



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

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS *Bixa orellana* L. (ACHIOTE)
FRENTE
Proteus mirabilis ATCC 29906**

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

AUTOR

INGA BALBIN, MANUEL DARIO
<https://orcid.org/0009-0007-1691-4690>

Bach. LAUREANO BERROCAL, POOL MANUEL
<https://orcid.org/0009-0000-4425-4086>

ASESOR

Mg. ALGUIAR BERNAOLA, LUZ ROCIO
<https://orcid.org/0009-0008-8556-2585>

Lima – Perú 2024

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, **POOL MANUEL LAUREANO BERROCAL**, con DNI **72091735** en mi condición de autor(a) de la tesis presentada para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE **QUÍMICO FARMACÉUTICO** (grado o título profesional que corresponda) de título "**EFFECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS *Bixa orellana* L. (ACHIOTE) FRENTE *Proteus mirabilis* ATCC 29906**", AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud VEINTIUNO PORCIENTO (21%) y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima, 05 de Junio 2024.



POOL MANUEL LAUREANO BERROCAL
DNI: 7209173 5



LUZ ROCIO ALGUILAR BERNAOLA
DNI: 09578116

1. Apellidos y Nombres
2. DNI
3. Grado o título profesional
4. Título del trabajo de Investigación
5. Porcentaje de similitud

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, Inga Balbin Manuel Dario , con DNI 25575707 en mi condición de autor de la tesis presentada para optar el TÍTULO PROFESIONAL de Químico Farmacéutico de título "Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* L. (Achiote) frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906", **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud 21% y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima, 6 de junio del 2024.



Manuel Dario Inga Balbin
DNI 25575707
Firma del autor



Luz Rocio Alguiar Bernaola
DNI 09578116
Firma del Asesor

1. Apellidos y Nombres
2. DNI
3. Grado o título profesional
4. Título del trabajo de Investigación
5. Porcentaje de similitud

APlagio UMA - TESIS - POOL - MANUEL 09 - 08 - 2023 FINAL

INFORME DE ORIGINALIDAD

21%	22%	7%	8%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uma.edu.pe Fuente de Internet	12%
2	repositorio.upao.edu.pe Fuente de Internet	3%
3	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	Submitted to Universidad Maria Auxiliadora SAC Trabajo del estudiante	2%
5	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
6	repositorio.usanpedro.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.upsjb.edu.pe Fuente de Internet	1%

DEDICATORIA

Mi fe en Dios ilumina mi camino en cada paso que doy, agradeciendo por su guía constante. También le agradezco por protegerme y otorgar salud a mis queridos padres, quienes son mi apoyo incondicional en todo momento. Su amor y respaldo son invaluableles, y me siento bendecido por tenerlos en mi vida.

Bach. Inga Balbin, Manuel Darío

Estoy sinceramente agradecido por la claridad que ilumina mi camino en cada paso que doy a diario. Reconozco y valoro la protección que he recibido y las bendiciones de salud que han sido otorgadas a mis queridos padres. El apoyo incondicional que siempre encuentro en ellos es un regalo que aprecio profundamente. Me siento realmente afortunado de contar con su amor y respaldo constante en mi vida.

Bach. Laureano Berrocal, Pool Manuel

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a la Universidad María Auxiliadora por proporcionarnos la educación necesaria para nuestro desarrollo profesional y la consecución de nuestras metas establecidas.

También queremos agradecer a nuestros padres, familiares y compañeros por su apoyo constante durante el proceso de investigación.

Asimismo, extendemos nuestro agradecimiento a nuestra asesora, la Mg. Algiar Bernaola, Luz Rocío, por su inquebrantable dedicación y paciencia en cada etapa de este proyecto de investigación.

Bach. Inga Balbin, Manuel Darío

Bach. Laureano Berrocal, Pool Manuel

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. Enfoque y diseño de la investigación.....	9
2.2. Población, muestra y muestreo	9
2.3. Variables de investigación	10
2.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	11
2.5. Plan metodológico para la recolección de datos.....	11
2.6. Procesamiento del análisis estadístico	13
2.7. Aspectos éticos.....	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN	23
4.1. Discusión de resultados.....	23
4.2. Conclusiones	27
4.3. Recomendaciones	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXOS	35
ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos.....	35
ANEXO B. Matriz de consistencia.....	38
ANEXO C. Operacionalización de las variables.....	39
ANEXO D. Certificado Taxonómico.....	40
ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio	41
ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton	42
ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906.....	45
ANEXO H. Evidencias fotográficas	48
ANEXO I. Porcentaje de rendimiento.....	59
ANEXO J. Acta o dictamen de aprobación del comité de ética	60
ANEXO K. Constancia de autorización para recolección de.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Cálculo del porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de las hojas <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	15
Tabla 2. Determinación del pH del extracto etanólico de las hojas <i>Bixa orellana</i> (achiote)	15
Tabla 3. Prueba solubilidad del extracto seco de las hojas <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	16
Tabla 4. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas <i>Bixa orellana</i> L.(achiote)	17
Tabla 5. Resultados promedio de las mediciones de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de las hojas <i>Bixa orellana</i> (achiote)	18
Tabla 6. Pruebas de ANOVA de los halos obtenidos frente a la cepa <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	20
Tabla 7. Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	20
Tabla 8. Prueba de subconjuntos de Tukey	21

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Muestra de tipo hojas <i>Bixa orellana</i> L. (Achiote)	47
Figura 2. Selección de la muestra	47
Figura 3. Lavado de la muestra	47
Figura 4. Procedimiento de secado de la muestra	48
Figura 5. Procedimiento de molienda de la muestra	48
Figura 6. Preparación del macerado del extracto etanólico	48
Figura 7. Procedimiento de filtración del macerado del extracto Etanólico	49
Figura 8. Obtención de extracto seco	49
Figura 9. Obtención de extracto seco	49
Figura 10. Añadiendo al extracto seco el solvente a cada tubo de ensayo para la prueba de solubilidad	49
Figura 11. Resultado de prueba de solubilidad	50
Figura 12. Adición de extracto a los tubos de ensayo	51
Figura 13. Resultado de la marcha fitoquímica	51
Figura 14. Pesado del Agar	52
Figura 15. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica	52
Figura 16. Agar Mueller Hinton	52
Figura 17. Placas preparadas	53
Figura 18. Cepa biológica de tipo: <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	53
Figura 19. Comparación de turbidez mediante el reactivo de Mc. Farland	53
Figura 20. Rotulado de placas	54
Figura 21. Sembrado de la cepa biológicas en las placas	54
Figura 22. Adición de discos en placas	54
Figura 23. Sustancias experimentales y controles	55
Figura 24. Incubación de <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	55
Figura 25. Placas Petri con halos de inhibición	55
Figura 26. Lectura de resultados	56

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

Materiales y métodos: Enfoque cuantitativo, diseño experimental; se empleó 10 kilos de hojas de *Bixa orellana* L.; muestra de 3 kg de hojas; por otro lado, se usaron 10 placas Petri inoculadas con *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Se realizó la marcha fitoquímica y el método microbiológico de difusión en agar, constituida por grupos 25 %, 50 % y 75 % de extracto etanólico y ciprofloxacino 5 µg y etanol 96°.

Resultados: Se detectó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, lactonas α , β -insaturadas, taninos. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de (ANOVA) obteniéndose un ($p < 0,05$). Además, se evidenció halos de inhibición de 12.85 mm para el 50% y 16.56 mm para el 75%; sin embargo, las concentraciones experimentales no superaron al ciprofloxacino 5 µg

Conclusión: El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) presentó efecto antibacteriano en las concentraciones del 50% y 75% sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

Palabras clave: Antibacteriano, *Bixa orellana*, medicina herbaria y *Proteus mirabilis* (Fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: To determine the *in vitro antibacterial* effect of ethanolic extract of leaves of *Bixa orellana* L.(annatto) against *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

Materials and methods: Quantitative approach, experimental design; 10 kilos of leaves of *Bixa orellana* L. were used; sample of 3 kg of leaves; on the other hand, 10 Petri dishes inoculated with *Proteus mirabilis* ATCC 29906 were used. The phytochemical march and the microbiological method of diffusion were carried out on agar, consisting of groups of 25%, 50% and 75% of ethanolic extract and ciprofloxacin 5 µg and ethanol 96°.

Results: The presence of phenolic compounds, flavonoids, alkaloids, α lactones, β-unsaturated acids, and tannins was detected. For statistical analysis, the (ANOVA) test was used, obtaining a ($p < 0.05$). In addition, inhibition halos of 12.85 mm were evidenced for 50% and 16.56 mm for 75%; however, experimental concentrations did not exceed ciprofloxacin 5 µg.

Conclusion: The ethanolic extract of the leaves of *Bixa orellana* L. (annatto) showed antibacterial effect at concentrations of 50% and 75% on strains of *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

Keywords: Antibacterial, *Bixa Orellana*, herbal medicine and *Proteus mirabilis* (Source: MeSH NLM).

I. INTRODUCCIÓN

Proteus mirabilis es una bacteria patógena que causa una variedad de infecciones, a nivel del tracto urinario, sepsis, neumonía y abscesos. Esta bacteria se encuentra en todo el mundo y ha sido reportada como una de las causas más comunes de infecciones del tracto urinario en todo el mundo, especialmente en personas mayores y pacientes hospitalizados. Además, *Proteus mirabilis* también ha sido asociada con la morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos^{1,2}. La bacteria ha generado un grave problema en el tratamiento de infecciones debido a la resistencia a los antibióticos que ha desarrollado³.

Un estudio global de aislados clínicos de *Proteus mirabilis* encontró que esta bacteria fue responsable del 3.3% de las infecciones del tracto urinario en todo el mundo⁴. Según un estudio publicado en 2020 en la revista (BMC) Infectious Diseases, la incidencia anual de infecciones gastrointestinales en Asia fue de 167,9 casos por cada 100.000 habitantes entre 2004 y 2016. Las causas más comunes de estas infecciones incluyen bacterias como *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, y *Salmonella*; la infección del tracto urinario por *Proteus mirabilis* fue el 64% de su población⁵. De acuerdo con los informes de la Organización Mundial de la Salud, las infecciones del tracto urinario son comunes en todo el mundo y afectan a personas de todas las edades y géneros. En el continente africano se estima que la prevalencia mundial de infecciones del tracto urinario en mujeres es del 60%, y del 5-10% en hombres, siendo *Proteus mirabilis* la principal causa de esta infección⁵.

Un estudio en Reino Unido reportó que la incidencia de infecciones de la piel aumentó en un 4,5% en los últimos 10 años, y que la mayoría de las infecciones fueron leves y moderadas, las cuales se debieron principalmente a la bacteria *Proteus mirabilis*⁶. En España, las infecciones de la piel son una causa común de morbimortalidad. Según el Ministerio de Sanidad, en 2020 se registraron más de 1,5 millones de casos de dermatitis, infecciones cutáneas y otros problemas relacionados con la piel causadas por *Proteus mirabilis*⁷.

