línea de investigación  
Salud Pública y conservación del Medio Ambiente

## INFORME FINAL DE TESIS

AUTORA:

BACH. CCAHUANA GONZALES, DOLLY MARLENE

Ica, Perú

2023

## **DEDICATORIA**

A mi familia por el apoyo incondicional que me  
brindaron durante toda mi carrera profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Todopoderoso por acompañarme en todo momento.

A mi familia por haberme impulsado a culminar mi carrera.

A todos mis docentes por sus enseñanzas impartidas.

## ÍNDICE

	Página
Portada	
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice	iv
Índice de contenido	v
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. Introducción	9
II. Estrategia metodológica	17
III. Resultados	22
IV. Discusión	31
V. Conclusiones	32
VI. Recomendaciones	33
VII. Fuente de información	34
VIII. Anexos	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	22
Tabla 2	Análisis de varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	24
Tabla 3	Análisis de homogeneidad: TUKEY para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	25
Tabla 4	Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Escherichia coli</i> .	26
Tabla 5	Análisis de varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Escherichia coli</i> .	28
Tabla 6	Análisis de homogeneidad: TUKEY para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Escherichia coli</i> .	29
Tabla 7	Porcentaje de inhibición relativa (PIR) del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Bixa Orellana</i> (L).	13
Figura 2	Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	23
Figura 3	Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de hojas las de <i>Bixa orellana</i> (L) a diferentes concentraciones frente a <i>Escherichia coli</i> .	27

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como **objetivo:** Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

**Metodología:** Se realizó mediante el método de difusión en disco (Método de Kirby Bauer). El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) se obtuvo mediante la técnica de maceración por 48 horas. **Resultados:** el análisis estadístico por medio de la prueba ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,000 ( $p < 0.05$ ), por lo que se concluye que, existe diferencia significativa entre los diámetros promedio de los halos de inhibición, revelados por la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a las cepas estudiadas. El análisis de TUKEY reveló que la cepa de *Escherichia coli* presentó mayor susceptibilidad (20 mm) frente al extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) al 100% a diferencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* con menor susceptibilidad (15 mm).

El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) al 100% mostró efecto inhibitorio moderadamente activo sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

**Palabras claves:** antibacteriano, extractos, bacterias patógenas.

## ABSTRACT

The objective of this study was to: Determine the in vitro antibacterial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Bixa orellana* (L) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Methodology: It was carried out using the disk diffusion method (Kirby Bauer Method). The ethanolic extract of the leaves of *Bixa orellana* (L) was obtained through the maceration technique for 48 hours. Results: the statistical analysis using the ANOVA test (Analysis of Variance) shows a significance level of 0.000 ( $p < 0.05$ ), therefore it is concluded that there is a significant difference between the average diameters of the inhibition zones revealed. by the antibacterial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Bixa orellana* (L) at different concentrations against the strains studied. The TUKEY analysis revealed that the *Escherichia coli* strains presented greater susceptibility (20 mm) against the ethanolic extract of the 100% *Bixa orellana* (L) leaves unlike the *Staphylococcus aureus* bacteria with lower susceptibility (15 mm).

The 100% ethanolic extract of *Bixa orellana* (L) leaves showed a moderately active inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains.

Keywords: antibacterial, extracts, pathogenic bacteria.

## I. INTRODUCCIÓN

El uso irracional de los antibióticos conlleva a una serie de consecuencias graves como el generar otras enfermedades, la demora en su diagnóstico, así como la presencia de efectos adversos y el incremento de la resistencia bacteriana. A nivel mundial, el tratamiento farmacológico se torna ineficaz paulatinamente, lo cual representa un grave problema de salud pública, lo que motiva a tomar medidas de prevención con respecto a la medicina convencional<sup>1</sup>.

A la fecha, se han reportado alrededor de 50.000 especies de plantas que tienen algún uso medicinal, correspondientes aproximadamente a un 10% de todas las que existen en el mundo. Aunque su uso nunca ha dejado de estar vigente, el avance de la ciencia y la tecnología ayudó a que los principios activos contenidos en esas plantas sean sintetizados químicamente, haciéndolos disponibles en las farmacias a precios accesibles y en dosis adecuadas para cada tratamiento. Sin embargo, cada vez es más común la preocupación por los efectos secundarios de los medicamentos químicos y la ineficacia de algunos de ellos para su uso a largo plazo<sup>2</sup>.

Debido a lo antes mencionado, es que en los últimos años se tiene una creciente atención sobre el empleo de alternativas naturales o terapias complementarias<sup>2</sup>. Por ello y ante el incremento de la resistencia adquirida por los microorganismos, se hace aún más válido el realizar métodos o investigaciones experimentales en especies vegetales con la finalidad de hallar aquellas (cuyos principios activos) sean de utilidad y puedan ser empleados en tratamientos antimicrobianos para combatir a bacterias multirresistentes<sup>3</sup>.

Teniendo en cuenta que la población en el mundo utiliza las plantas como tratamiento alternativo de medicamentos frente a las enfermedades, la Asamblea Mundial de la Salud y la OMS le confiere la debida importancia a los medicamentos botánicos a través del proyecto “Salud y Medicina Tradicional<sup>1</sup>”.

En la actualidad, las investigaciones se centran en terapias alternas mediante la utilización de extractos microbianos, plantas, aceites esenciales, metabolitos secundarios y nuevas moléculas sintetizadas como agentes antimicrobianos potenciales<sup>3</sup>.

La OMS calcula que más del 80% de la población en el planeta usa extractos de plantas o sus ingredientes activos para sus requerimientos de atención primaria de la salud<sup>1</sup>, debido a ello se considera que se debe emplear las plantas con fines terapéuticos siempre y cuando éstas tengan un sustento científico<sup>4</sup>.

Tomando en cuenta lo referido, el presente trabajo de investigación está dirigido a determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que confirman y explican las propiedades de la *Bixa Orellana* (L).

El presente estudio consta de 8 capítulos, el capítulo I refiere a la introducción y contiene los siguientes aspectos: Descripción de la realidad problemática, antecedentes de la investigación, justificación de la investigación, objetivos del presente estudio. El capítulo II refiere a la metodología considerada en el presente estudio. El capítulo III refiere los resultados obtenidos en el presente estudio. El capítulo IV discusión que contiene sus análisis correspondientes. El capítulo V conclusión. El capítulo VI recomendación. El capítulo VII bibliografía y el capítulo VIII anexos.

## 1.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.1.1 Antecedentes Internacionales

**Velasco W, Pabón L, Hernandez P. (2021).** Potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a bacterias asociadas con conjuntivitis. Objetivo. Determinar el potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a bacterias asociadas con conjuntivitis. Metodologías. Se empleó las técnicas de difusión en disco y dilución en tubo. Resultados. El extracto con mayor potencial para *S. aureus* fue el de achiote (hojas) con un halo de inhibición de 13 mm y CMI (concentración mínima inhibitoria) de 15 mg/mL. El extracto de achiote y ciprofloxacina mostró un efecto de sinergia parcial para *S. aureus* con una CFI de 0,83 y un efecto aditivo para *S. epidermidis* con una CFI de 1,84<sup>5</sup>.

**Aguilar D. (2019).** Determinación de actividades biológicas y tamiz fitoquímico de *Bixa orellana* L de la Península de Yucatán. El objetivo fue determinar las actividades biológicas (actividad antioxidante, antimicrobiana y antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas) y perfil fitoquímico de *Bixa orellana* L. Metodología: Se realizó reacciones cualitativas Resultado: Se encontró saponinas, terpenos, quinonas y cumarinas. Actividad antibacteriana: Se observó que poseen mayor efecto sobre *E. coli* y menor actividad en todos los casos sobre *S. aureus* <sup>6</sup>.

**Aguilar D. (2019).** Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de achiote (*Bixa orellana*) sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Objetivo: Determinar el efecto inhibitorio del extracto de achiote (*Bixa orellana*) a diferentes concentraciones (50%, 100%) sobre cepas de *Streptococcus mutans* por medio de un estudio in vitro. Metodología: Se empleó una regla milimetrada para realizar la medición de halos de inhibición empleando una regla milimetrada. Resultados: A una concentración al 100% presenta un halo de inhibición máximo de 9,4 mm; la clorhexidina presenta un registro máximo de 12,50 mm y con respecto al suero fisiológico el extracto de achiote presenta un efecto inhibitorio similar con la concentración del 50% (6 mm) y superior al 100% (8,40 mm)<sup>7</sup>.

## Antecedentes Nacionales

**Cervera Y (2022).** Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de Equisetum bogotense Kunth. “Cola de Caballo”, Piper aduncum L. “Matico” y Bixa orellana L. “Achiote” sobre Staphylococcus aureus. Objetivo: determinar el efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de Equisetum bogotense Kunth (Cola de caballo), Piper aduncum L. (Matico) y Bixa orellana L. (Achiote) frente a Staphylococcus aureus. Se utilizó el método mostraron un efecto inhibitorio frente a *S. aureus*. De los tres extractos, el de Bixa orellana L reveló mayor sensibilidad contra las cepas de *S. aureus* con halos de inhibición promedio de 16.40 a 27.20 mm<sup>8</sup>.

**Garcia A, Pariachi A. (2018).** Evaluación de la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de achiote (*Bixa orellana*) en ratas albinas, cepa Holtzman. El objetivo del estudio fué determinar la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de Bixa orellana L. (achiote) por inducción con aceite de ricino y a posterior la administración de carbón activado para la determinación del tránsito intestinal del extracto en estudio. Se realizó el tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina y prueba de espectrofotometría en el UV. Resultados: muestran que el mayor efecto antidiarreico se dió con la dosis de 1000 mg/kg (66.621%), y con la dosis de 500 mg/kg (54.203%) comparable y casi semejante al control positivo loperamida (71.258%)<sup>9</sup>.

