



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

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

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
CIRUJANO DENTISTA

AUTORA:

COLLANTES VARGAS MERLY

ASESOR:

MGTR. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM

TRUJILLO – PERÚ

2019

## **1. Título**

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE TRES CONCENTRACIONES DEL  
EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE HOJAS DE *Bixa orellana* L.

(ACHIOTE) FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC

25175, TRUJILLO – 2018

## **2. Equipo de trabajo**

### **INVESTIGADOR PRINCIPAL:**

Collantes Vargas Merly

### **ASESOR:**

Mgr. Vásquez Plasencia César Abraham

### **3. Firma del jurado y asesor**

---

Dr. AGUIRRE SIANCAS ELÍAS ERNESTO  
**PRESIDENTE**

---

Mgr. MORÓN CABRERA EDWAR RICHARD  
**MIEMBRO**

---

Mgr. PAIRAZAMÁN GARCÍA JUAN LUIS  
**MIEMBRO**

---

Mgr. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM  
**ASESOR**

#### **4. Agradecimiento**

A Dios, por su inmenso amor y bondad, ya que me permite sonreír ante todos mis logros que consigo gracias a su ayuda.

Agradezco a mis docentes, los cuales son personas de gran sabiduría, quienes han dedicado su tiempo y esfuerzo para ayudarme a conseguir una parte de mis metas.

## **5. Dedicatoria**

Este trabajo lo dedico a mis padres, Eleuterio Collantes y Marina Vargas, por haberme forjado como la persona que soy actualmente, ya que todos los logros que estoy cumpliendo son gracias a ellos, por motivarme constantemente para alcanzar mis metas.

## 6. Resumen

Este estudio comparó el efecto antibacteriano *In vitro* entre tres concentraciones de extracto hidroetanólico de hoja de *Bixa orellana L.* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La población estuvo conformada por cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, los cuales fueron incubados en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya. Además, se recolectó e identificó la planta de achiote de la cual se elaboraron extractos de las hojas en diferentes concentraciones, 25, 50 y 75%. El efecto antibacteriano se evaluó mediante el método de KIRBY BAUER. El extracto al 25% obtuvo una media 19.43mm, al 50% una media 23.35 mm, y al 75% una media 26.38mm. Se aplicó la prueba ANOVA, encontrando (P= 0.00) que existe diferencia estadística significativa entre los tres tipos de concentraciones. En conclusión, el extracto hidroetanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* al 75% presentó mayor efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* que las otras dos concentraciones.

**Palabras clave:** Achiote, Antibacteriano, *Bixa orellana*, Clorhexidina, *Streptococcus mutans*.

## 7. Abstract

This study compared the antibacterial effect in vitro between the extracts of the hydroethanolic extract of the leaf of *Bixa orellana* L. against *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The population consisted of strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, which have affected the BHI broth and in Soy Tripticasa Agar. In addition, the achiote plant was collected and identified, from which extracts of the leaves were elaborated in different elements, 25, 50 and 75%. The antibacterial effect was evaluated by the KIRBY BAUER method. The extract at 25% obtained an average of 19.43mm, at 50% an average of 23.35mm, and at 75% an average of 26.38mm. The ANOVA test was applied, finding ( $P = 0.00$ ) that there is a significant statistical difference between the types of elements. In conclusion, the hydroethanolic extract of the leaves of *Bixa orellana* L. at 75% presented an antibacterial effect against a *Streptococcus mutans* than the other two options.

**Keywords:** Annatto, antibacterial, *Bixa orellana*, Chlorhexidine, *Streptococcus mutans*.



## 8. Contenido

1. Título de la tesis .....	ii
2. Equipo de trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iv
4. Hoja de agradecimiento.....	v
5. Hoja de dedicatoria .....	vi
6. Resumen .....	vii
7. Abstract .....	viii
8. Contenido .....	ix
9. Índice de tablas .....	x
10. Índice gráficos.....	xi
<b>I. Introducción</b> .....	1
<b>II. Revisión de literatura</b> .....	3
<b>III. Hipótesis</b> .....	17
<b>IV. Metodología</b> .....	17
4.1. Diseño de la investigación.....	17
4.2. Población y muestra .....	18
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores	20
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	21
4.5. Plan de análisis .....	26
4.6. Matriz de consistencia.....	27
4.7. Principios éticos .....	28
<b>V. Resultados</b> .....	29
5.1 Resultados .....	29
5.2. Análisis de Resultados .....	31
<b>VI. Conclusiones</b> .....	34
Aspectos complementarios.....	35
Referencias Bibliográficas .....	36
Anexos.....	41