Según un estudio realizado en Estados Unidos, *P. mirabilis* fue identificado en el 6,2% de las infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados⁸. Otro estudio

de 2019 encontró que *P. mirabilis* fue responsable del 5,5% de las infecciones del tracto urinario en pacientes ambulatorios en los Estados Unidos⁹.

Según la información proporcionada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se observa una variación en la incidencia de infecciones del tracto urinario (ITU) causadas por *Proteus mirabilis* en distintas regiones y países de América Latina. En promedio, aproximadamente el 25% de las mujeres latinoamericanas experimentan al menos una (ITU) a lo largo de su vida, siendo más frecuente en mujeres jóvenes y sexualmente activas. En hombres, la (ITU) es menos frecuente, representando sólo un 5-10% de los casos totales de infección urinaria en la región¹⁰. México reportó que la incidencia de *Proteus mirabilis* fue de alrededor de 1.5 casos por cada 100,000 habitantes, y la tasa de mortalidad asociada puede llegar al 20% en algunos casos graves¹¹.

En una investigación llevada a cabo en una clínica en Perú, se determinó que la prevalencia de *Proteus mirabilis* en pacientes hospitalizados y ambulatorios fue del 1,7% y 3,4%, respectivamente¹². Además, otro estudio realizado en el país demostró que este patógeno se encontraba entre los agentes causantes más frecuentes de infecciones en mujeres¹³.

Proteus mirabilis es una bacteria presente en el tracto intestinal de humanos y animales, que puede causar infecciones en el tracto urinario y otras partes del cuerpo. En el Perú, estas infecciones tienen un impacto negativo en la salud, costos de atención médica y carga económica para pacientes debilitados. La resistencia a antibióticos puede extenderse y propagar enfermedades infecciosas¹⁴.

Por ese motivo, resulta imperativo valorar diferentes alternativas en el manejo de infecciones generadas por *Proteus mirabilis*, que cada vez muestra una resistencia más pronunciada. En este sentido, la búsqueda de agentes antibacterianos potenciales se ha convertido en una necesidad entre los científicos, por lo que se propone el uso integral de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) como alternativa fitoterapéutica que no genere resistencia bacteriana para el tratamiento de infecciones y la recuperación del paciente¹⁵.

Con el fin de enfocar el tema en estudio, se presenta la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906?

Asimismo, se generan las siguientes sub-preguntas:

- ¿Qué tipo de metabolitos secundarios potencialmente responsables del efecto antibacteriano *in vitro* poseerá el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote)?
- ¿A qué concentración el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) presentará efecto antibacteriano *in vitro* frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906?
- ¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) comparado con ciprofloxacino 5 µg frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906?

Proteus mirabilis ATCC 29906 es una cepa de la bacteria *Proteus mirabilis*, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria es gramnegativa, tiene una forma de bacilo y un diámetro aproximado de 0,5 - 0,8 micrómetros y una longitud de 1,5 - 2,5 micrómetros. *P. mirabilis* es conocida por su capacidad de moverse mediante flagelos peritricos y por su capacidad de formar colonias altamente móviles con un característico "enjambre" en medios de cultivo sólidos. Se han identificado varias especies y subespecies de *Proteus*, incluyendo *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *P. penneri*, y se han descrito diversas características moleculares y bioquímicas que las diferencian¹⁶.

"*Bixa orellana* L.", también conocido como Achiote, es un árbol de hoja perenne originario de América tropical y subtropical, desde México hasta Brasil. Su fruto es una cápsula leñosa de color rojo brillante que contiene semillas cubiertas de un pigmento rojo intenso, el cual es utilizado como colorante natural en la industria alimentaria. La composición fitoquímica del Achiote incluye carotenoides, tocotrienoles, ácido linoleico y ácido oleico. Se ha demostrado que el Achiote posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antitumorales, entre otras. La composición botánica de la planta incluye hojas ovaladas y flores de color

rosa o blanco con forma de estrella. La actividad antibacteriana de las hojas de achiote ha sido objeto de estudios científicos, que han demostrado su efectividad contra varias cepas de bacterias patógenas, incluyendo *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los compuestos responsables de esta actividad antibacteriana son principalmente los alcaloides y los flavonoides presentes en las hojas de la planta. Además de su actividad antibacteriana, las hojas de achiote también han demostrado tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, así como beneficios para la salud cardiovascular y el sistema inmunológico. La planta también es rica en vitaminas y minerales, incluyendo vitamina C, hierro y calcio¹⁷.

Collantes M (2019), su objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de tres concentraciones diferentes del extracto hidroetanólico obtenido de las hojas de *Bixa orellana* L. contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175, empleando el método de Kirby-Bauer, como resultados obtuvieron que el extracto al 75% obtuvo una media de 26.38 mm. Al aplicar la prueba ANOVA, se encontró una diferencia estadística significativa ($P=0.00$) entre el extracto de las hojas de *Bixa orellana* L. evaluadas, concluyendo que la concentración del 75% presentó un efecto antibacteriano más eficaz contra la cepa que las otras dos concentraciones evaluadas¹⁸.

Montoya J (2019), su objetivo fue establecer el impacto antimicrobiano del extracto acuoso proveniente de las hojas de la vegetación *Bixa orellana* L. (achiote) a distintas diluciones, en comparación con un control positivo y negativo, frente a cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, para ello realizó pruebas de efecto inhibitorio con 10 repeticiones por cada grupo. El resultado mostró que el extracto de achiote tuvo un efecto inhibitorio en una dilución del 100% (17 mm y 12 mm), concluyendo que el concentrado líquido de las hojas de achiote exhibió una propiedad bactericida contra *Proteus mirabilis* ATCC 14028, sin embargo, su eficacia no superó la de la cefalexina utilizada como control positivo en el estudio¹⁹.

Marcas J, et al. (2022), el objetivo de su investigación fue examinar la acción antibacteriana en un entorno de laboratorio del extracto de metanol extraído de las hojas de *Bixa orellana* L. frente bacterias y *Lactobacillus spp*, para ello evaluaron ocho cepas de referencia ATCC y 22 aislamientos clínicos, como resultados tuvieron que todas las cepas de referencia ATCC, excepto *P. vibria*, *V. parvula* y *L. crispatus*,

fueron altamente susceptibles al extracto, concluyendo que el extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. presentó actividad antibacteriana selectiva contra las bacterias anaerobias asociadas a la vaginosis bacteriana, por otra parte, su efecto sobre las especies de *Lactobacillus* fue limitado²⁰.

Galván C (2019), su objetivo fue evaluar la acción antibacteriana de las hojas de *Bixa orellana* L. en comparación con la azitromicina a 5 µg, contra *Salmonella typhi* ATCC 167, para ello se evaluaron cuatro diluciones en 10 repeticiones, como resultados obtuvieron que el extracto etanólico de achiote mostró halos de inhibición eficaces a partir del 75%. La prueba de Tukey demostró que la azitromicina tuvo mayor efecto antibacteriano, concluyendo que el extracto de achiote tuvo efecto antibacteriano en *Salmonella typhi*, no obstante, menor que la azitromicina, por lo que podría usarse como coadyuvante²¹.

Granados L (2022), su objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos metanólico de *Bixa orellana* L. y etanólico de *Camellia sinensis*, frente a *Streptococcus mutans*, a lo largo de diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas), se utilizó la técnica de difusión en pozos de agar como método de estudio, como resultados obtuvo que el extracto de *Camellia sinensis* y *Bixa orellana* L. mostraron mayor actividad antibacteriana a las 48 horas frente al *Streptococcus mutans*, concluyendo que ambos extractos podrían ser utilizados como agentes antibacterianos coadyuvantes en el tratamiento de *Streptococcus mutans*²².

Como antecedentes internacionales tenemos:

Murillo M (2019), su objetivo fue analizar los efectos inhibitorios del extracto de achiote en cepas de *Streptococcus mutans* a través de un experimento *in vitro*. Se empleó una muestra no aleatoria compuesta por 20 cajas Petri con cepas, las cuales se dividieron en dos grupos de estudio, como resultados obtuvieron que el extracto de *Bixa orellana* L., en una concentración del 50%, exhibió un efecto inhibitorio constante de entre 6-6.25 mm, la concentración del 100% evidenció un halo de 9.4 mm, concluyendo que el extracto de *Bixa orellana* L. no mostró actividad inhibitoria superior a la de la clorhexidina al 0.12% en la cepa de *Streptococcus mutans* evaluada²³.

Kar B, et al. (2022), el objetivo de su investigación fue encontrar la actividad antibacteriana del extracto hidroetanólico de *Bixa orellana* L., el método empleado

fue *in vitro*, con cepas multirresistentes obtenidas de distintas partes del país, como resultados tuvieron que el extracto mostró zona de inhibición entre 13 y 25 mm y (CMI) entre 512 y 2048 µg/mL. En combinación con ampicilina, la (MIC) se redujo de 2 a 10 veces. Análisis GC-MS reveló la presencia de 40 compuestos nuevos en la planta, concluyendo que el extracto hidroetanólico de *B. orellana* L. demostró actividad antibacteriana contra patógenos multirresistentes, solo y en combinación con antibióticos²⁴.

Ahmed S, et al. (2020), el objetivo de su investigación fue realizar un perfil comparativo de extractos de *Bixa orellana* L. para conocer los fitoquímicos, la actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro*, se empleó discos en agar para la evaluación de la actividad antibacteriana, los resultados hallaron que los extractos de hojas contenían cantidades significativamente mayores de fitoquímicos que los extractos de semillas y ramas, concluyendo que los extractos obtenidos a partir de hojas de *B. orellana* L. presentaron una elevada actividad antibacteriana y propiedades antioxidantes eliminadoras de radicales libres significativas²⁵.

Fróes Y, et al. (2020), el objetivo de su investigación fue caracterizar el aceite esencial (AE) en las hojas de *Bixa orellana* en términos de su composición química, toxicidad y actividad antimicrobiana, para ello el (AE) fue extraído mediante hidrodestilación y analizaron su composición química por cromatografía de gases-espectrometría de masas, en los resultados se encontró que el (AE) de las hojas de *Bixa orellana*. presentó actividad antimicrobiana contra los microorganismos probados y una concentración total de fenoles de 320 mg EAT g⁻¹, concluyendo que el (AE) de las hojas de *Bixa orellana* L. tiene potencial como alternativa terapéutica debido a su actividad antimicrobiana y su bajo nivel de toxicidad²⁶.

Bachelor V, et al. (2023), el objetivo de la investigación llevada a cabo por el equipo consistió en identificar la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto acuoso de *Bixa orellana* L., y evaluar su potencial para la curación de lesiones cutáneas en ratas tratadas con el gel que contiene dicho extracto, para ello utilizaron la técnica de difusión en pozos de agar, los resultados mostraron que el extracto acuoso tuvo actividad antioxidante y antimicrobiana y se mezcló en una base de gel para su uso en la curación de la piel, concluyendo que, el extracto acuoso de “urucum” es

efectivo en la curación de la piel en ratas, además de tener actividad antioxidante y antimicrobiana, y puede ser utilizado como fitoterapia²⁷.