**Montoya J. (2019).** El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del Bixa orellana L. “Achiote”, sobre cepas de Proteus mirabilis ATCC 14028, a las siguientes diluciones: 100%, 75%, 50%, 25% comparado con cefalexina a 30 µg y control negativo con DMSO. Se evidenció mayor efecto inhibitorio al 100% la media fue de 14.30 mm y la Cefalexina reportó 16.60 mm, DE:  $0.966 \pm 0.306$  (con un valor máximo de 18 mm y un mínimo de 15 mm), IC al 95% (de 15.95 – 17.29) considerado sensible<sup>10</sup>.

## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Problema principal

¿Tendrá actividad antibacteriana el extracto etanólico de hojas *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

Problemas específicos

1. ¿El efecto inhibitorio del extracto etanólico de hojas de *hojas Bixa orellana* (L) y del ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* muestran diferencias significativas?

2. ¿Cuál es el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

### 1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las enfermedades de origen infeccioso causadas por bacterias y hongos patógenos representan un desafío serio para la farmacología actual, lo cual se ve evidenciado a través de las millones de muertes que causan a nivel mundial. Los microorganismos causantes de estas enfermedades se encuentran en diversas partes del entorno incluido nuestro propio cuerpo. Debido al desarrollo vertiginoso de la resistencia bacteriana y la toxicidad de algunos medicamentos y al contar con pocos trabajos publicados de la actividad antibacteriana de *Bixa orellana* se hace propicia la realización de este proyecto para evaluar su actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*<sup>711</sup>.

Recurrir a la fitoterapia es una alternativa adecuada para aquellas personas que no pueden acceder al sistema tradicional de terapias con medicamentos farmacéuticos. Cabe señalar que en el Seguro Social de Salud, EsSALUD se fomentó el consumo de achiote, debido a sus beneficios en la próstata y sistema renal<sup>12</sup>.

#### Importancia

La importancia del presente trabajo está en la investigación realizada para demostrar que las hojas de la *Bixa orellana* (L) puede ser una fuente de obtención de nuevos agentes antimicrobianos, como alternativa de tratamiento, teniendo en cuenta los resultados de estudios anteriores lográndose demostrar que las hojas de achiote tienen efectos inhibidores sobre varios patógenos gran positivos, como gran negativos.

### 1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 1.4.1 Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

- Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) y del ciprofloxacino frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Determinar el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## 1.5 MARCO TEÓRICO

### 1.5.1 *Bixa orellana* (L)



Fig. 1. *Bixa orellana* (L)<sup>13</sup>

### 1.5.2 Clasificación taxonómica

Según Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist. (1988).

**Reino: Plantae**

**División: Magnoliopsida**

**Orden: Malvales**

**Familia: Bixaceae**

**Género: Bixa**

**Especie: *Bixa orellana* (L)**

**N.V. “achiote” (anexo 2)**

### 1.5.3 Descripción botánica

Es un arbusto perenne, de 2-4 m hasta 6 m de altura, copa baja y extendida; tallo pardo, ramifica a poca altura del terreno. Hojas simples, grandes, de 6-27 x 4-19 cm, y base redondeada o subtruncada, verdosas claras, persistentes, alternas, márgenes lisos, cordadas, de largos pecíolos, delgados, glabro, de 3-8 (-10) cm de largo, engrosado en los extremos<sup>14</sup>.

#### **1.5.4 Propiedades medicinales**

Se le atribuyen diferentes propiedades terapéuticas astringente, antiséptico, emoliente, antibacterial, antioxidante, expectorante, cicatrizante, febrífugo, estomáquico y antidisentérico, diurético y antigonorreico, purgante, desinflamatorio e hipoglicemiante<sup>15</sup>.

#### **1.5.5 Nombre común**

Achiote

#### **1.5.6 Composición química**

Principios activos de las hojas presenta alcaloides, bixaganeno, bixeina, fenilamina, ácido salicílico, triptófano, ácido elálgico, treonina, taninos, saponinas, carotenoides: bixina, norbixina, orellina, betacaroteno, criptoxantina, metilbixina, zeaxantina, luteína, mono y sesquiterpenos. flavonoides: glucósido de apigenina, bisulfato de apigenina, bisulfato de luteolina, bisulfato de hipolaetina, ácido tomentósico, vitaminas (A, B y C)<sup>8</sup>.

#### **1.5.7 Extractos vegetales**

Los extractos vegetales son preparados que se obtienen de la extracción de diferentes sustancias vegetales a partir de diversos procesos, como: maceración, fermentación, infusión, decocción y esencias. Los principios activos presentes en cada planta son complejos fitoquímicos (metabolitos secundarios), podemos encontrar gran variedad y en diferentes concentraciones, por lo que sus beneficios son variados. La eficacia de los extractos vegetales depende entre otros factores de la especie e inclusive variedad vegetal, metodología de extracción, la calidad de las plantas utilizadas, concentración utilizada, etc.<sup>16</sup>.

#### **1.5.8 Propiedades antimicrobianas de un extracto vegetal**

Las propiedades antimicrobianas dependen del conjunto de sustancias que lo componen. Aunque la mayor responsabilidad del efecto es del quimiotipo, los demás metabolitos también tienen influencia, pues puede haber un efecto sinérgico o, también, antagónico entre ellos. Entonces, al ser el metabolito mayoritario es el que va a ejercer el mayor efecto control sobre el patógeno, es importante tener clara su identidad y el rango de porcentaje en el que debe estar presente en el extracto. Estos metabolitos pueden estar presentes entre un 40-60 % o 60-80 % y el porcentaje restante lo componen otros metabolitos secundarios. Otra alternativa es trabajar con el metabolito secundario puro por sus propiedades antimicrobianas. Aunque, es importante analizar el costo-beneficio, pues estos suelen ser más costosos que un extracto vegetal<sup>17</sup>.

### 1.5.9 Prueba de efectividad inhibitoria

Para probar la eficacia de los antimicrobianos líquidos existen múltiples técnicas de laboratorio, las cuales son un estudio de la sensibilidad “in vitro” de un microorganismo patógeno frente a las sustancias microbianas. Entre los métodos más importantes está el de difusión, habitualmente cualitativo, que tomando en cuenta el halo de inhibición que aparece alrededor del disco, los microorganismos se clasifican como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R), según sea la eficacia obtenida por el agente antimicrobiano frente al microorganismo.

El halo de inhibición es la zona alrededor de un disco en un antibiograma en el que no se produce crecimiento microbiano en una placa de agar inoculada con el microorganismo. Es una medida de la potencia de la muestra frente al microorganismo<sup>18</sup>.

### 1.5.10 Cepas utilizadas en el ensayo de inhibición bacteriana

#### *Staphylococcus aureus*

Es una familia de bacterias que se ha vuelto muy frecuente en infecciones hospitalarias, y a su vez se han hecho más resistentes a los fármacos actuales, de aquí la importancia de la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas.

#### *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* esta comúnmente presente en el intestino de animales de sangre caliente y en el humano, esta es necesaria para la salud, ya que contribuye en la digestión y en la degradación de los alimentos. La presencia de esta bacteria en el agua o en los alimentos es un indicador de que existe contaminación biológica, generalmente por contener heces fecales. A pesar de ser amigable con la salud, en ocasiones puede causar infección en el tracto urinario o diarrea<sup>19</sup>.

### 1.5.8 Antimicrobiano

#### **Ciprofloxacino**

El Ciprofloxacino es un antibiótico que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas. empleado para tratar infecciones bacterianas por inhibición de su reproducción. Es eficaz frente a muchas bacterias e incluso es efectivo frente a bacterias que tienden a desarrollar resistencias frente a otros antibióticos. El Patrón estándar del diámetro, de los halos de inhibición para la cepa de *Staphylococcus aureus* por el ciprofloxacino (5ug), elaborado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), considera la siguiente clasificación: Sensibles (S): mayor o igual a 21 mm intermedios (I):16-20 mm o resistentes (R): menor o igual a 15 mm<sup>20</sup>.

## 1.6 MARCO CONCEPTUAL

**Antimicrobiano:** Molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos<sup>21</sup>.

**Actividad antibacteriana:** Capacidad de destruir o matar a las bacterias e impedir su proliferación y su acción patógena<sup>22</sup>.

**Cepa bacteriana:** Es un conjunto de bacterias con características biológicas iguales, es decir, microorganismos de la misma especie<sup>23</sup>.

**Halo de inhibición:** Es la zona alrededor de un disco (contiene un antimicrobiano) en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa con medio de cultivo con el germen<sup>24</sup>.

**Maceración:** Es un proceso que se emplea para extraer activos de un sólido hacia un líquido. La materia prima o producto sólido contiene ciertos compuestos que son solubles en el líquido que se utiliza como extractante<sup>25</sup>.

**Método de difusión:** se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa Petri con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar<sup>26</sup>.

**La resistencia bacteriana a los antibióticos:** La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser natural, provenir de mutaciones o bien originarse por transferencia de genes. Cuando todas las cepas pertenecientes a la misma especie son resistentes a un antibiótico, se habla de resistencia natural<sup>27</sup>.

## II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 2.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

#### 2.1.1 Tipo de Investigación

Transversal

Tipo de investigación observacional que analiza datos de variables recopiladas en un periodo de tiempo sobre una población muestra o subconjunto predefinido.