## 9. Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> <i>Comparación in vitro del efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de Bixa orellana L. (Achiote) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175</i> .....	29
<b>Tabla 2:</b> <i>Subgrupos del efecto antimicrobiano, entre los extractos hidroetanólicos de Bixa Orellana L. (Achiote) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.</i> .....	30
<b>Tabla 3:</b> <i>Prueba de normalidad</i> .....	49

## Índice de gráficos

**Gráfico 1:** *Comparación in vitro del efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetánolico de hojas de Bixa orellana L. (Achiote) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175..... 50*

## **I. Introducción**

La caries dental, es un problema de salud pública a nivel internacional, nacional y local y el Ministerio de Salud indica que la población peruana presenta un alto riesgo de caries dental, con mayor frecuencia en la población infantil. La cavidad oral humana se considera uno de los lugares con mayor diversidad de microorganismos considerando tanto bacterias y hongos. El *Streptococcus mutans* es un microorganismo común de la boca causante de la caries, enfermedad considerada con una alta prevalencia e incidencia a nivel mundial y que es causada por varios factores, y que da como resultado la afección de los dientes debilitándose.<sup>1</sup>

El uso de plantas para diversos tratamientos se viene empleando desde tiempos antiguos, uno de las plantas que más se utiliza es el Achiote por lo que se toma en cuenta que en el Perú existe mayor diversidad de flora que poseen diversas propiedades, motivo por el cual ha captado la investigación de diversos científicos para el reconocimiento de los principios activos que dan como reflejo su actividad terapéutica.<sup>2</sup>

Esta investigación es importante porque, el achiote, además, de ser un producto natural, es una buena opción para el área odontológica por sus propiedades antimicrobianas que se pueden encontrar, a partir de sus metabolitos presentes. Además, el extracto de Achiote resulta fundamental, ya que alternativas como estas pueden beneficiar a la población por el de bajo costo y el fácil acceso para la sociedad desarrollándose productos con el Achiote que puedan disminuir y controlar este microorganismo y evitar molestias a la población susceptible.<sup>2</sup>

El objetivo general estudio fue, comparar el efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa Orellana* L. (Achiote) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La población estuvo conformada por cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, además, se elaboraron extractos de las hojas de achiote en diferentes concentraciones, 25, 50 y 75%. El efecto antimicrobiano se evaluó mediante el método de KIRBY BAUER. El extracto al 25% obtuvo una media 19.43mm, al 50% una media 23.35 mm, y al 75% una media 26.38mm. En conclusión, el extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa Orellana* L. al 75% presentó mayor efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* que las otras dos concentraciones.

## II. Revisión de la literatura

### 2.1. Antecedentes

**Medina D. et al <sup>3</sup> (Perú, 2016) “Actividad antibacteriana de *Bixa orellana* L. (achiote) contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*”** El objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Bixa Orellana*, contra *Streptococcus mutans*. Para el estudio se prepararon dos extractos metanolicos de las hojas y las semillas del achiote, además se utilizaron cepas de *Streptococcus mutans*, y se utilizó el método de difusión en agar para la determinación de la actividad antibacteriana. Como grupo control se utilizó clorhexidina al 0.12%. Los resultados indicaron que, el extracto de la semilla produjo un halo de inhibición de 15.11 mm y las hojas una zona de inhibición de 19.97 mm, frente a *Streptococcus mutans*, mientras que la clorhexidina al 0.12% obtuvo una zona de inhibición de 23.97 mm. En conclusión, los extractos hidroetanolicos de las hojas y semilla de *Bixa orellana* presentan efectos antibacterianos frente a *Streptococcus mutans*, sin embargo, su efecto es menor que la clorhexidina al 0.12%.

**Espinoza J. et al <sup>4</sup> (Perú, 2016) “Eficacia antibacteriana de la *Bixa orellana* “Achiote” sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, comparado con oxacilina, estudio in vitro”** El objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano del achiote sobre *S. aureus*. Para este estudio se elaboraron extracto etanólico de las hojas del achiote en concentraciones del 25, 50, 75 y 100%, y como grupo control se utilizó como control a la oxaciclina, las cuales fueron aplicadas sobre cepas de *S. aureus*, previamente

activadas y sembradas en un medio de cultivo. Se midieron los halos de inhibición bacteriana en milímetros. Los resultados indicaron que, hubo efecto antibacteriano desde la concentración al 25% con un halo de inhibición de 12.3 mm y al 100% fue 30.9 mm. En conclusión, el extracto etanólico de las hojas del achiote presenta efecto antibacteriano frente a la bacteria estudiada.