La justificación teórica fue ampliar el conocimiento etnofarmacológico de las hojas de "*Bixa orellana* L." (achiote), enfatizando los beneficios terapéuticos de las hojas debido a la poca de información existente sobre sus propiedades farmacológicas. Este proyecto podría contribuir a la medicina natural y ser una fuente importante de nuevos medicamentos para tratar infecciones bacterianas, lo que permitiría a los pacientes tener más opciones de tratamiento. La deforestación y la falta de conciencia en otras regiones del país son una amenaza para el material genético del fruto, lo que hace que sea necesario investigar más acerca de sus propiedades. Dado que la vegetación está al alcance sencillo de los individuos, podría emplearse como una opción terapéutica para abordar infecciones bacterianas.

La justificación práctica fue motivar a otros estudiantes de la carrera de farmacia y bioquímica para investigar este producto natural y descubrir nuevas moléculas con capacidad antibacteriana que permitan sintetizar nuevos medicamentos antibióticos.

La justificación metodológica evidenció que las técnicas utilizadas en el proyecto fueron rigurosamente validadas y empleadas para demostrar la fiabilidad y seguridad de los resultados obtenidos²⁸.

El objetivo general del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

Entre los objetivos planteados, se contemplan los siguientes objetivos secundarios:

- Identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) potencialmente responsables del efecto antibacteriano *in vitro*.
- Determinar a qué concentración el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

- Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) con ciprofloxacino 5 µg frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

La hipótesis planteada para el desarrollo de la investigación es la siguiente:

El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Enfoque y diseño de la investigación

Enfoque: El enfoque utilizado en este estudio fue cuantitativo, puesto que se llevó a cabo mediciones que permiten identificar patrones, formular nuevas hipótesis y generar teorías.²⁹

Diseño: Experimental, ya que se controló y manipuló la variable independiente para observar su impacto en la variable dependiente y así poder establecer relaciones causales entre ellas.²⁹

Explicativo: Dado que su objetivo es investigar y comprender la relación causal entre las variables y eventos analizados.³⁰

Transversal: Dado que la recopilación de datos se llevó a cabo en un solo momento.³⁰

2.2. Población, muestra y muestreo

10 kilos de hojas de "*Bixa orellana* L." (Achiote) que fueron obtenidos en el Centro Poblado San Lorenzo, distrito de Yarina, Provincia de coronel Portillo en el departamento de Ucayali.

La muestra vegetal fue de 3 kg de hojas "*Bixa orellana* L." (achiote) las cuales fueron obtenidas en el Centro Poblado San Lorenzo, distrito de Yarina, Provincia de coronel Portillo en el departamento de Ucayali, entre las 6:00 a 6:30 am.

La comunidad biológica estuvo integrada por *Proteus mirabilis* ATCC 29906 la cual fue proporcionada por la empresa Santa Rosa (E.I.R.L.) especialista en laboratorio y análisis clínicos, la cepa tiene como numero de catalogo: 01215 y lote 1215-07**.

Criterios de inclusión:

- Hojas de "*Bixa orellana* L." recolectadas en el departamento de Ucayali.
- Hojas de la especie "*Bixa orellana* L." confirmadas mediante análisis botánico.
- Hojas de plantas sanas y sin daños evidentes.

Criterios de exclusión:

- Hojas de otras especies distintas a "*Bixa orellana* L.".

- Hojas de "*Bixa orellana* L." obtenidas de diferentes áreas geográficas del país.
- Hojas de plantas enfermas o dañadas.

El muestreo fue no probabilístico.

2.3. Variables de investigación

Variable Independiente: Extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* L. (achiote)

Definición conceptual: Sustancias obtenidas al disolver los componentes solubles en etanol de las hojas de *Bixa orellana*. Este proceso de extracción busca concentrar ciertos compuestos presentes en las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote)²³, siendo reportada como una especie vegetal conocida por sus propiedades y puede contener diversos compuestos bioactivos.

Definición operacional: Para la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote), se recurrió a una serie de pasos a condiciones específicas para mantener la mayor cantidad de metabolitos secundarios, realizándose proceso de separación, preparación, concentración, ensayos preliminares, reconocimiento de metabolitos secundarios y actividad microbiológica.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano *in vitro* frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906

Definición conceptual: Potencial de un agente para inhibir el crecimiento de bacterias, el cual actúan interfiriendo en diferentes procesos vitales de las bacterias, como la síntesis de proteínas o la pared celular³¹.

Definición operacional: Se aplicó la técnica de difusión en agar con el fin de evaluar las dimensiones de los halos de inhibición que surgen a partir de los discos de experimentación³².

2.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Fue la observación. Para el análisis fitoquímico, se llevó a cabo un tamizaje preliminar, mientras que para el análisis microbiológico se empleó las técnicas de Kirby-Bauer³³.

Se utilizó una ficha de observación como instrumento para la recolección de datos de ambos análisis³³.

2.5. Plan metodológico para la recolección de datos

2.5.1. Recolección y reconocimiento

Las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) recolectadas en el Centro Poblado San Lorenzo, distrito de Yarina, Provincia de coronel Portillo en el departamento de Ucayali, se guardaron en un envase de Poliestireno para su transporte a Lima, posteriormente un experto realizó la identificación taxonómica de la especie vegetal, como se indica en el anexo D. El proceso de recolección se efectuó entre las 6:00 a 6:30 am el día 11 de mayo del 2023, siendo detallado en el anexo K “constancia de autorización para recolección de la muestra”.

Preparación de la muestra

La limpieza de las hojas se realizó con un flujo continuo de agua potable y posterior enjuague con agua estéril. Luego se dejó escurrir a temperatura ambiente por un tiempo entre 15 a 20 minutos. Finalmente, la muestra fue distribuida sobre bandejas con papel Kraft y llevadas a una estufa para el proceso de secado a una temperatura de 40° C por un tiempo estimado de 24 horas. Una vez completado este procedimiento, se procedió a moler las hojas secas con el fin de llevar a cabo el proceso de maceración³⁴.

2.5.2. Preparación del extracto

Para la maceración de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) se requirió de un frasco color ámbar con capacidad de 1 L y alcohol etílico al 96 %, el cual actuó como disolvente para remover los metabolitos primarios y secundarios. La técnica fue por maceración dinámica por 5 días. Al finalizar el macerado, el extracto fue filtrado y se llevó a la estufa para eliminar el disolvente a una

temperatura de 40°C por 72 horas con la finalidad de obtener el extracto crudo o seco para la realización de las pruebas posteriores³⁴.

2.5.3. Porcentaje de rendimiento

Se empleó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de rendimiento³⁵.

Donde:

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

- %E = Porcentaje de rendimiento
- Pf = Peso final (Extracto seco obtenido)
- Pi = Peso inicial (Muestra molida)

2.5.4. Determinación de pH

Para la determinación del (pH) se diluyó el extracto en una solución etanólica al 96%, posteriormente se realizó la calibración del potenciómetro con soluciones de (pH) conocidas, preferiblemente en el rango de pH 4, 7 y 10. Finalmente se colocó el electrodo en la solución que contenía el extracto *Bixa orellana* L. (achiote) y se registró la lectura por triplicado.

2.5.5. Prueba de solubilidad

Para llevar a cabo este ensayo, se necesitó 0,5 g del extracto seco y 1 mL de los siguientes solventes: éter de petróleo, diclorometano, cloroformo, butanol, etanol, metanol, agua destilada³⁴.

2.5.6. Marcha fitoquímica del extracto

La técnica de Olga Lock fue empleada para llevar a cabo el tamizaje fitoquímico preliminar, se utilizó los siguientes reactivos en 12 tubos de ensayo con 1 mL del extracto fluido: NaOH 10% (para Antocianinas), Cloruro férrico (para Compuestos fenólicos), Gelatina-sal (para Taninos), Gelatina (para Taninos), Wagner (para Alcaloides), Dragendorff (para Alcaloides), Shinoda (para Flavonoides), Baljet (para Lactonas α , β insaturadas), Borntrager (para Antraquinonas), Liebermann- Burchard (para Terpenos y

esteroides) y Mayer (para Alcaloides). Además, se utilizó los índices Afro simétrico y de espuma para la detección de saponinas³⁴.

2.5.7. Análisis Microbiológico

Activación de las cepas *Proteus mirabilis* ATCC 29906: Este proceso se llevó a cabo utilizando Kwik-stik, el procedimiento consistió en presionar la ampolla ubicada en la parte superior del contenedor y dejar salir el líquido hidratante hacia la parte inferior. Al concluir este procedimiento se obtuvo una muestra de la solución y se transfirió a agar soya tripticasa³⁴.

Activación de las cepas: Para ello se preparó una suspensión directa de la cepa y se ajustó su turbidez de acuerdo con la escala 0,5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de $(1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL})$ ³⁴.

Inoculación de las Placas: Se realizó en placas con agar Mueller-Hinton, el cual se preparó según las indicaciones del fabricante. La cepa se sembró con un hisopo estéril mediante la técnica de estrías cruzadas para garantizar un sembrado más uniforme por el medio de cultivo³⁴.

Preparación de los discos: Estos se prepararon a partir de papel Whatman N° 1 con un diámetro de 6 mm los cuales fueron esterilizados, finalmente estos se empaparon con las siguientes sustancias para realizar la técnica de Difusión en agar³⁴.

- Grupo extracto etanólico de hojas de "*Bixa orellana* L." (achiote) 25 %
- Grupo extracto etanólico de hojas de "*Bixa orellana* L." (achiote) 50 %
- Grupo extracto etanólico de hojas de "*Bixa orellana* L." (achiote) 75 %
- Grupo control: Discos de Ciprofloxacino 5 µg
- Grupo control: Discos embebidos con alcohol al 96 %

Luego se llevó a incubar todas las placas, en la estufa a 37°C de 24 a 48 horas. Finalmente, estos resultados se evaluaron mediante la "Escala de Duraffourd"³⁴.

2.6. Procesamiento del análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la prueba de Kirby-Bauer fueron procesados mediante dos programas informáticos: Excel y (SPSS) versión 27. Para realizar pruebas

estadísticas se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, ambos realizados en el paquete estadístico SPSS.

2.7. Aspectos éticos

Se aplicó normas de seguridad biológica en la manipulación de las muestras durante la realización de este estudio, y se siguieron estrictamente los protocolos de buenas prácticas de laboratorio para asegurar la precisión y confiabilidad de los datos obtenidos³⁶.

III. RESULTADOS

3.1. Cálculo del porcentaje de rendimiento

Tabla 1. Cálculo del porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* L. (achiote).