Explicativo

Se explicó hechos que se produjeron en determinadas condiciones durante el estudio.

#### 2.1.2 Nivel de Investigación

Básico

Se especificó de manera detallada el estudio realizado y sus conclusiones.

#### 2.1.3 Diseño de Investigación

Experimental

Se controló deliberadamente las variables para delimitar relaciones entre ellas. Se recopiló datos para comparar las mediciones de comportamiento de un grupo experimental, con las mediciones de un grupo control.

### 2.2 HIPOTESIS

#### Hipótesis General

El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) presenta actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

#### Hipótesis específicas

1. La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) y del ciprofloxacino frente la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* no muestran diferencias significativas.
2. El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) del ciprofloxacino frente la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* están en relación directa a su concentración.

### 2.3 VARIABLES

- **Variable independiente:** Extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L)
- **Variable dependiente:** Actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## 2.4 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variables independientes		Dimensión	Indicadores
<ul style="list-style-type: none"> <li>Extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L)</li> </ul>		mg/mL	Peso del extracto Análisis macroscópico
Variables dependientes			
Actividad antibacteriana	<i>S. aureus</i>	mm. de diámetro	Halos de inhibición
	<i>E.coli</i>		decrecimiento % de inhibición relativa
		Crecimiento en medio de cultivo	Grado de turbidez (Tubo N° 4 y 5 de Mc.Farland)

## 2.5 POBLACIÓN Y MUESTRA

- Población:  
Cultivos de *Bixa orellana* (L)
- Muestra:  
Hojas de *Bixa orellana* (L)

## 2.6 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

### Materiales de laboratorio:

- Baguetas
- Probeta
- Gradilla para tubos de ensayo
- Termómetro
- Matraz Erlenmeyer.
- Vasos de precipitación
- Embudo
- Pipetas
- Asa de Kolle
- Placas petri

### **Material biológico:**

- Material vegetal: hojas de *Bixa orellana* (L)
- Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

### **Equipos de laboratorio:**

- Microondas
- Balanza analítica
- Refrigeradora
- Campana bacteriológica de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora 36°C

### **Solventes y reactivos**

- Agua destilada
- Etanol de 96°

### **Otros:**

- Papel de filtro Whatman
- Papel aluminio
- Papel platino
- Algodón
- isopos estériles
- Viales estériles
- Papel Kraft
- **Tratamiento del material vegetal**

**Obtención y selección de la muestra:** Las hojas de *Bixa orellana* (L) se adquirieron en tiendas naturistas de la Ciudad de Ica y se seleccionó la especie vegetal sin deterioro.

Para su transporte se utilizó bolsas de papel Kraft.

- **Limpieza:** El lavado del material vegetal *Bixa orellana* (L) se realizó con agua potable y después se volvió a lavar con agua destilada.
- **Secado:** La muestra se dejó secar al aire bajo sombra y a la estufa con circulación de aire a una temperatura de 40°, durante un tiempo de dos a cuatro días, terminando el proceso de secado a temperatura ambiente.
- **Molienda:** La muestra fué molida por medio de un molino eléctrico, el cual nos dió una muestra homogénea.
- **Almacenamiento:** La muestra molida fue almacenada en un frasco de vidrio de color ámbar y cerrado herméticamente protegidos de la luz, luego se rotuló colocando el nombre de la especie, parte utilizada y la fecha que se almacenó.
-

### **Obtención del extracto etanólico**

10 g de hojas de *Bixa orellana* (L) fueron secadas a temperatura ambiente; luego se maceró en frío con 100 mL de etanol 96% en un frasco de vidrio,

## **2.7 EVALUACION DEL EFECTO INHIBITORIO**

### **Cepas utilizadas:**

*Staphylococcus aureus*

*Escherichia coli*

### **Medios de cultivo:**

Agar Mueller-Hinton

Caldo Nutritivo.

### **Control positivo:**

Ciprofloxacino (5 ug)

### **Control negativo :**

Etanol 96°

### **Preparación de medios de cultivo:**

#### **Preparación del Medio de Cultivo Sólido.-**

Se esterilizó los materiales de laboratorio.

Preparación del cultivo Mûeller –Hinton se realizó como indica el fabricante, luego se calentó observando completa dilución. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos y 15 lb de presión (121°C)<sup>30</sup>.

Posteriormente se colocó 25 mL de medio de cultivo en placas Petri estériles y se dejó que solidifique y finalmente se colocó en la estufa durante 24 horas a 35°C para pasar la prueba de esterilidad<sup>31</sup>.

### **Determinación de la Actividad antibacteriana**

#### **Preparación del inóculo**

Se sembró las bacterias en estudio en una placa de agar tripticasa soya (TSA) y se incubó a 37° C durante 24 horas. Para preparar el inóculo se tocó de tres a cinco colonias y se resuspendió las bacterias en 5 mL de solución salina estéril al 0,9 % y se ajustó a la turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland ( $1 - 1,5 \times 10^8$  UFC/mL)<sup>32</sup>.

#### **Inoculación de las Placas**

Se realizó dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez de la suspensión del inóculo.

Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión antes mencionada, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó en la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez, para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Como paso final se pasó el hisopo sobre los bordes del agar. Antes de colocar los discos se dejó secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido<sup>18</sup>.

#### **Método de Difusión de Disco**

Las placas fueron inoculadas empleando hisopos estériles con la correspondiente bacteria de estudio, se emplearon discos estériles de 6 mm de diámetro los cuales fueron embebidos en distintas concentraciones de los extractos (25%, 50% y 100%) de la especie vegetal, como control positivo se utilizó discos de ciprofloxacino (5 µg/disco) y como control negativo se empleó etanol (96%). Seguidamente las placas Petri se incubaron a 37°C por 24 horas; se realizaron 3 repeticiones. El porcentaje de inhibición se calculó teniendo como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo (B) y la medición del halo del extracto testeado (A), mediante la siguiente fórmula<sup>33</sup>.

$$\text{PIR (\%)} = \frac{A \times 100}{B}$$

Donde:

A = Diámetro del halo de inhibición del extracto.

B = Diámetro del halo de inhibición del antibiótico

PIR (%) = Porcentaje de inhibición relativa

## **2.8 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

Los datos se analizaron con el Software SPSS V 26.

La prueba de ANOVA (análisis de varianza) permitió verificar diferencias las significativas entre los diámetros de inhibición generados por el extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

El análisis post ANOVA Tukey permitió identificar la dilución con la que se obtuvo el mayor tamaño de halo de inhibición entre los diferentes tratamientos.

### III. RESULTADOS

**TABLA 1**

**Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus***

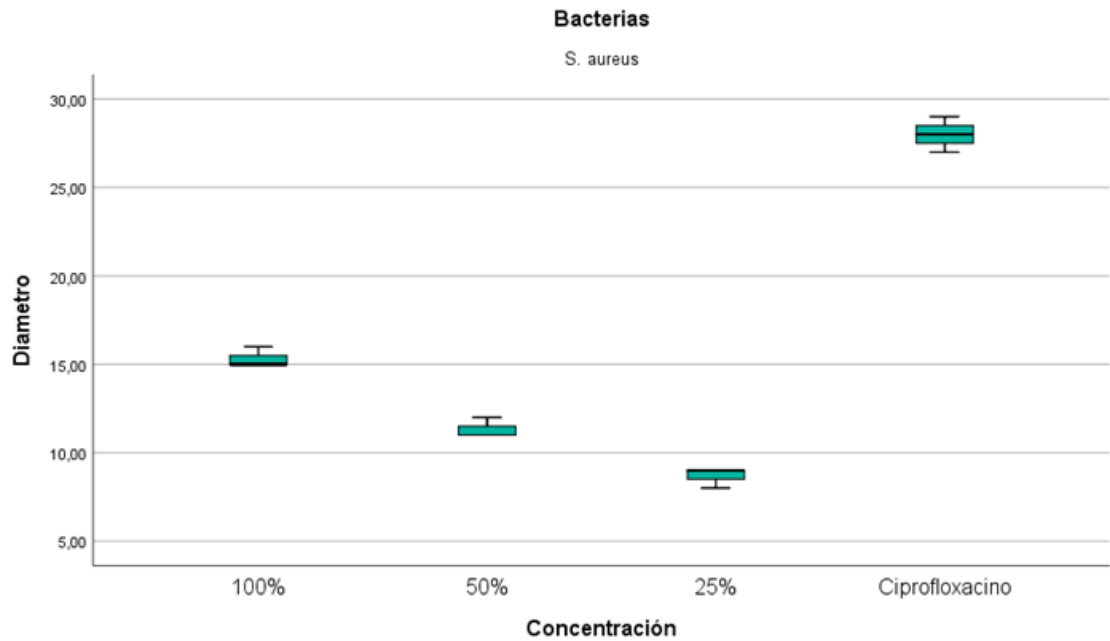
	Diámetro (mm) de los halos de inhibición a diferentes concentraciones			
	100%	50%	25%	Control
	(1)	(2)	(3)	
	15	11	08	28
<b>Extracto etanólico</b>	16	12	09	27
	15	11	09	29
<b>Promedio</b>	15	11	09	28

C.P.= Ciprofloxacino (5ug)

C.N.= Etanol 96°

**FIGURA 2**

**Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus***



**Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26**

Los promedios de diámetros, de los halos de inhibición, revelados por el efecto inhibitorio del extracto etanólico a diferentes concentraciones sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* mostraron que la mencionada cepa tiene resistencia bacteriana intermedia frente al extracto etanólico al 100% con halos de inhibición de 15 mm de diámetro.