Muestra	Muestra molida (Pi)	Cantidad extracto seco (Pf)	de Rendimiento (%E)
Hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote).	200 gr	9.75 gr	4.88%

Donde: %E (rendimiento), Pf = peso final, Pi = peso inicial

En la tabla 1, se evidencia el cálculo del porcentaje de rendimiento del 4.88% para la obtención del extracto etanólico de las hojas *Bixa Orellana* L.

3.2. Determinación de pH del extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* L. (achiote).

Tabla 2. Determinación del pH del extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* (achiote)

N°	Resultados	Parámetros de pH		
		Acido	Neutro	Alcalino
1	5.4	1 – 6.9	7	7.1 – 14
2	5.5	1 – 6.9	7	7.1 – 14
3	5.3	1 – 6.9	7	7.1 – 14
Promedio	5.4			

En la tabla 2 se evidencia el resultado del análisis de pH del extracto etanólico de las hojas *Bixa Orellana* L. (achiote), con un valor de 5.4 de pH el cual indica ser de naturaleza ligeramente ácida.

3.3. Prueba de solubilidad

Tabla 3. Prueba solubilidad del extracto seco de las hojas *Bixa orellana* L. (achiote)

TUBO	SOLVENTE	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	+
N° 2	Diclorometano	+
N° 3	Cloroformo	+
N° 4	Butanol	+
N° 5	Etanol 96	+++
N° 6	Etanol 70	+
N° 7	Metanol	++
N° 8	Agua destilada	-

Leyenda:

- Insoluble: (-)
- Poco soluble: (+)
- Medianamente soluble: (++)
- Muy soluble: (+++)

En la tabla 3, se presenta el ensayo de solubilidad realizado con el extracto seco de las hojas *Bixa orellana* L.(achiote). El resultado de mayor solubilidad (+++) fue observado en el solvente etanol 96, seguido del metanol medianamente soluble (++) . Por otro lado, cloroformo, diclorometano, éter de petróleo, etanol 70 y butanol mostraron poca solubilidad (+) e insoluble para agua destilada.

3.4. Marcha fitoquímica

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* L.(achiote)

TUBO	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
N° 1	Borntrager	Antraquinonas	-
N° 2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
N° 3	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	+
N° 4	Dragendorff	Alcaloides	++
N° 5	Mayer	Alcaloides	+
N° 6	Wagner	Alcaloides	+
N° 7	Baljet	Lactonas α , β -insaturadas	++
N° 8	Gelatina	Taninos	+
N° 9	Gelatina-sal	Taninos	++
N° 10	NaOH 10%	Antocianinas	+
N° 11	Espuma	Saponinas	-
N° 12	Shinoda	Flavonoides	+++

Leyenda:

- (-) Ausente
- (+) Mínimo
- (++) Mediano
- (+++) Abundante

En la tabla 4, se muestra abundante presencia (+++) de, compuestos fenólicos y flavonoides, estos metabolitos se identificaron empleando los reactivos Cloruro férrico y Shinoda. Además, se encontró una presencia mediana (++) de alcaloides, lactonas α , β -insaturadas, taninos mediante los reactivos como Dragendorff, Baljet, Gelatina-sal. También se evidenció una mínima presencia (+) de terpenos y esteroides, alcaloides, taninos y antocianinas empleando los reactivos Liebermann-Burchard, Mayer, Wagner, Gelatina, (NaOH) 10%. Ausencia de (-) Antraquinonas y Saponinas.

3.5. Ensayo microbiológico

Tabla 5. Resultados promedio de las mediciones de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* L.(achiote)

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	Etanol 96 °	25%	50%	75%	Ciprofloxacino 5 µg
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	6	7.88	12.86	16.58	30.49
	6	7.85	12.84	16.55	30.47
	6	7.86	12.83	16.55	30.54
	6	7.90	12.89	16.59	30.48
	6	7.85	12.85	16.56	30.53
	6	7.84	12.83	16.54	30.45
	6	7.86	12.87	16.56	30.49
	6	7.82	12.83	16.53	30.51
	6	7.87	12.85	16.55	30.46
	6	7.88	12.88	16.57	30.50
Media	6	7.86	12.85	16.56	30.49

Los resultados promedio de los halos de inhibición expresados en mm se presentan en la tabla 5, los cuales representan el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas *Bixa orellana* L.(achiote) contra cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

De acuerdo con la escala de Duraffourd, el control negativo (Etanol 96%) y la concentración del 25%, muestran mediciones inferiores a 8 mm, el cual indica una nula actividad antibacteriana. Por otra parte, la concentración del 50%, la cepa presenta una sensibilidad baja con 12.85 mm; además, a una concentración del 75%, la cepa demuestra ser medianamente sensible con 16.56 mm. En cuanto al control positivo, el ciprofloxacino 5 ug, la cepa presenta una alta sensibilidad con un valor de 30.49 mm.

3.6. Contrastación de hipótesis

Se emplearon pruebas estadísticas paramétricas para contrastar la hipótesis en un estudio que evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) en diferentes concentraciones (25%, 50% y 75%) frente

cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Se utilizaron controles de ciprofloxacino 5 µg y etanol 96 °. Cada grupo se replicó 10 veces y los resultados se interpretaron siguiendo una escala estandarizada.

3.6.1. Contrastación de hipótesis general

H0: El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) no presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

H1: El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

Se efectuaron análisis estadísticos inferenciales para contrastar la hipótesis planteada. Los resultados se encontraron dentro de los límites de confianza, respaldando así la suposición formulada. Además, se evaluó la media de los diámetros de inhibición utilizando la escala de sensibilidad de Duraffourd y Lapraz.

Se pudo observar que en la cepa *Proteus mirabilis* ATCC 29906, el control negativo (Etanol 96°) no mostró actividad antibacteriana con un diámetro del disco de 6.00 mm y una media de $6.00 \pm 0,00000$. Al evaluar el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) en la concentración del 25%, obtuvo una sensibilidad nula con una media de $7,8610 \text{ mm} \pm 0,02283$; por otro lado, al 50% se muestra una sensibilidad baja con una media de $12,8530 \text{ mm} \pm 0,02163$; además al 75% se evidenció una sensibilidad media con una media de $16,5580 \text{ mm} \pm 0,01814$, de igual importancia la cepa es sumamente sensible para el control ciprofloxacino 5µg ($30,4920 \text{ mm} \pm 0,02898$).

Para el análisis estadístico inferencial se empleó el análisis de varianza (ANOVA), el cual permitió comparar las medias de los diversos grupos estudiados, que incluyen el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) en concentraciones del 25%, 50% y 75%, así como el control positivo (Ciprofloxacino 5 µg) y el control negativo (Etanol 96°). El segundo análisis utilizado fue la prueba de comparaciones múltiples o test de Tukey, a fin de evaluar entre los tratamientos y determinar cuál de ellos fue el más efectivo.

Tabla 6. Pruebas de (ANOVA) de los halos obtenidos frente a la cepa *Proteus mirabilis* ATCC 29906

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	Entre grupos	3786,988	4	946,747	2193801,087	0,000
	Dentro de grupos	0,019	45	0,000		
	Total	3787,008	49			

La prueba de ANOVA se empleó para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos mediante la comparación de sus medias. En la tabla 6, se observó un resultado con un valor de $p < 0.05$ (sig), el cual evidencia que hay diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en la cepa *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Para determinar cuáles medias son estadísticamente diferentes, se realizó un análisis POST HOC utilizando la prueba de Tukey.

Tabla 7. Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de *Proteus mirabilis* ATCC 29906

Comparaciones múltiples						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ciprofloxacino 5ug	Etanol 96 °	24,49200*	0,00929	0,000	24,4656	24,5184
	25 %	22,63100*	0,00929	0,000	22,6046	22,6574
	50%	17,63900*	0,00929	0,000	17,6126	17,6654
	75%	13,93400*	0,00929	0,000	13,9076	13,9604
Etanol 96 °	Ciprofloxacino 5ug	-24,49200*	0,00929	0,000	-24,5184	-24,4656
	25 %	-1,86100*	0,00929	0,000	-1,8874	-1,8346
	50%	-6,85300*	0,00929	0,000	-6,8794	-6,8266
	75%	-10,55800*	0,00929	0,000	-10,5844	-10,5316

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

La prueba de Tukey es un procedimiento estadístico que permite llevar a cabo comparaciones múltiples entre grupos. Al analizar la tabla 7, se puede observar que los valores de significancia bilateral son inferiores a 0.05 en las comparaciones entre el control positivo Ciprofloxacino 5ug y los grupos experimentales, lo cual indica diferencias estadísticamente significativas. Por lo que se interpreta efecto inhibitor a favor del grupo control positivo frente la cepa *Proteus mirabilis* ATCC 29906, no obstante, el grupo experimental 25% evidencia un efecto inhibitor nulo mediante el contraste con la escala de Duraffourd y Lapraz.

De igual importancia, se evidencia que los valores de significancia bilateral son inferiores a 0.05 en las comparaciones entre el control negativo Etanol 96° y los grupos experimentales en el análisis microbiológico. Estos hallazgos demostraron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación al 25% 50% y 75% y el grupo de control negativo (Etanol 96°), el cual son a favor de los grupos experimentales evidenciando la actividad antibacteriana.

Tabla 8. Prueba de subconjuntos de Tukey

<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906						
HSD Tukey ^a						
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Etanol 96 °	10	6,0000				
25 %	10		7,8610			
50%	10			12,8530		
75%	10				16,5580	
Ciprofloxacino 5ug	10					30,4920
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se puede notar que todas las medidas de los tratamientos implementados presentan disparidades significativas entre sí. Además, se observa que a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Bixa*

orellana L. (achiote), se observa una mayor inhibición bacteriana y la formación de halos más grandes, lo que se representa en una especie de patrón escalonado. En el caso de las cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 29906, se encontró que el extracto al 25% presentó un halo de 7.86 mm por lo que se entendió que su efecto inhibidor fue (nulo); por otro lado, al 50% y 75% evidenció halos de 12.85 mm (baja sensibilidad) 16.56 mm (medianamente sensible) respectivamente; lo cual, evidencia una buena sensibilidad de la bacteria frente al extracto. Pero, el control positivo Ciprofloxacino 5ug manifestó el mayor halo de inhibición con 30.49mm.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Discusión de resultados

Proteus mirabilis ATCC 29906 se ha convertido en una bacteria inquietante en la actualidad debido a su capacidad para causar una amplia gama de infecciones y su potencial resistencia a múltiples antibióticos. Esta bacteria se propaga fácilmente entre las personas, lo que incrementa considerablemente el riesgo de transmisión tanto en hospitales como en comunidades. La aparición de cepas resistentes, como aquellas que muestran resistencia al ciprofloxacino en *Proteus mirabilis*, ha provocado un significativo aumento en las infecciones relacionadas con esta bacteria. Para hacer frente a este desafío, resulta crucial llevar a cabo una vigilancia epidemiológica rigurosa, adoptar prácticas adecuadas de higiene y fomentar el desarrollo de nuevos antibióticos.

De acuerdo con el objetivo general en la tabla 5, se identificó que el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) presentó actividad antibacteriana al 50% y 75% frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906 con media de (12,8530 mm; y 16,5580 mm respectivamente). Coincide con **Marcas J, et al. (2022)**, los cuales examinaron el efecto antimicrobiano del extracto metanólico de hojas de *Bixa orellana* L., hallando que todas las cepas de referencia ATCC fueron altamente susceptibles al extracto²⁰. La coincidencia en los estudios confirma el efecto antibacteriano de *Bixa orellana* L. Respalda su potencial antimicrobiano. La composición química, condiciones de crecimiento y cepas bacterianas influyen en su actividad antibacteriana. Así mismo coincide con **Kar B, et al. (2022)**, quienes analizaron el efecto antibacteriano de *Bixa orellana* L., mediante un estudio *in vitro*. Hallando que el extracto manifestó zona de inhibición entre 13 y 25 mm y (CMI) entre 512 y 2048 µg/mL frente la cepa en estudio, indicando que *B. orellana* L. tuvo efecto antibacteriano contra patógenos multirresistentes, solo y en combinación con antibióticos²⁴.

De acuerdo con el objetivo específico 1, en la tabla 4, se realizó la marcha fitoquímica, evidenciándose los compuestos fenólicos y flavonoides con abundante presencia; mediana presencia de alcaloides, lactonas α , β -insaturadas y taninos. Corroborando con el estudio de **Ahmed S, et al. (2020)**, quienes identificaron fitoconstituyentes en el extracto de *Bixa orellana* L. como carbohidratos, alcaloides,

glucósidos, cumarinas, taninos, fenoles, flavonoides, saponinas y proteínas, evidenciando que las hojas de *B. orellana* L. presentaron efecto antibacteriano, propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales libres significativas²⁵. La coincidencia en los resultados del análisis fitoquímico en los estudios de Perú y Bangladesh podría deberse a la presencia común de metabolitos en la planta *Bixa orellana* L., como compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides y taninos. Los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en las hojas de *Bixa orellana* L., conocida comúnmente como Achiote, exhiben un mecanismo de acción antibacteriano contra *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Estos compuestos ejercen su efecto antibacteriano a través de diferentes mecanismos. En primer lugar, actúan como agentes bactericidas al dañar la membrana celular de las bacterias. Los compuestos fenólicos y flavonoides pueden interaccionar con los lípidos de la membrana, alterando su estructura y permeabilidad. Esto conduce a la pérdida de integridad de la membrana y a la fuga de componentes celulares esenciales, lo que resulta en la muerte de las bacterias³⁷.

Además, estos compuestos fenólicos y flavonoides poseen propiedades antioxidantes que contribuyen a su actividad antibacteriana. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas durante el metabolismo bacteriano y pueden dañar las células bacterianas. Los compuestos fenólicos y flavonoides actúan como agentes antioxidantes, neutralizando las (ROS) y evitando así el daño oxidativo en las bacterias. Otro mecanismo de acción importante de los compuestos fenólicos y flavonoides es su capacidad para inhibir enzimas bacterianas clave. Estos compuestos pueden interferir con la actividad enzimática necesaria para la supervivencia y reproducción de las bacterias, lo que afecta negativamente su crecimiento y viabilidad³⁸.

De acuerdo con el objetivo específico 2, se identificó que el extracto etanólico de las hojas de (achiote) presentó acción bactericida frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906, en concentraciones del 50% y 75%. Así mismo se evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.000$) del 25%, 50% y 75% de experimentación y el control negativo (Etanol 96°). Semejante al resultado de **Collantes M (2019)**, quien analizó la acción bactericida de las hojas de *Bixa orellana* L. contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175, empleando la técnica de difusión en pozos de agar, obteniendo que la prueba ANOVA manifestó un ($P = 0.00$) en las

concentraciones de extracto hidroetanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. evaluadas; lo que lo llevó a concluir que la concentración al 75% presentó un mayor efecto inhibitorio que las dos concentraciones evaluadas¹⁸. Esto sugiere que la concentración del 75% contiene una mayor cantidad de compuestos activos con propiedades antibacterianas. Sin embargo, los controles utilizados aún mostraron un efecto inhibitorio superior, lo que puede deberse a la mayor potencia y actividad antibacteriana de los compuestos presentes en los controles en comparación con los de los extractos de *Bixa orellana* L. Corroborándose con el estudio **Galván C (2019)**, quien evaluó la acción bactericida de *Bixa orellana* L., frente *Salmonella typhi* ATCC 167, obteniendo que (Azitromicina, P=0.00), así mismo la concentración al 75% presentó halos de inhibición eficaz, evidenciando que el achiote presentó efecto antibacteriano frente la cepa estudiada²¹. En los estudios con extractos de *Bixa orellana* L.(achiote), la concentración del 75% de los extractos mostró un mayor efecto inhibitorio, lo que indicó que esta concentración específica presenta compuestos activos más potentes en la planta.

De acuerdo con el objetivo específico 3, se evidenció que en *Proteus mirabilis* ATCC 29906 las medias de los diámetros en concentraciones del 25%, 50% y 75% del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote), fueron inferiores en comparación con el obtenido por el fármaco de referencia Ciprofloxacino 5 µg el cual indicó que el agente bactericida empleado obtuvo un diámetro de inhibición mayor con (30,49 mm). El mismo que coincide con **Montoya J (2019)**, quien determinó el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas de la planta *Bixa orellana* L. frente a cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028. Obteniendo que el extracto acuoso de las hojas de achiote presentó una acción bactericida contra *Proteus mirabilis* ATCC 14028 en la concentración del 100% (17 mm y 12 mm), no obstante, no superó el efecto inhibitorio del control positivo cefalexina¹⁹. Esto puede ser debido a la mayor potencia y actividad antibacteriana de los fármacos, así como a posibles diferencias en la concentración y pureza de los compuestos presentes en los extractos de la planta. Así mismo, se corrobora con **Murillo M (2019)**, quien analizó los efectos inhibitorios del extracto de achiote en *Streptococcus mutans*, obteniendo que las concentraciones del 50% y 100% presentaron efecto inhibitorio frente la bacteria estudiada; aunque, estas concentraciones no fueron superiores al control positivo clorhexidina 0.12%²³. En los dos estudios con extractos de *Bixa orellana* L. (achiote). El extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote)

presenta un efecto antibacteriano inferior en comparación con el ciprofloxacino 5 µg frente a *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Esto se debe a varias razones. En primer lugar, el ciprofloxacino es un antibiótico sintético diseñado específicamente para combatir infecciones bacterianas, mientras que el extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. contiene compuestos fenólicos y flavonoides naturales que, si bien tienen propiedades antibacterianas, pueden ser menos potentes y específicos en su acción³⁹.

Además, el ciprofloxacino pertenece a una clase de antibióticos conocida como fluoroquinolonas, que actúan inhibiendo una enzima esencial para el proceso de replicación del (ADN) bacteriano. Esto interfiere directamente con la capacidad de las bacterias para multiplicarse y crecer, lo que resulta en su eliminación. Por otro lado, los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. pueden tener múltiples mecanismos de acción, como dañar la membrana celular y neutralizar especies reactivas de oxígeno, pero su eficacia puede ser menor y menos específica en comparación con el ciprofloxacino. Finalmente, la concentración de ciprofloxacino utilizada en el estudio (5 µg) puede ser más alta que la concentración de compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. La dosis de un compuesto antibacteriano es un factor importante que determina su efectividad. Es posible que utilizando una concentración más alta del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. se obtengan resultados más favorables en términos de actividad antibacteriana.

Las hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) presentan propiedades antibacterianas prometedoras debido a los compuestos fenólicos y flavonoides que contienen. Estos compuestos tienen la capacidad de combatir infecciones bacterianas y pueden ser una alternativa accesible y de bajo costo para el tratamiento en comunidades con recursos limitados. Aunque se requieren más estudios, estas bondades prometedoras resaltan el potencial de las plantas medicinales en beneficio de la población como una fuente valiosa de compuestos antibacterianos.

4.2. Conclusiones

- El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) a una concentración de 75% presentó efecto antibacteriano *in vitro* medianamente sensible con un halo de inhibición de 16.56 mm frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.
- En la marcha fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) se identificó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, lactonas α , β - insaturadas y taninos, estos compuestos se consideraron posibles responsables de la actividad antibacteriana observada contra las cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 29906.
- Las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) al 25% 50% y 75% presentaron efectos antibacterianos con nula sensibilidad, baja sensibilidad y mediana sensibilidad, respectivamente.
- El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L.(achiote) a concentraciones del 25%, 50% y 75% no superan los halos de inhibición del ciprofloxacino 5 μ g frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906.

4.3. Recomendaciones

- Se sugiere llevar a cabo ensayos adicionales utilizando diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. para determinar la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Esto permitiría obtener una mayor precisión en la evaluación de la actividad antibacteriana y establecer el rango de concentraciones efectivas.
- Se sugiere llevar a cabo pruebas de actividad sinérgica utilizando el extracto de *Bixa orellana* L. en combinación con otros agentes antimicrobianos comúnmente utilizados contra *Proteus mirabilis*. Esto permitirá evaluar la posible sinergia entre el extracto y los antimicrobianos convencionales, lo que podría conducir a un enfoque terapéutico más efectivo y reducir la resistencia bacteriana.
- Llevar a cabo investigaciones adicionales para comprender los posibles mecanismos de acción responsables de la actividad biológica observada. Esto podría incluir pruebas farmacológicas in vivo, *in vitro*. La comprensión de los mecanismos subyacentes puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.
- Se sugiere realizar estudios de estabilidad y formulación para futuras aplicaciones clínicas o farmacéuticas y evaluar diferentes formas de formulación que garanticen su estabilidad y biodisponibilidad, esto es importante para asegurar la eficacia y calidad del producto final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morales S, Yepes J, Prada J, Torres A. Enterobacteria in the 21st century: A review focused on taxonomic changes. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2019;13(4):265–73. Available from: <https://doi.org/10.3855/jidc.11216>
2. Kang E, Crouse A, Chevallier L, Pontier S, Alzahrani A, Silué N, et al. Enterobacteria and host resistance to infection. *Mamm Genome* [Internet]. 2018;29(7–8):558–76. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00335-018-9749-4>
3. Armbruster C, Mobley H, Pearson M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* [Internet]. 2018;8(1):1–73. Available from: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0009-2017>
4. Shelenkov A, Petrova L, Fomina V, Zamyatin M, Mikhaylova Y, Akimlin V. Multidrug-resistant *proteus mirabilis* strain with cointegrate plasmid. *Microorganisms* [Internet]. 2020;8(11):1–13. Available from: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111775>
5. Belete M, Saravanan M. A Systematic Review on Drug Resistant Urinary Tract Infection Among Pregnant Women in Developing Countries in Africa and Asia; 2005– 2016. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2020;13(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.2147/IDR.S250654>
6. Rice C, Kely S, Obrien S, Melaugh E, Ganancias J, Chai Z. Novel Phage-Derived Depolymerase with Activity against *Proteus mirabilis* Biofilms. *Microorganisms* [Internet]. 2021;9(10):1–20. Available from: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102172>
7. Maldonado A, Grandioso D, Rico A, García J, García S. The BriefCase: *Proteus mirabilis* Causing Coraliform Lithiasis and Bacteremia in an Elderly Catheterized Patient. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2022;60(10):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1128/jcm.02413-21>
8. Kiani D, Santus W, Kiernan K, Behnsen J. *Proteus mirabilis* Employs a Contact-Dependent Killing System against Competing Enterobacteriaceae.