**TABLA 2**

**Análisis de varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus***

<b>ANOVA (Análisis de varianza)</b>					
<b>Diámetro</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Entre grupos</b>	<b>659,667</b>	<b>3</b>	<b>219,889</b>	<b>439,778</b>	<b>,000</b>
<b>Dentro de grupos</b>	<b>4,000</b>	<b>8</b>	<b>,500</b>		
<b>Total</b>	<b>663,667</b>	<b>11</b>			

**Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26**

El análisis estadístico por medio de la prueba **ANOVA (Análisis de varianza)** muestra un nivel de significación de 0,000 ( $p < 0.05$ ), por lo que se concluye que, existe diferencia significativa entre los promedios de diámetros, de los halos de inhibición, revelados por el efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente las cepas de *Staphylococcus aureus*.

**TABLA 3**

**Análisis de homogeneidad: TUKEY para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus***

**Analisis de homogeneidad: TUKEY**

<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>		<b>Diámetro</b>			
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.05</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>25%</b>	<b>3</b>			<b>8,6667</b>	
<b>50%</b>	<b>3</b>		<b>11,3333</b>		
<b>100%</b>	<b>3</b>	<b>15,3333</b>			
<b>Ciprofloxacino</b>	<b>3</b>				<b>28,0000</b>
<b>Sig.</b>		<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>

**Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26**

Luego con el análisis de promedios de Tukey se tiene que el extracto etanólico estudiado a una concentración del 100% frente a la cepa de *S. aureus*, muestra halos de inhibición de mayor promedio con 15 mm que difiere significativamente del diámetro obtenido con el Ciprofloxacino (28 mm) que se utilizó como control positivo.

**TABLA 4**

**Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli***

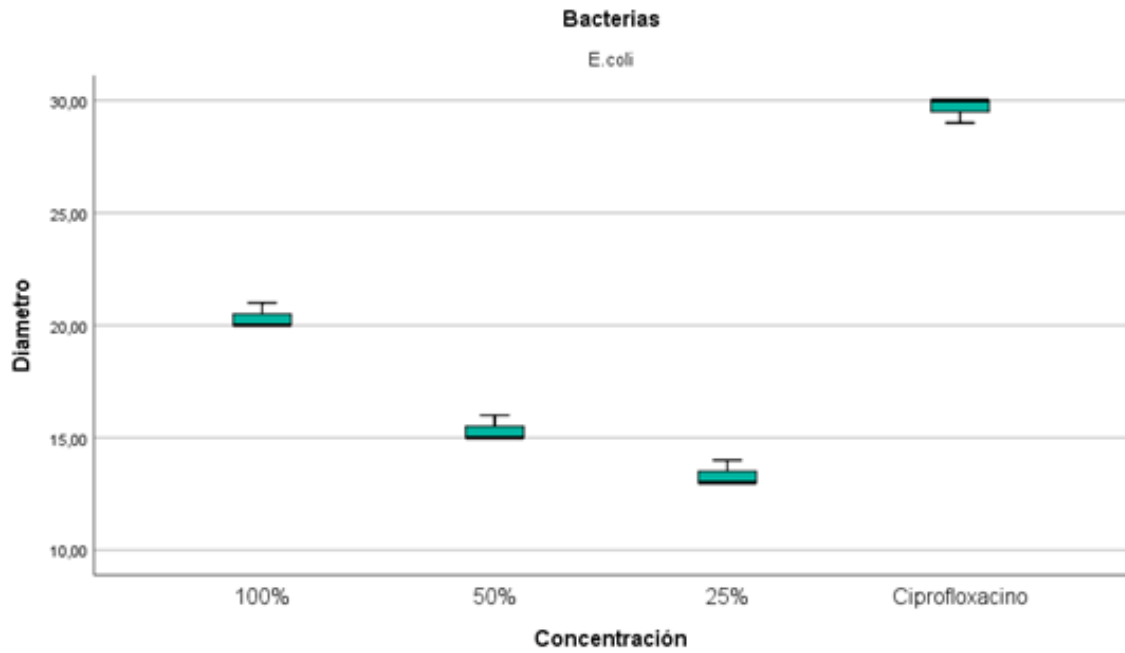
	<b>Diámetro (mm) de los halos de inhibición a diferentes concentraciones</b>			
	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>Control</b>
	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(3)</b>	<b>(+)</b>
	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>30</b>
<b>Extracto etanólico</b>	<b>21</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>29</b>
	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>30</b>
<b>Promedio</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>30</b>

**C.P.= Ciprofloxacino (5ug)**

**C.N.= Etanol 96°**

**FIGURA 3**

**Promedios de diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli*.**



**Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26**

Los promedios de diámetros de los halos de inhibición, revelados por el efecto inhibitorio del extracto etanólico a diferentes concentraciones sobre las cepas de *Escherichia coli*, mostraron que la mencionada cepa tiene sensibilidad bacteriana con halos de inhibición de 20 mm de diámetro

**TABLA 5**

**Análisis de varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli***

<b>ANOVA (Análisis de varianza)</b>					
<b>Diámetro</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Entre grupos</b>	<b>478,000</b>	<b>3</b>	<b>159,333</b>	<b>478,000</b>	<b>,000</b>
<b>Dentro de grupos</b>	<b>2,667</b>	<b>8</b>	<b>,333</b>		
<b>Total</b>	<b>480,667</b>	<b>11</b>			

**Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26**

El análisis estadístico por medio de la prueba ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,000 ( $p < 0.05$ ), por lo que se concluye que, existe diferencia significativa entre los promedios de diámetros, de los halos de inhibición, revelados por el efecto inhibitorio del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a las cepas de *Escherichia coli*.

**TABLA 6**

**Análisis de homogeneidad: TUKEY para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli***

**Analisis de homogeneidad: TUKEY**

<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>		<b>Diámetro</b>			
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.05</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>25%</b>	<b>3</b>			<b>13,3333</b>	
<b>50%</b>	<b>3</b>		<b>15,3333</b>		
<b>100%</b>	<b>3</b>	<b>20,3333</b>			
<b>Ciprofloxacino</b>	<b>3</b>				<b>29,6667</b>
<b>Sig.</b>		<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>

**Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 26**

Luego con el análisis de promedios de Tukey se tiene el extracto etanólico estudiado a una concentración del 100% frente a la cepa *de E. coli*, muestra halos de inhibición de 20 mm con diferencia al diámetro obtenido con el ciprofloxacino (30 mm) que se utilizó como control positivo.

**TABLA 7**

**Porcentaje de inhibición relativa (PIR) del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.**

Microorganismo	Diámetro (mm) de halos de inhibición a diferentes concentraciones (%)			Control (+)	PIR
	100	50	25	mm	(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>					
ATCC 25923	15	11	09	28	53,6 %
<i>Escherichia coli</i>					
ATCC 13216	20	15	13	30	66,7 %

**X<sup>3</sup> = Promedio de tres repeticiones**

- **Control positivo = Ciprofloxacino (5 ug)**
- **PIR = Porcentaje de Inhibición Relativa**

El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* (L) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* están en relación directa a su concentración, al 100 % el porcentaje de inhibición relativa sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fué de 66.7 % y 53.6 % lo que reveló efecto inhibitorio moderadamente activo en ambas bacterias según referencias del protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET-ESSALUD<sup>34</sup>.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICION
<b>Inactivo</b>	< 55%
<b>Poco activo</b>	55 – 65 %
<b>Moderadamente activo</b>	66 -80 %
<b>Buena actividad</b>	> 80 %

#### IV. DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación demostraron que las cepas de *E. coli* son sensibles a la acción del extracto etanólico de *Bixa orellana* (L). A la concentración de 100% se obtuvo halos de inhibición promedio de 20 mm de diámetro para *E. coli* y de 15 mm de diámetro promedio para *S. aureus*, coincidiendo con los resultados reportados por Aguilar D. (2019) quien observó que la actividad antimicrobiana de las hojas de *Bixa orellana* tuvo mayor efecto sobre *Escherichia coli* y menor efecto sobre *Staphylococcus aureus*. Asimismo los resultados obtenidos en el presente estudio se contrasta con los resultados obtenidos por Cervera Y (2022) cuyos resultados revelaron mayor sensibilidad contra las cepas de *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición promedio de 16.40 a 27.20 mm

El ANOVA (Análisis de Varianza) realizado para la variable concentración demostraron que existen diferencias significativas, observándose que a medida que las concentraciones aumentan, los diámetros de halos de inhibición también se incrementan (Tabla 2,3 y 5,6).

El ANOVA (Análisis de Varianza) indicó que existen diferencias significativas entre las bacterias evaluadas, en donde las cepas de *Escherichia coli* presentó mayor susceptibilidad frente al extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* con menor susceptibilidad (Tabla 1 y 4).

Cabe resaltar que las cepas bacterianas pueden ser resistentes a los extractos de plantas medicinales, debido a que se adecuan a las condiciones ambientales a las que son expuestas. Un ejemplo de ello es que algunas cepas bacterianas son capaces de tolerar altas concentraciones de sustancias, estos mecanismos no se conocen con detalle, aunque una posibilidad, es que modifiquen la membrana externa de la envoltura celular, activando los sistemas para remover los compuestos tóxicos que las afectan. Estudios en el campo de la microbiología, han revelado que los microorganismos se valen de diversos mecanismos para superar la amenaza contra agentes químicos, lo que las hace multirresistentes.