- mSphere [Internet]. 2021;6(4):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1128/msphere.00321-21>
9. Bux A, Mustafa A, Niazi M, Manchandani U, Mobarakai N, Lafferty J, Chavez V. Multivalvular infective endocarditis with *Proteus mirabilis*. IDCases [Internet]. 2022;27(1):1–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01429>
 10. Drzewiecka, D. Structural and Serological Characterization of the O Antigen of *Proteus mirabilis* Clinical Isolates Classified into a New *Proteus* Serogroup, O84. Int J Mol Sci [Internet]. 2023;24(5):1–11. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms24054699>
 11. Ortega A, Hernandez E, Gómez T, Pedraza J. Antimicrobial Activity of Spices Popularly Used in Mexico against Urinary Tract Infections. Antibiotics [Internet]. 2023;12(2):1–24. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020325>
 12. Miranda J, Pinto J, Faustino D, Sánchez B, Ramirez F. Antimicrobial resistance of uropathogens in older adults in a private clinic in Lima, Peru. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2019;36(1):87–92. Available from: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3765>
 13. Ramírez B. Prevalencia y resistencia antibiotica de uropatógenos en mujeres atendidas en el hospital III Iquitos ESALUD de enero a marzo 2020 [Internet]. [Tesis para obtener el título profesional de Licenciado en tecnología médica]. Universidad Científica del Peru; 2021. Available from: <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/1355>
 14. Li Z, Peng C, Zhang G, Shen Y, Zhang Y, Liu C, Liu M, Wang F. Prevalence and characteristics of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* from broiler farms in Shandong Province, China. Poult Sci [Internet]. 2022;101(4):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101710>
 15. Mantilla L, Buitrago E, Guerrero C, Navarro Y, Alvarado J. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina en niños adquirida en la comunidad. Reporte de casos. Rev la Univ Ind Santander Salud [Internet]. 2021;53(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.18273/saluduis.53.e:21030>

16. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiologia Medica [Internet]. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanábana Koogan; 2017. [Citado el 11 de Feb del 2024]. 834 p. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1083675>
17. Getu B. *Bixa orellana* L. (Annatto Bixa): A Review on Use, Structure, Extraction Methods and Analysis. J Agron Technol Eng Manag [Internet]. 2022;5(1):1–10. Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20230018075>
18. Collantes M. Efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* L (achiote) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo – 2018 [Internet]. [Tesis para obtener el título profesional de cirujano dentista] Universidad Católica los Ángeles de Chimbote; 2019. Available from: <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/11178>
19. Montoya J. Efecto antibacteriano del extracto acuoso de *bixa orellana* L. comparada con cefalexina, sobre *proteus mirabilis* atcc 14028 estudio *in vitro* [Internet]. [Tesis para obtener el título profesional de Médico Cirujano]. Universidad César Vallejo; 2019. Available from: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/29805>
20. Marcas J. Romero L. Tipiani O. Loyola S. Tamariz J. Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de hojas de *Bixa orellana* L.L. contra bacterias anaerobias asociadas a la vaginosis bacteriana y *Lactobacillus* spp. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet].2022;39(4):408–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2022.394.11978>
21. Galván C. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la hoja de *bixa orellana* L. sobre *salmonella typhi* atcc 167 comparado con Azitromicina [Internet]. [Tesis para obtener el título profesional de Médico Cirujano]. Universidad César Vallejo; 2019. Available from: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/29995?locale-attribute=es>
22. Granados L. Evaluación antibacteriana *in vitro* de *Bixa orellana* L. en comparación a *Camellia sinensis* frente al *Streptococcus mutans* (ATCC

- 25175) [Internet]. [Tesis para obtener el grado de cirujano dentista] Universidad Privada Juan Bautista; 2022. Available from: <https://repositorio.upsjb.edu.pe/handle/20.500.14308/4316>
23. Murillo M. Estudio *in vitro* del efecto inhibitorio del extracto de achiote (*Bixa orellana*) sobre cepas de streptococcus mutans [Internet]. [Tesis para obtener el grado de odontólogo] Universidad Central de Ecuador; 2019. Available from: <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c5399b89-5e2b-4755-9d46-7444ea7fc5e9/content>
24. Kar B Chandar B. Rachana S. Bhattacharya H. Bhattacharya D. Antibacterial and genotoxic activity of *Bixa orellana*, a folk medicine and food supplement against multidrug resistant clinical isolates. *Rev Med Herb* [Internet]. 2022;32(1):1–2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100502>
25. Ahmed S. Moni B. Ahmed S. Gomes D. Shohael A. Comparative phytochemical, antioxidant, and antibacterial study of different parts of Doigota plants (*Bixa orellana* L). *Bull Natl Res Cent* [Internet]. 2020;44(95):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00349-1>
26. Fróes Y. Pereira A. Rosa P. Souto L. Arruda M. Araújo L. Costa A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Bixa orellana* L.L. *Res Soc Dev* [Internet]. 2020;9(10):1–15. Available from: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8447>
27. Bachelor V. Bach E. Wadt N. Bach E. Aqueous extract from urucum (*Bixa orellana* L.): antimicrobial, antioxidant, and healing activity. *Porto Biomed J* [Internet]. 2023;8(1):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1097/j.pbj.000000000000183>
28. Obregón A, Elías C, Contreras E, Arias G, Bracamonte M. Características fisicoquímicas, nutricionales y morfológicas de frutas nativas. *Rev Investig Altoandinas - J High Andean Res* [Internet]. 2021;23(1):17–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2021.202>

29. Arispe C, Yangali J, Guerrero M, Lozada O, Acuña L, Arellano C. La Investigación Científica. [Internet]. 1 ed. Ecuador: Universidad Internacional del Ecuador; 2020. [Citado el 11 de Feb del 2024]. 128 p. Available from: <https://repositorio.uide.edu.ec/handle/37000/4310>
30. Hernandez R, Mendoza C. Metodología de la Investigación [Internet]. Ciudad de México: Mc Graw Hill; 2018. [Citado el 11 de Feb del 2024]. 714 p. Available from: <https://virtual.cuautitlan.unam.mx/rudics/?p=2612>
31. Montenegro A, Ramos D. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre *Porphyromonas gingivalis*. *Odontol Sanmarquina*. [Internet]. 2016;19(1):7– 11. Available from: <https://doi.org/10.15381/os.v19i1.12175>
32. Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Saito N. *Staphylococcus Agri* virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development. *Sci Transl Med*. [Internet]. 2021;12(551). Available from: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay4068>
33. Amiel J. Metodología y diseño de la investigación científica. [Internet]. 1 ed. Lima: Fondo editorial de la Universidad Científica del Sur; 2014. [Citado el 11 de Feb del 2024]. 1–329 p. Available from: <https://fondoeditorial.cientifica.edu.pe/libro/metodologia-y-diseno-de-la-investigacion-cientifica/>
34. Torres D. Normando D. Metodología de la investigación Bioestadística: conceptos esenciales para el clínico. *Dental Press J Orthod* [Internet]. 2021;26(1):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1590/2177-6709.26.1.E21SPE1>
35. Valenzuela C, Gongora N, Dueñas M, Velázquez L, Ramos A, Valenzuela N. Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* [Internet]. 2019;48(1):94–111. Available from: <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80068>

36. Brítez J. La Ética en investigaciones humanas y el Comité de Ética. Rev virtual Soc Parag Med Int. [Internet]. 2016;3(1):8–10. Available from: [https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03\(01\)08-010](https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03(01)08-010)
37. Dike P, Ibojo O, Daramola F, Omonhinmin A. Phytochemical and Proximate Analysis of Foliage and Seed of *Bixa orellana* Linn. Int J Pharm Sci Rev Res. [Internet]. 2016;36(2):247–51. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/32227205.pdf>
38. Vilar D, Vilar M, Moura T, Raffin F. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L: a review. Scientific World Journal. [Internet]. 2014;1(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/857292>
39. Campoli D, Monk J, Price A, Benfield P, Todd P, Ward A. Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs. [Internet]. 1988;35(4):373–447. Available from: <https://doi.org/10.2165/00003495-198835040-00003>

ANEXOS

ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos

Tabla 8. Ensayo microbiológico

N°	Frente a <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906				
	Etanol	Ciprofloxacino 5 µg	Ext 25 %	Ext 50 %	Ext 75 %
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Tabla 9. Marcha fitoquímica del extracto etanólico

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS		
Metabolitos secundarios	Reactivos	Resultado
Antraquinonas	Borntrager	
Compuestos fenólicos	Cloruro Férrico	
Terpenos y esteroides	Liebermann-Burchard	
Alcaloides	Dragendorff	
Alcaloides	Mayer	
Alcaloides	Wagner	
Lactonas α , β insaturadas	Baljet	
Taninos	Gelatina	
Taninos	Gelatina-sal	
Antocianinas	NaOH 10 %	
Saponinas	Espuma	
Flavonoides	Shinoda	

Leyenda:

- (-) Ausente
- (+) Mínimo
- (++) Mediano
- (+++) Abundante

Tabla 10. Ensayo de Solubilidad

TUBO	SOLVENTES	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	
N° 2	Diclorometano	
N° 3	Cloroformo	
N° 4	Butanol	
N° 5	Etanol de 96°	
N° 6	Etanol de 70°	
N° 7	Metanol	
N° 8	Agua destilada	

Leyenda:

- Insoluble: (-)
- Poco soluble: (+)
- Medianamente soluble: (++)
- Muy soluble: (+++)

ANEXO B. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Cuál es el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906?	Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	El extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) presenta efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Qué tipo de metabolitos secundarios potencialmente responsables del efecto antibacteriano <i>in vitro</i> poseerá el extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote)?	Identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (Achiote) potencialmente responsables del efecto antibacteriano <i>in vitro</i>	No aplica
¿A qué concentración el extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) presentará efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906?	Determinar a qué concentración el extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. (Achiote) presenta efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	No aplica
¿Cuál es el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) comparado con ciprofloxacino 5 µg frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906?	Comparar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) con ciprofloxacino 5 µg frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	No aplica

ANEXO C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	Nº DE ÍTEMS	VALOR
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto etanólico de las hojas " <i>Bixa orellana</i> " (achiote)	Fitoquímica	Marcha fitoquímica	Ordinal	13	(-) Ausente (+) Mínimo (++) Mediano (+++) Abundante
VARIABLE DEPENDIENTE Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	Microbiológico (Método de difusión en agar)	Medición de diámetro inhibición (mm)	Razón	10	<8 mm: nulo (-) 8 – 14 mm: Sensibilidad limite o baja (+) 14 – 20 mm: Medianamente sensible (++) >20 mm: Sumamente sensible (+++)

ANEXO D. Certificado Taxonómico

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. 3796
Cel: 963689079
Email: jocamde@gmail.com



CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO, CBP 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA – RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 0311-2013-MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, los Bachilleres INGA BALBIN, MANUEL DARIO y LAUREANO BERROCAL, POOL MANUEL, tesis de la Universidad María Auxiliadora, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación para desarrollar el proyecto de tesis titulado: EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJA *Bixa orellana* (ACHIOTE) FRENTE A *Proteus mirabilis* ATCC 29906, han solicitado la identificación y certificación botánica de la planta conocida con el nombre común de "achiote", la muestra de hojas ha sido identificada como *Bixa orellana* L. Según la base de datos de W³Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, el sistema APG evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden. - Mark W. Chase & James L. Reveal (2009 – APG III) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida. Teniendo en cuenta los datos de la base de W³Tropicos, APG III y APG IV, la especie identificada tiene las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae
División: Angiospermae
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Rosanae
Orden: Malvales
Familia: Bixaceae
Género: *Bixa*
Especie: *Bixa orellana* L.

Nombre vulgar: "achiote"

Se expide la presente certificación para los fines de investigación.

Lima, 10 de junio del 2023



Jr. Sánchez Silva 156 – Piso 2-Urb. Santa Luzmila -Lima 07 -Lima

ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio



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

Informe de Resultados

Solicitado por: LAUREANO BERROCAL, POOL MANUEL
INGA BALBIN, MANUEL DARIO

Muestra: Extracto etanólico de las hojas Bixa Orellana (Achiote)

Fecha : 27-05-2023

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	75%	50%	25%	Ciprofloxacino 5ug	Etanol 96 °
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	16.58	12.86	7.88	30.49	6
	16.55	12.84	7.85	30.47	6
	16.55	12.83	7.86	30.54	6
	16.59	12.89	7.90	30.48	6
	16.56	12.85	7.85	30.53	6
	16.54	12.83	7.84	30.45	6
	16.56	12.87	7.86	30.49	6
	16.53	12.83	7.82	30.51	6
	16.55	12.85	7.87	30.46	6
16.57	12.88	7.88	30.50	6	


*Tamaño de disco: 6mm, por lo que al reportarse 6 mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

*Concentración del inóculo: 1.5×10^8 UFC/mL

Lic. T.M. Walter A. Siri Rodriguez

CTMP. 10808

ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton

		Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP				
HiMedia Laboratories Private Limited 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com						
Certificate of Analysis, Quality and Conformity						
Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521				
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09				
Appearance Cream to yellow homogeneous free flowing powder . Observed : Light yellow						
Gelling Firm, comparable with 1.7% agar gel.						
Colour and Clarity of prepared medium Light amber coloured clear to slight opalescent gel forms in Petri plates.						
Reaction Reaction of 3.8% w/v aqueous solution at 25°C.						
pH pH Range :7.20-7.40 Observed : 7.39						
Cultural Response Cultural characteristics observed after incubation at 30-35°C for 18 -24 hours for bacterial cultures. For testing S.pneumoniae : The medium was supplemented with 5% Sheep blood and incubated at 35°C for 16-18 hours at 5% CO2 For testing H.influenzae : Yeast extract & 2 vials /l of Haemophilus Growth Supplement (FD117 containing 15 mg/l of Haematin + 15 mg/l of NAD) and incubated at 35°C for 20-24 hours at 5% CO2						
Antibiotic Sensitivity test Various discs were tested for standard ATCC strains and zone of inhibition were measured after an incubation 30-35°C for 18 hours. (As per the latest CLSI Protocol M6 & Standards as per the current CLSI M100)						
Thymine/Thymidine Content # The zones for these discs are indicative of the Thymine/Thymidine content of the medium.						
Divalent Cation Content * The zones for these discs are indicative of the Divalent Cation content of the medium						
Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Observed Lot value (CFU)	Recovery	Standard Zone	Zone of inhibition Observed
Escherichia coli ATCC 25922						
<i>Growth promoting</i>	85	luxuriant	72	84%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	22mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	16-22 mm	21mm
<i>Cefotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	29-35 mm	33mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	15-21 mm	20mm

HiMedia Laboratories Private Limited
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
 Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

<i>Chloramphenicol C 30 mcg</i>	-	-	-	-	21-27 mm	26mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	30-40 mm	38mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg</i>	-	-	-	-	19-26 mm	24mm
<i>Sulphafurazole SF 300 mcg</i>	-	-	-	-	15-23 mm	21mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-25 mm	24mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

Staphylococcus aureus ATCC 25923

<i>Growth promoting</i>	76	luxuriant	64	84%	-	-
<i>Amoxycylav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	28-36 mm	35mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	36mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	35mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	29mm
<i>Erythromycin E 15 mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	28mm
<i>Linezolid LZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	25-32 mm	31mm
<i>Oxacillin OX 1mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	23mm
<i>Pristinomycin RP 15 mcg</i>	-	-	-	-	21-28 mm	27mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-21 mm	20mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	24-32 mm	31mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	27mm

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

<i>Growth promoting</i>	83	luxuriant	71	85%	-	-
<i>Amikacin AK 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-26 mm	25mm
<i>Aztreonam AT 3mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	27mm
<i>Cephotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-22 mm	21mm
<i>Cefazidime CAZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	22-29 mm	27mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	31mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg *</i>	-	-	-	-	16-21 mm	20mm
<i>Imipenem IPM 10 mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	31mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Tobramycin TOB 10 mcg *</i>	-	-	-	-	19-25 mm	23mm

Escherichia coli ATCC 35218

HiMedia Laboratories Private Limited
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
 Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

<i>Growth promoting</i>	75	luxuriant	63	84%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-22 mm	21mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	13-19 mm	18mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	12-18 mm	16mm
<i>Piperacillin/Tazobactam PIT 100/10 mcg</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Ticarcillin TI 75 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	21-25 mm	23mm

Enterococcus faecalis ATCC 29212

<i>Growth promoting</i>	69	luxuriant	58	84%	-	-
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm (Clear zone)	23mm
<i>Trimethoprim TR 5 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm	21mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	# 17 mm	22mm

Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA)

<i>Growth promoting</i>	88	luxuriant	76	86%	-	-
<i>Oxacillin OX 1 mcg</i>	-	-	-	-	Very Hazy to No Zone	No zone

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 (On Medium with 5% Sheep Blood)

<i>Growth promoting</i>	80	luxuriant	69	86%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (Incubated w/5% CO2)

<i>Growth promoting</i>	71	luxuriant	63	88%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

Haemophilus influenzae ATCC 49247 (On medium w/ Y.E.,NAD & Hematin)

<i>Growth promoting</i>	84	luxuriant	72	85%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

- . ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
- . NCTC and National Collection of Type Culture are registered trade mark of the Health Protection Agency

Control Media :

- . For Bacteria : Soyabean Casein Digest Agar / Columbia Blood Agar base enriched with 5% v/v Sheep/Horse blood.
- . For Yeast & Mold : Sabouraud Dextrose Agar.

- . All ISO 11133 : 2014(E) control strains are included in the Quality parameter
- . HiMedia Laboratories Pvt Ltd is Certified for ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

. Information for BSE/TSE Risk: The material was subjected to pH \leq 7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) and dioxine are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal Preservation Act Govt. of Maharashtra, India.

STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED

This is to certify that this lot passes and it conforms to the above mentioned tests and specifications . The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particulars use, other than that specified in the current HiMedia manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

This document has been produced electronically and is valid



Sheetal Shewale
Microbiologist/Sr.Executive
Microbiologist








Ujjwal N. Kokate
Asst./Dy/QC Manager



Dr. Santosh Kaul
Dy/QA Manager

24.09.2018

ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa *Proteus mirabilis* ATCC 29906

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: <i>Proteus mirabilis</i> Catalog Number: 01215 Lot Number: 1215-07** Reference Number: ATCC® 29906™** Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2023/7/31 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Quevi Release Date: 2021/8/17
Performance	
Macroscopic Features: Large, irregular shaped, swarming colonies, grey, consumes plate, glossy appearance	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram negative rods	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  <p>REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  <p>TESTING CERT #2655.01</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</p> </div> </div>	
<p>© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC.286</p>	

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

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

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-08-12T13:09:05.039 adq
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A11 (+++) (A)	1215-07	Proteus mirabilis	2.50

Comments:

n/a

ANEXO H. Evidencias fotográficas

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA



Figura 1. Muestra de tipo hojas *Bixa orellana L.*(Achiote)



Figura 2. Selección de la muestra



Figura 3. Lavado de la muestra



Figura 4. Procedimiento de secado de la muestra



Figura 5. Procedimiento de molienda de la muestra



Figura 6. Preparación del macerado del extracto etanólico



Figura 7. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico

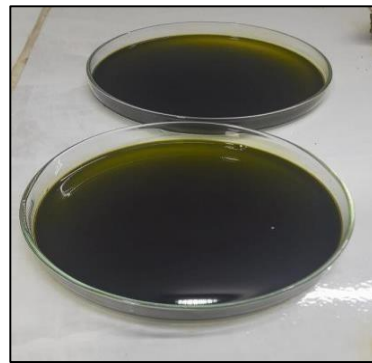


Figura 8. Obtención de extracto seco



Figura 9. Obtención de extracto seco

PRUEBA DE SOLUBILIDAD



Figura 10. Añadiendo al extracto seco el solvente a cada tubo de ensayo para la prueba de solubilidad.