La efectividad inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) se debe a la presencia Taninos, Flavonoides, Alcaloides, Fenoles y Saponinas a las que se atribuyen su actividad antibacteriana.

## V. CONCLUSIONES

1. La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se determinó mediante el método de difusión en disco obteniéndose a la concentración de 100% un promedio de halos de 15 mm y 20 mm respectivamente, indicando mayor inhibición de ambas bacterias a esta concentración.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) presentó mayor efecto antimicrobiano sobre la cepa de *Escherichia coli*, dicho efecto reveló halos de inhibición menores a los del ciprofloxacino (control positivo).
3. El mayor porcentaje de inhibición relativa (PIR), del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* (L) se obtuvo contra las cepas de *Escherichia coli* y fue de 66.7%, lo que permitió comprobar el efecto inhibitorio significativo del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* (L) sobre la cepas mencionadas a diferencia del efecto inhibitorio mostrado sobre la cepas de *Staphylococcus aureus* con 53.6 % de inhibición.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Ampliar el presente estudio con más concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) frente a otras cepas bacterianas de importancia.
2. Evaluar otros tipos de extractos de *Bixa orellana* (L) sobre otras especies microbianas.
3. Complementar el presente estudio contra especies microbianas de procedencia clínica y con resistencia a los antibióticos.

## VII. FUENTE DE INFORMACION

1. Calderón J, Alvarado P. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Tropaeolum majus* L. (mastuerzo) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 in vitro [tesis de pregrado en Internet]. Perú: Universidad Maria auxiliadora; 2023 [citada 10 de diciembre de 2023]. 84 p. Disponible en: <https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/1500/TESIS%20ALVARADO-CALDERON.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. Maldonado C, Paniagua-Zambrana N, Bussmann R, Zenteno-Ruiz F, Fuentes A. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19. Ecología en Bolivia [Internet]. 2020 [fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; 55 (1). Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1605-25282020000100001](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1605-25282020000100001)
3. Montero - Recalde M, Vayasi L, Avilés - Esquivel D, Pazmiño P, Erazo- Gutierrez V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*. Investig. Vet. Perú [Internet]. 2018 [fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; 29 (4). Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172018000400052](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000400052)
4. Yarin C. Actividad antioxidante in vitro y fotoprotectora in vivo del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote” y elaboración de una forma dermocosmética [tesis de pregrado en Internet]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019 [citada 09 de diciembre de 2023]. 78 p. Disponible en: [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11501/Yarin\\_cc.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11501/Yarin_cc.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
5. Velasco W, Pabón L, Hernández Rodríguez, P. Potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a bacterias asociadas con conjuntivitis. NOVA [Internet]. 2021 [citado el 27 de setiembre de 2022]; 19(36). Disponible en: 19(36). Recuperado a partir de <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1550>
6. Aguilar D. Determinación de actividades biológicas y tamiz fitoquímico de *Bixa orellana* L de la Península de Yucatán [tesis de pregrado en Internet]. Yucatán: Universidad de Sonora; 2019 [citada 27 de setiembre de 2022]. 58p. Disponible en: <http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/2153/1/aguilargonzalezdoloresiselal.pdf>
7. Aguilar D. Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de achiote (*bixa orellana*) sobre cepas de *streptococcus mutans* [tesis de pregrado en Internet]. Yucatán: Universidad

- de Sonora; 2019 [citada 27 de setiembre de 2022]. 74p. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18333/1/T-UCE-0015-ODO-126.pdf>
8. Cervera Y. Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de Equisetum bogotense Kunth. “Cola de Caballo”, Piper aduncum L. “Matico” y Bixa orellana L. “Achiote” sobre Staphylococcus aureus [tesis de pregrado en Internet]. Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2022 [citada 28 de setiembre de 2022]. 46p. Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/10127/Yenny%20Emilia%20Cervera%20G%20c3%b3mez.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
  9. Garcia A, Pariachi A. Evaluación de la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de achiote (bixa orellana) en ratas albinas, cepa holtzman [tesis de pregrado en Internet]. Perú: Universidad Inca Garcilazo de la Vega; 2018 [citada 28 de setiembre de 2022]. 93p. Disponible en: [http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/4128/Tesis\\_Garc%20ada%20Lopez%20c%20Alan%20\\_%20Pariachi%20Castro%20c%20Aidee%20Guiselia.PDF?sequence=2&isAllowed=y](http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/4128/Tesis_Garc%20ada%20Lopez%20c%20Alan%20_%20Pariachi%20Castro%20c%20Aidee%20Guiselia.PDF?sequence=2&isAllowed=y)
  10. Montoya J. Determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del Bixa orellana L. “Achiote”, sobre cepas de Proteus mirabilis ATCC 14028 [tesis de pregrado en internet]. Perú: Universidad César Vallejo; 2019 [citada 28 de setiembre de 2022]. 49p. Disponible en: [https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/29805/montoya\\_oj.pdf?sequence=1](https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/29805/montoya_oj.pdf?sequence=1)
  11. Ponce A y Millones P. Efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora oral. Ciencias de la Salud [Internet]. 2015 [citado el 10 de setiembre del 2012]; 2 (2): 530-537. Disponible en: <http://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo-salud/article/viewFile/946/827>
  12. EsSalud recomienda el consumo de achiote para ayudar a desinflamar la próstata y vías urinarias [actualizado 23 setiembre 2022]. Disponible en: <http://www.essalud.gob.pe/essalud-recomienda-el-consumo-de-achiote-para-ayudar-a-desinflamar-la-prostata-y-vias-urinarias/>
  13. López S, Caicedo M, Gil A, López A. Pazos A. Morfometría de fruto y semilla de *Bixa Orellana* L. “achiote” SCIÉENDO [Internet]. 2018[fecha de acceso 10 de diciembre de 2023]; 21 (2). Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/1903/1823>
  14. Química.es.Bixa orellana. [citado 10 diciembre 2023]. Disponible en: [https://www.quimica.es/enciclopedia/Bixa\\_orellana.html](https://www.quimica.es/enciclopedia/Bixa_orellana.html)
  15. Tuesta Z. Efecto de la temperatura de secado y evaluación de la capacidad antioxidante de la hoja de achiote (bixa orellana l.), para la utilización en la

- elaboración de filtrante en la provincia de coronel portillo [tesis en internet] Perú: Universidad nacional de ucayali; 2020 [citada 09 de diciembre de 2023]. 63p. Disponible en:  
[http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3905/UNU\\_AGROINDUSTRIAS\\_2019\\_T\\_ANDREATUESTA.pdf?sequence=3](http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3905/UNU_AGROINDUSTRIAS_2019_T_ANDREATUESTA.pdf?sequence=3)
16. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Manuales prácticos para la elaboración de bioinsumos [citado 10 diciembre de 2023]. Disponible en:  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/737322/10\\_Extractos\\_vegetales.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/737322/10_Extractos_vegetales.pdf)
  17. Ramirez N. Formulación de extractos vegetales para el control de enfermedades agrícolas v [tesis]. Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2021 [citada 10 de diciembre de 2023] Disponible en:  
<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/5091/ramirez-quispenadir-fiorella.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  18. Sulca T. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmellarepens* (Bastoncillo), *Urtica dioica* (Ortiga negra) y *Sonchusoleraceus* (Kana yuyo), plantas registradas en la parroquia La Esperanza-Imbabura, sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cándida albicans*, causantes de enfermedades bucofaríngeas [tesis de pregrado en Internet]. Sangolqui: Escuela Politécnica del Ejercito, 2010 [citada 28 de setiembre de 2022]. 182 p. Disponible en:  
<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/2648/T-ESPE-030037.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  19. Bravo R. Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la hoja de Bixa orellana de la provincia de Zamora Chinchipe [tesis de pregrado en Internet]. Perú: Universidad Técnica Particular de Loja, 2017 [citada 09 de diciembre de 2023]. 63p. Disponible en:  
<https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/20993/1/Romero%20Bravo%2c%20Karen%20Andrea.pdf>
  20. Picazo J. Procedimientos en microbiología clínica [citado 24 mayo 2022]. Disponible en:  
[http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos\\_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf](http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf)
  21. Murray P. Microbiología médica. 2da. Edición, editorial Harcourt, Brace, España. 1997
  22. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. 23ª. ed. Madrid: Espasa; 2014

23. InfoSIDA [internet]. Cepa; [citado 15 junio 2022]. [1 pantalla]. Disponible: <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/glossary/1750/cepa>
24. Microbiología [internet]; c2018. Halo de inhibición; [citado 16 junio 2022]. [1 pantalla]. Disponible en: <https://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/blank-ch2nw#:~:text=Halo%20de%20inhibici%C3%B3n,-Halo%20de%20Inhibici%C3%B3n&text=En%20un%20m%C3%A9todo%20simple%20de%20antibi%C3%B3tico%20frente%20al%20g%C3%A9rmen>
25. Linea y salud. Maceración – Un proceso de extracción de activos [citado 10 diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.lineasalud.com/que-es/macerar-maceracion>
26. Ramirez L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica [Internet]. Ago 2009 [citado 27 julio 2022]; 15 (42): 263-266. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
27. Oromi J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Medicina integral [Internet] 2000 [citado el 10 de setiembre del 2017]; 36 (10): 367-370. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-pdf-10022180>
28. Salazar-Aranda R, De la torre-Rodríguez Y, Analíz-Garza B. et al. Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. Medicina Universitaria [Internet]. Ago 2009 [citada 28 de setiembre de 2022]; 11(44):156-164. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/8425/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20actividad%20biol%C3%B3gica.pdf>
29. Liscano A, Vergara J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, myrciantes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. [tesis de pregrado en Internet]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 2008 [citada 28 de setiembre de 2022]. 131 p. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8688/tesis151.pdf?sequence=1>
30. Orosco M. Elección de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente [tesis de maestría en Internet]. Mexico: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2004 [citada 28 de setiembre de 2022]. 93 p. Disponible en: <file:///D:/Users/Teresa/Downloads/969.pdf>
31. Prat S. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. [citado 13 abril 2022]. Disponible en: [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/manual\\_susceptibilidad.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf).
32. Limaymanta J. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de un gel preparado con extracto etanólico de Marrubium vulgare L [tesis en Internet]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018 [citada 28 de setiembre de 2022]. 69 p. Disponible en:

[https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/9727/Limaymanta\\_gj.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/9727/Limaymanta_gj.pdf?sequence=3&isAllowed=y)

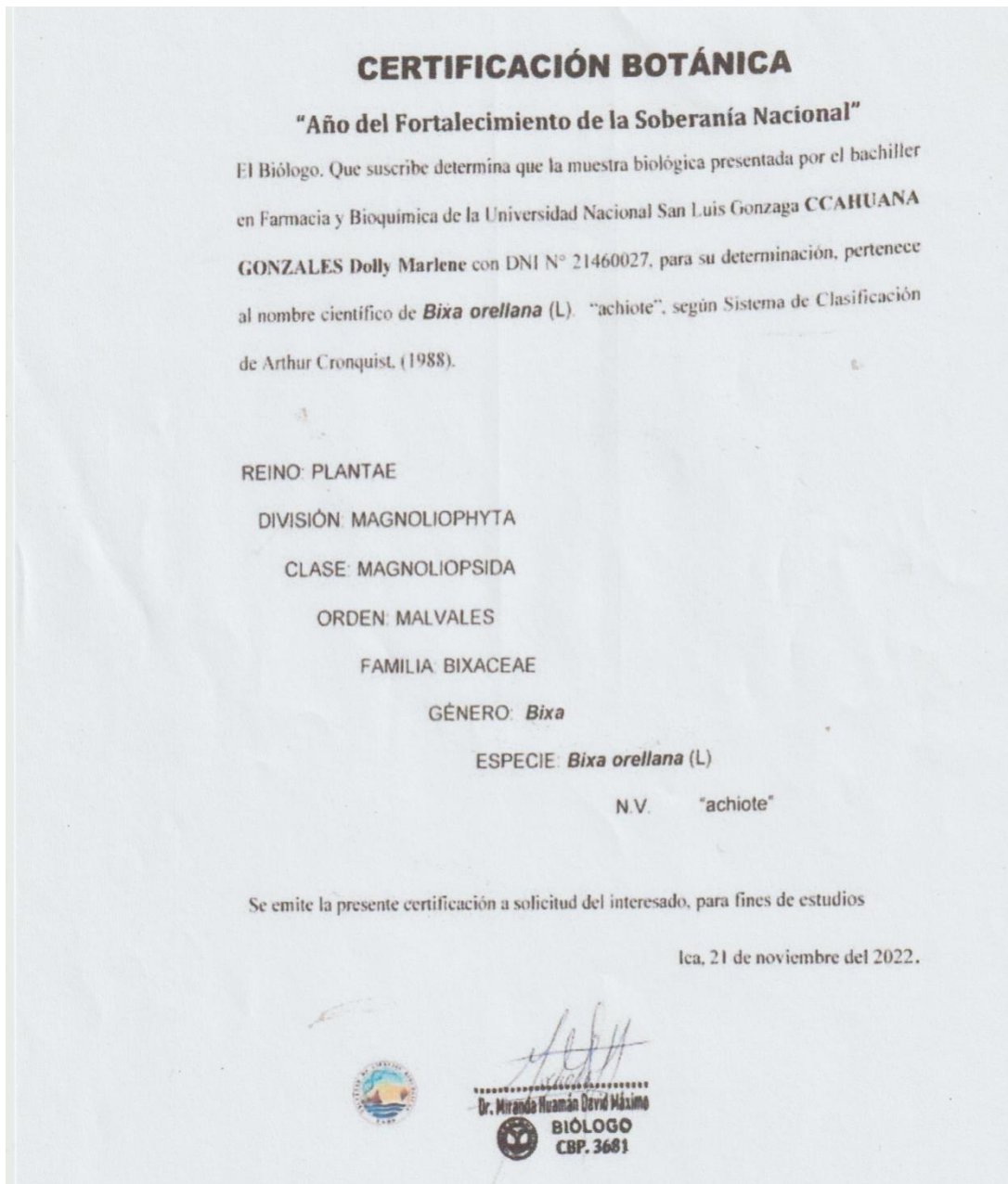
33. Neyra J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de tuctumpaya, quequeña y chiguata, frente a bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* – *Streptococcus pneumoniae* causantes de infecciones de importancia médica, AREQUIPA – PERÚ 2017 [tesis de pregrado en Internet]. Perú: Universidad Nacional De San Agustín de Arequipa; 2018 [citada 28 de setiembre de 2022]. 76 p. Disponible en:  
<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6899/BIInellje.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
34. Rodríguez M, Zevallos F. Actividad antibacteriana in vitro del fruto de *Morinda citrifolia* L. Y planta entera de *Notholaena nivea* (Poiret) Desv, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Y *Enterococcus faecalis*, IMET- ESSALUD. [tesis en Internet]. Perú: Universidad Nacional De La Amazonia Peruana 2014 [citada 28 de setiembre de 2022]. 112 p. Disponible en:  
[https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/3688/Mercedes\\_Tesis\\_Titulo\\_2014.pdf?sequence=1](https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/3688/Mercedes_Tesis_Titulo_2014.pdf?sequence=1)

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Matriz de consistencia

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variable	Métodos
<p><b>Problema principal</b></p> <p>¿Tendrá actividad antibacteriana in vitro el extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p><b>Problemas específicos1.</b></p> <p>1. ¿La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) y del ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> muestran diferencias significativas?</p> <p>2. ¿Cuál es el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p><b>Objetivo general</b></p> <p>Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <p>1. Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) y del ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i></p> <p>2. Determinar el porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p><b>Hipótesis General</b></p> <p>El extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) presenta actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p><b>Hipótesis específicas</b></p> <p>1. La actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) y del ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> no muestran diferencias significativas.</p> <p>2. El porcentaje de inhibición relativa del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (L) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> están en relación directa a su concentración.</p>	<p><b>Independiente:</b></p> <p>Extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa Orellana</i> (L)</p> <p><b>Dependiente</b></p> <p>Actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p><b>Tipo de investigación</b></p> <p>Transversal y explicativo</p> <p><b>Nivel de investigación</b></p> <p>Básico</p> <p><b>Diseño de investigación</b></p> <p>Experimental</p>

Anexo 2. Certificación botánica de *Bixa Orellana* (L)



### Anexo 3. Autorización del uso de instalaciones del laboratorio de Farmacognosia.



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



#### CONSTANCIA

EL DIRECTOR ACADÉMICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA.

HACEN CONSTAR QUE LA ESTUDIANTE:


**CCAHUANA GONZALES, DOLLY MARLENE**

Código N° 20163833

En vías de regularización, se le autoriza el uso de las instalaciones del laboratorio de Farmacognosia, para el desarrollo de su proyecto de tesis, el cual lleva como título "Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de Bixa Orellana frente a Staphylococcus Aureus y Escherichia Coli", y que aprobado el proyecto deberá presentar un documento con su asesor, indicando los días y horas que hará uso del laboratorio.

Se expide la presente constancia para los fines pertinentes.