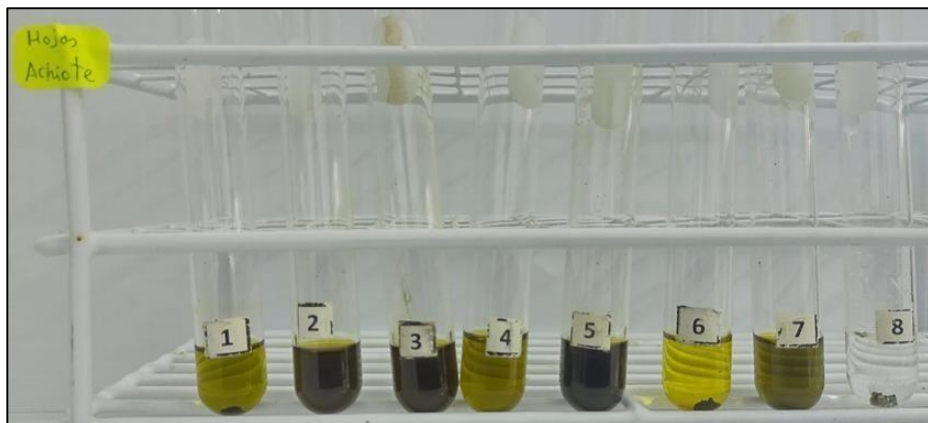


Figura 11. Resultado de prueba de solubilidad

MARCHA FITOQUÍMICA



Figura 12. Adición de extracto a los tubos de ensayo

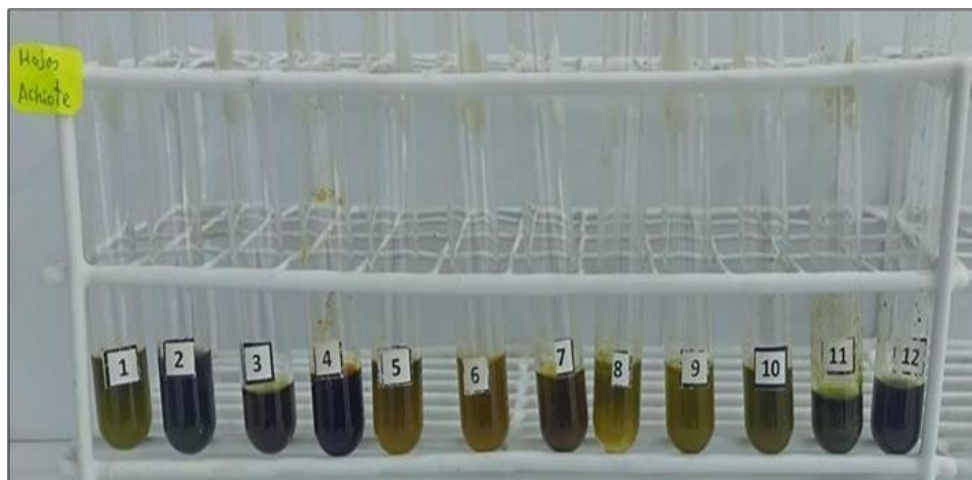


Figura 13. Resultado de la marcha fitoquímica

ENSAYO MICROBIOLÓGICO

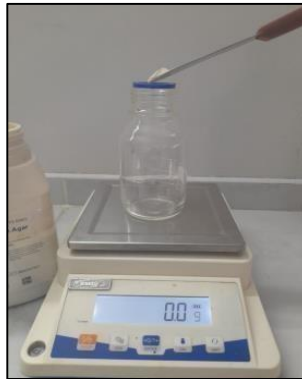


Figura 14. Pesado del Agar



Figura 15. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica



Figura 16. Agar Mueller Hinton

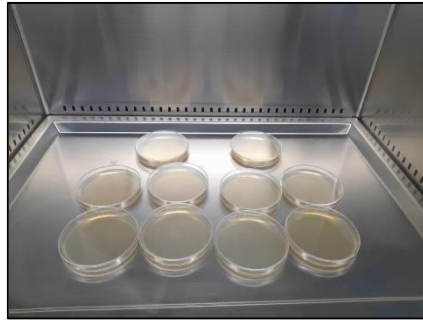


Figura 17. Placas preparadas



Figura 18. Cepa biológica de tipo: *Proteus mirabilis* ATCC 29906

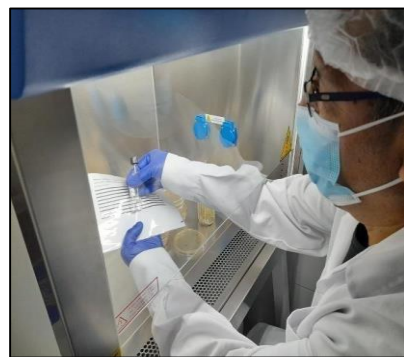
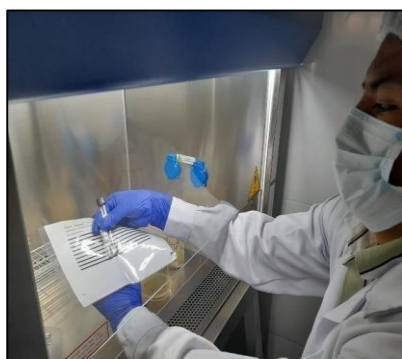


Figura 19. Comparación de turbidez mediante el reactivo de Mc. Farland

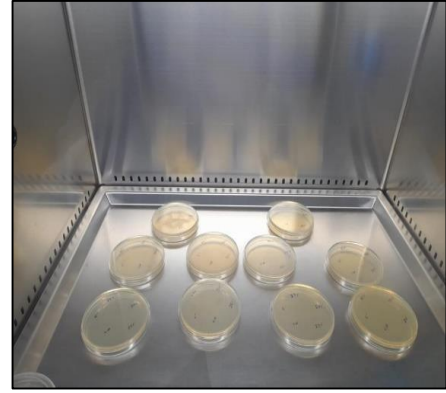


Figura 20. Rotulado de placas



Figura 21. Sembrado de la cepa biológicas en las placas



Figura 22. Adición de discos en placas

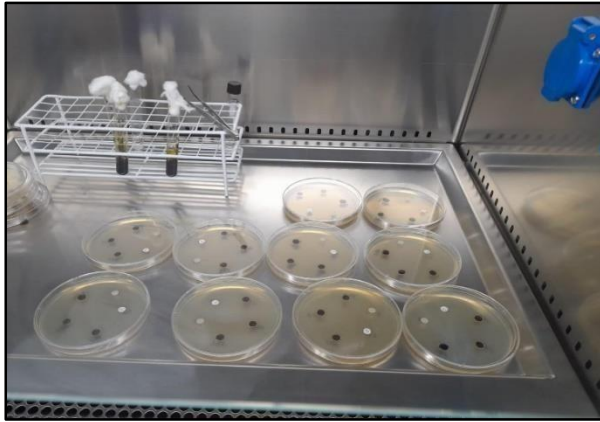


Figura 23. Sustancias experimentales y controles

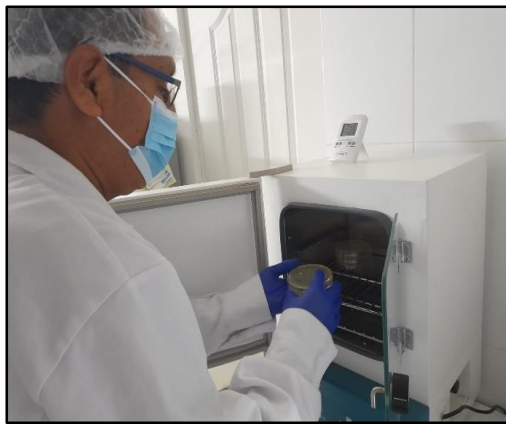


Figura 24. Incubación de *Proteus mirabilis* ATCC 29906

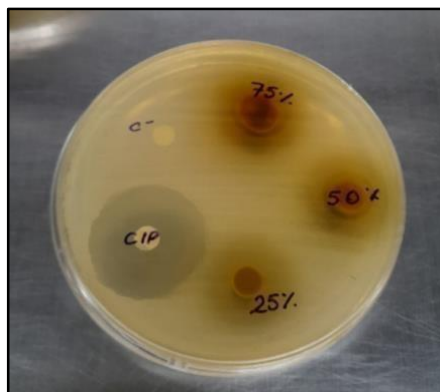


Figura 25. Placas Petri con halos de inhibición

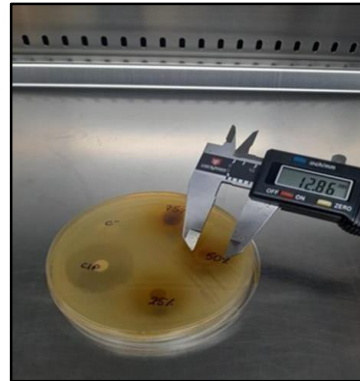
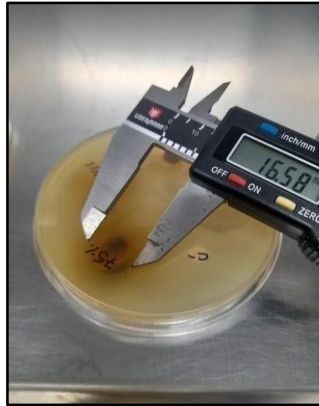


Figura 26. Lectura de resultados

ANEXO I. Porcentaje de rendimiento

Porcentaje de rendimiento

Determinación del porcentaje de rendimiento

Tenemos la cantidad de producto obtenido en la extracción química.

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde: %E = porcentaje de rendimiento

Pf = peso final (extracto seco)

Pi = peso inicial (muestra molida)

Fuente : Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda

<http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v48n1/0034-7418-rccqf-48-01-94.pdf>

Extracción por maceración

$$\%E = \frac{9.75 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100 = 4.88\%$$

Pf= 9.75 g. extracto seco obtenido

Pi = 200 g muestra molida

ANEXO J. Acta o dictamen de aprobación del comité de ética



UNIVERSIDAD MARÍA AUXILIADORA

“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”

San Juan de Lurigancho 30 de mayo del 2023

CARTA N°055-2023/ EPFYB-UMA

Lic.

Walter Aurelio Siri Rodríguez

LABORATORIO BIOLÓGICO Y ANÁLISIS CLÍNICO SANTA ROSA E.I.R.L

Jr comercio N° 597 int. B PACHACAMAC/LIMA/LIMA

Presente. –

De mi especial consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo en nombre propio y de la Universidad María Auxiliadora, a quien represento en mi calidad de director de la Escuela de Farmacia y Bioquímica.

Sirva la presente para pedir su autorización a que los bachilleres: Manuel Dario Inga Balbin con DNI 25575707 y Pool Manuel Laureano Berrocal con DNI 72091735, puedan recopilar datos de información; para su proyecto de tesis titulado: **“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS BIXA ORELLANA (ACHIOTE) FRENTE PROTEUS MIRABILIS ATCC 29906”**.

Sin otro particular, hago propicio la ocasión para expresarle los sentimientos de mi más alta consideración y estima.


Dr. Jhonel Samanego Joaquín
Director de la Escuela Profesional de
Farmacia y Bioquímica



Av. Canto Bello 431, San Juan de Lurigancho
Telf: 389 1212
www.umaperu.edu.pe

ANEXO K. Constancia de autorización para recolección de la muestra

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Yo, **Zumaeta Llerena, Elena** con **DNI: 77873246** en calidad de responsable de la **Parcela "Zumaeta"** ubicado en el Centro poblado San Lorenzo, distrito de Yarina, provincia coronel Portillo y departamento de Ucayali.

Autorizo a los estudiantes de la **Universidad María Auxiliadora**, de la facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**, **Bach. LAUREANO BERROCAL, POOL MANUEL** y **Bach. INGA BALBIN, MANUEL DARIO**, con título de proyecto de investigación, **"Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas *Bixa Orellana* (Achiote) frente *Proteus mirabilis* ATCC 29906"**, para que puedan recolectar la muestra correspondiente

Ucayali, 11 de mayo del 2023



.....
Firma