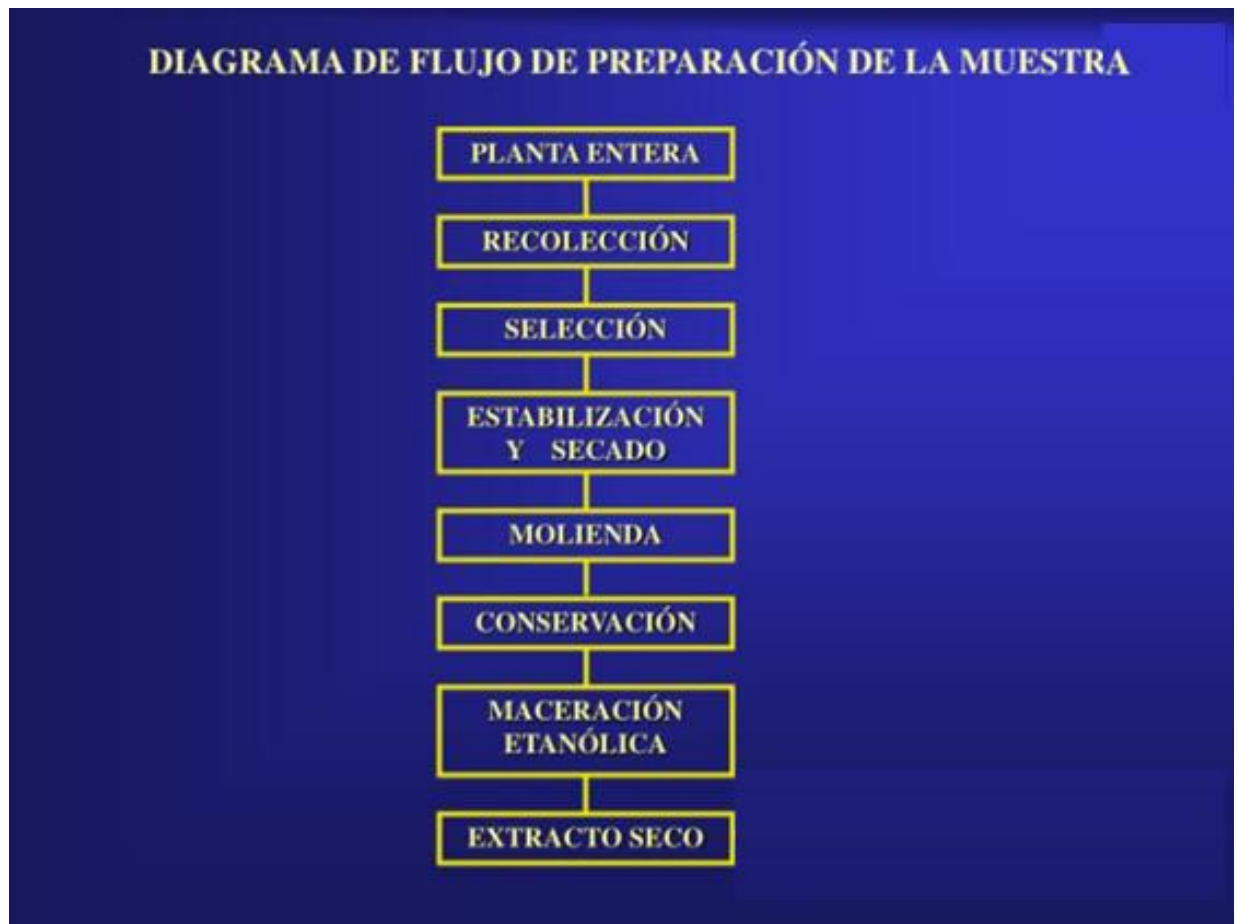
Ica, 23 de Noviembre 2022

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA  
Dirección de Escuela Académica  
  
DR. GERARDO F. ROSAS HERNÁNDEZ  
DIRECTOR

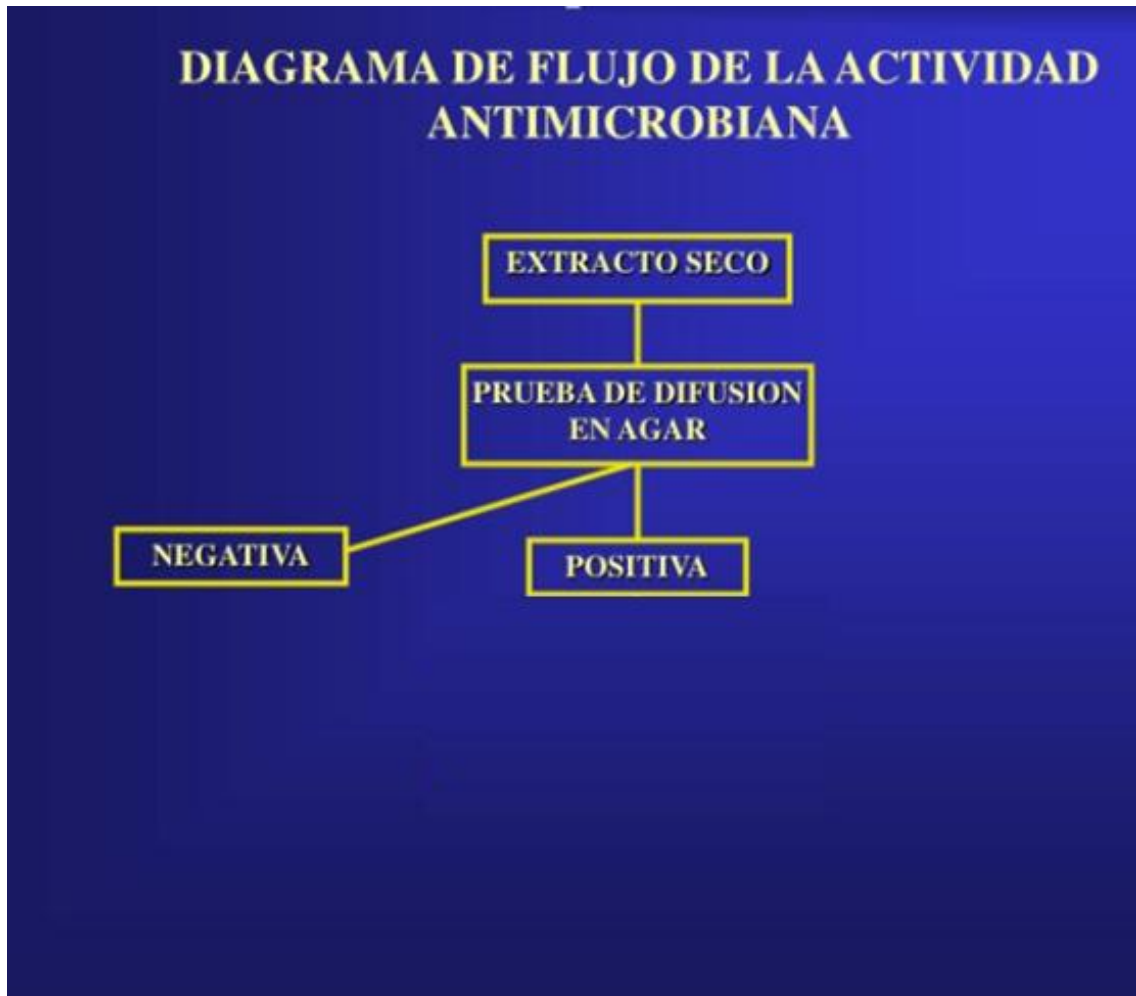
## Anexo 4. Metodología de la actividad antimicrobiana



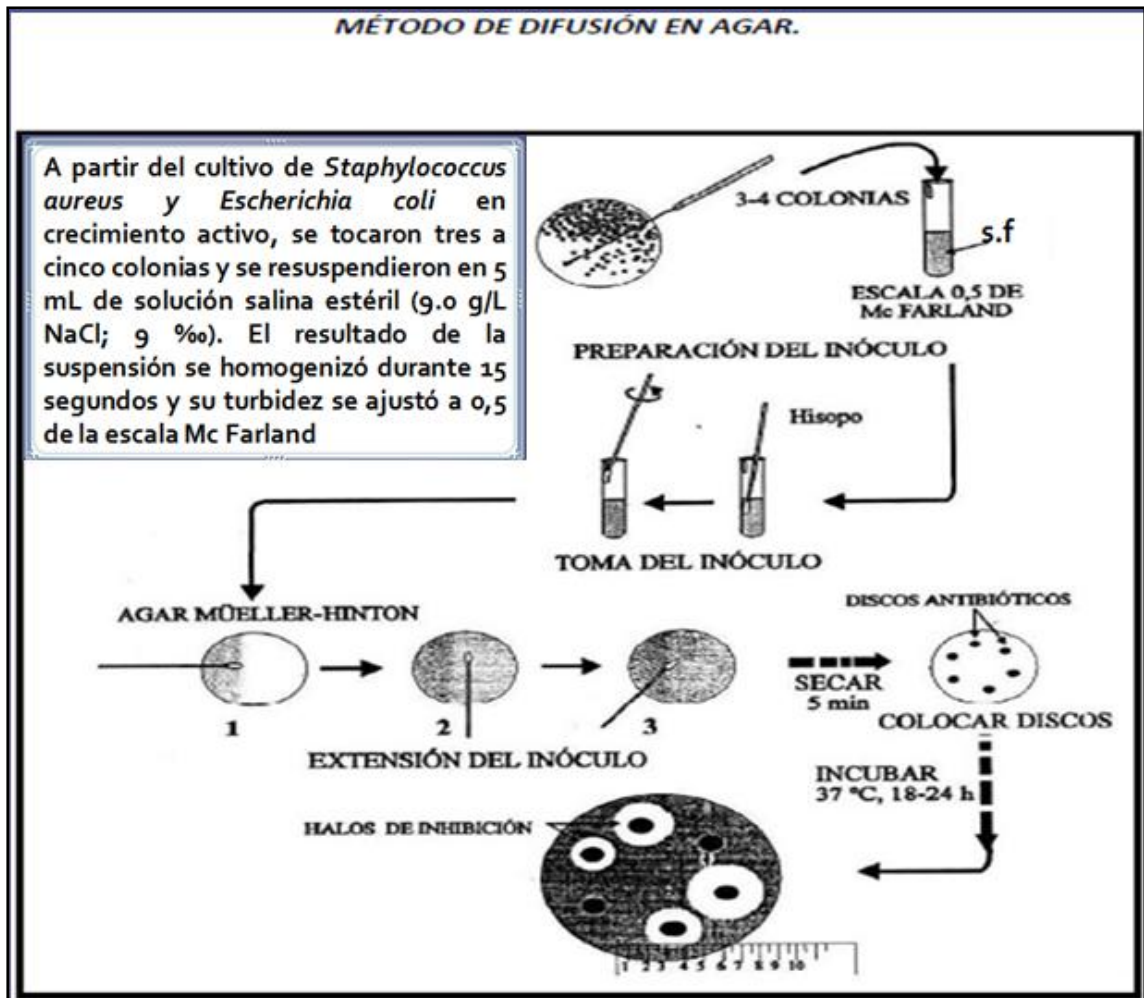
## Anexo 5. Diagrama de flujo de preparación de la muestra



**Anexo 6. Diagrama de flujo de la actividad antimicrobiana**



## Anexo 7. Método de difusión en agar



**Anexo 8. Tratamiento de la muestra vegetal *Bixa orellana* (L)**

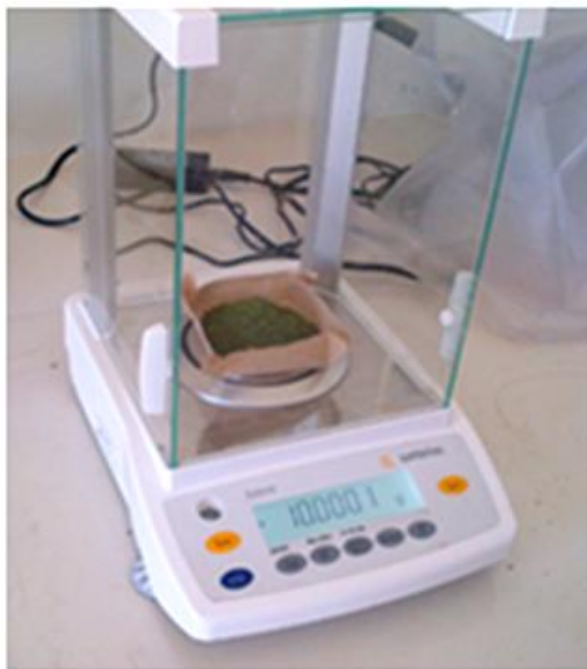


**Secado del material vegetal  
*Bixa orellana* (L)**



**Molienda del material vegetal  
*Bixa orellana* (L)**

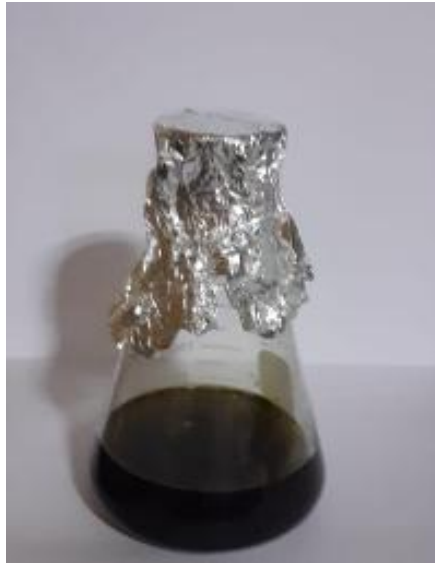
**Anexo 9. Obtención del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L)**



**Pesado del material vegetal molido  
*Bixa orellana* (L)**



**Filtración del extracto etanólico  
*Bixa orellana* (L)**



**Extracto etanólico de hojas de  
*Bixa orellana* (L)**

**Anexo 10. Ensayo del efecto antibacteriano del extracto etanolito de las hojas de *Bixa orellana* (L)**





**Pesado del medio de cultivo  
Agar Mueller-Hinton**





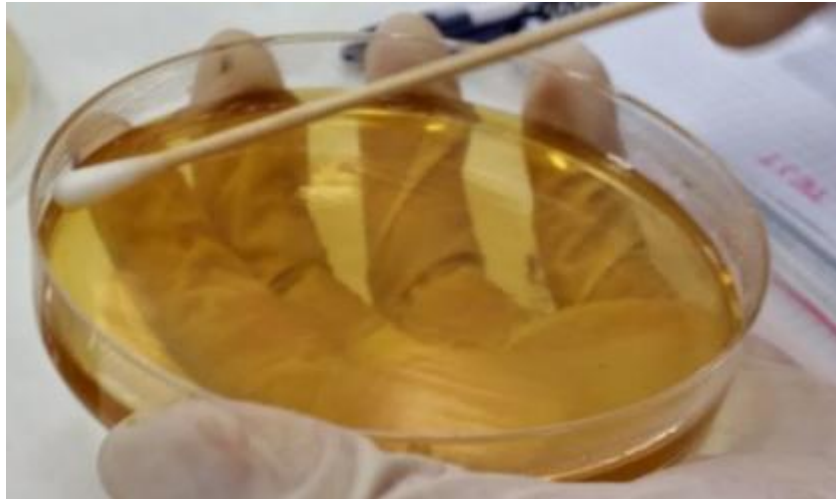
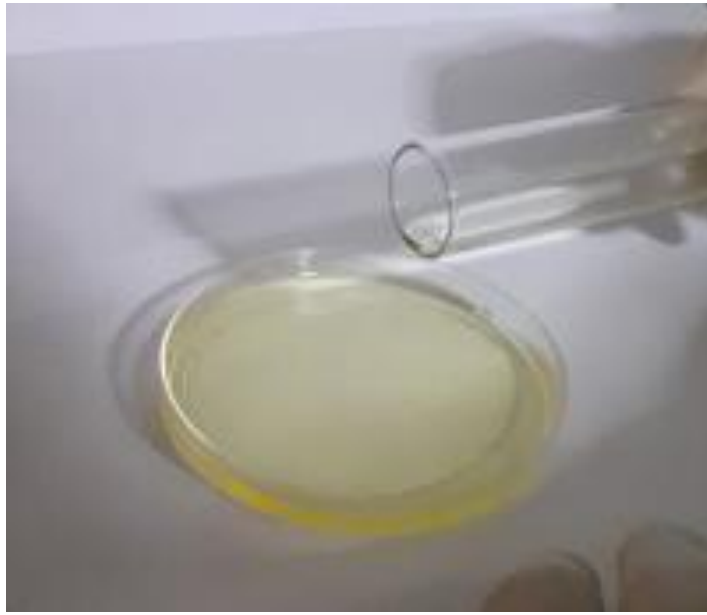
**Medios de cultivo**





**Autoclavado de los medios de cultivo**

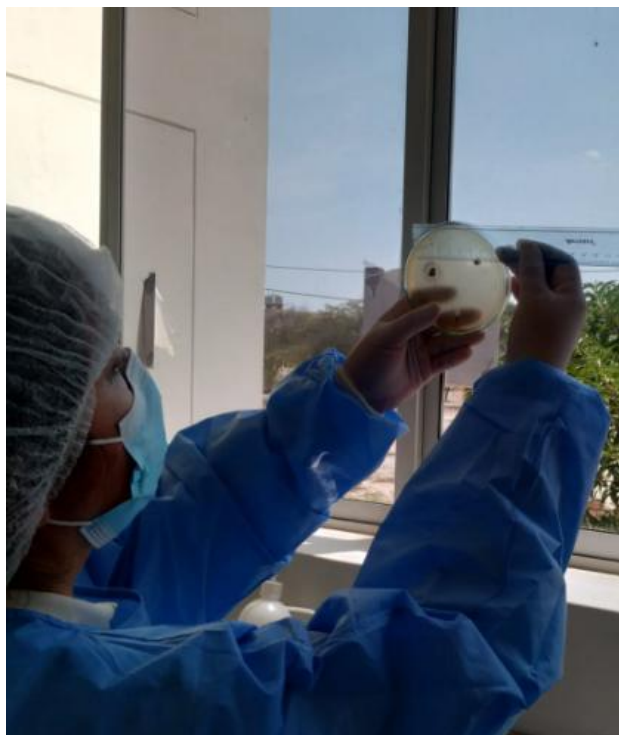




## Inoculación







**Lectura del diámetro de los halos de inhibición**

11. Ficha de Registro de resultados de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* por el método de difusión de disco, PIR: Porcentaje de inhibición relativa.

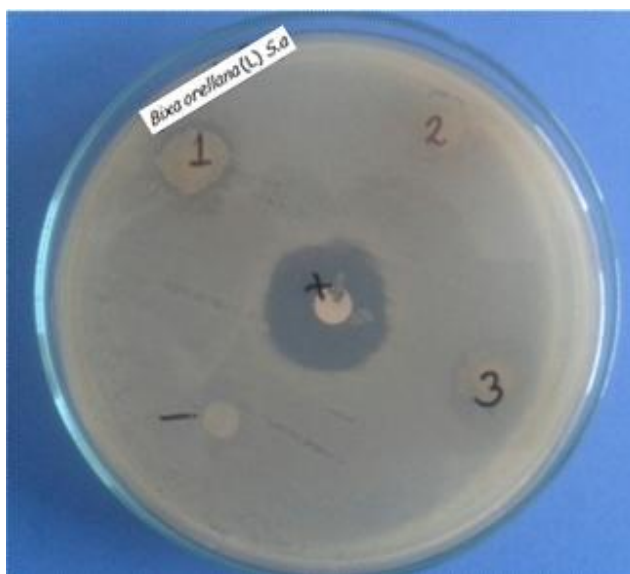
<b>ESPECIE BACTERIANA : STAPHYLOCOCCUS AUREUS</b>			
<b>Concentraciones del extracto :</b>	<b>100%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>
Placa 1 en (mm).	15	11	08
Placa 2 en (mm).	16	12	09
Placa 3 en (mm).	15	11	09
Control (+) Cloranfenicol	28	27	29

**Anexo 12. Ficha de Registro de resultados de actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (L) a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* por el método de difusión de disco, PIR: Porcentaje de inhibición relativa.**

<b>ESPECIE BACTERIANA : <i>ESCHERICHIA COLI</i></b>			
<b>Concentraciones del extracto :</b>	<b>100%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>
Placa 1 en (mm).	20	15	13
Placa 2 en (mm).	21	16	14
Placa 3 en (mm).	20	15	13
Control (+) Cloranfenicol	30	29	30

**Anexo 13. Halos de inhibición de crecimiento de las bacterias de estudio**

**Halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus***



**Halos de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli***