**Troncoso H. et al<sup>5</sup> (Perú, 2014) “Valoración del cultivo de *Bixa orellana* (achiote), evaluando su actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima in vitro de los extractos acuoso y etanólico de hojas y corteza frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Arequipa, 2013”** El objetivo fue, evaluar el efecto antibacteriano de los extractos acuoso y etanólico de las hojas y corteza del achiote sobre las cepas de algunas bacterias. Para este estudio se elaboraron los extractos acuosos y etanólicos, mediante la maceración e infusión de las hojas y corteza del achiote, en la cual, se obtuvieron rendimientos de 15 % para hojas y 4% para corteza por el método de maceración, y rendimientos de 17,78 % para hojas y 10,5 % para corteza por el método de infusión. Se midieron los halos de inhibición bacteriana en milímetros. Los resultados indicaron que, solo los extractos etanólicos de hojas como de corteza tuvieron actividad frente a una cepa en estudio *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 20,3 mm y 28 mm. En conclusión, el extracto etanólico de las hojas y corteza del achiote presenta efectos antibacterianos sobre *S. aureus*.

**Duailibe S. et al <sup>6</sup> (Brasil, 2015) “Actividad antibacteriana in vitro de dos extractos de plantas contra *Enterococcus faecalis*”** El objetivo fue comparar la actividad antibacteriana del extracto *Bixa orellana* y clorhexidina al 0.12%. Para el estudio se utilizó el extracto de *Bixa Orellana* y cepas de *Enterococcus faecalis*, como grupo control se utilizó clorhexidina al 0.12%. Este estudio evaluó la efectividad antimicrobiana mediante la distancia de las zonas de inhibición de cada placa Petri. Los resultados de este estudio indicaron que, para el extracto de *Bixa Orellana* se obtuvo 0.00 mm de inhibición. En conclusión, este estudio indicó que el extracto de *Bixa orellana* no presenta actividad antimicrobiana sobre *E. faecalis*, en comparación de la clorhexidina al 0.12% que si presenta efectos antibacterianos sobre dicha bacteria.

**Abayomi M. et al <sup>7</sup> (Jamaica, 2014) “Pruebas fitoquímicas e in vitro. Actividad antibacteriana de *Bixa orellana* (Annato) extracto de semilla”** El objetivo fue, evaluar el efecto antibacteriano del extracto de las semillas de achiote sobre diversas bacterias. Para este estudio se elaboraron extractos de las semillas de achiote en concentraciones de 250 µg / mL, 500 µg / mL, 750 µg / mL, 1000 µg / mL, 1500 µg / mL y 3000 µg / mL, los cuales fueron agregados sobre las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis*. Se midieron los halos de inhibición bacteriana luego de la exposición a los extractos. Los resultados indicaron que, la concentración al 250 µg / mL obtuvo un halo de inhibición contra las diversas bacterias fue 8 mm, al 500 µg / mL obtuvo de 8 a 9 mm, 750 µg / mL obtuvo de 7 a 11 mm, 1000 µg / mL obtuvo de 7.5 a 11.5 mm, 1500 µg / mL obtuvo de 10.5 a 13 mm y 3000 µg / mL obtuvo de 11.5 a 14 mm. En conclusión, el extracto de las



semillas de achiote en diferentes concentraciones presenta efectos antibacterianos frente a diferentes bacterias.

**Tamil A. et al <sup>8</sup> (India, 2011) “Los extractos de hojas y semillas de *Bixa orellana* L. ejercen actividad antimicrobiana contra patógenos bacterianos”** El objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano de los extractos de las hojas y semillas de *Bixa orellana* L. Para este estudio se elaboraron extractos metanólicos de las hojas y las semillas de achiote y se evaluó su actividad antimicrobiana sobre diversas cepas de bacterias, junto con hongos patógenos. Los resultados indicaron que el extracto de la hoja a 1000 µg / ml, obtuvo una zona de inhibición alta contra todas las bacterias, mientras que el extracto de la semilla obtuvo un halo de inhibición menor. En conclusión, este estudio determinó que los extractos de achiote si presentan actividad antimicrobiana, ya que en el análisis fitoquímico del extracto de las hojas y semillas hubo presencia de flavonoides taninos, saponinas, esteroides. Los alcaloides se detectaron solo en la hoja y anthroquinones, en las semillas.

**Irobi O. et al <sup>9</sup> (Canadá, 2008) “Actividad antimicrobiana de la farmacia de extracto de Annatto (*Bixa orellana*)”** El objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto de *Bixa orellana*. Para este estudio se realizó un extracto etanólico de las hojas del achiote para evaluar su efecto antibacteriano frente a bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. Se utilizó la difusión en agar y los métodos de dilución del tubo. Los resultados indicaron que, el extracto de *Bixa Orellana* (5 mg / ml) produjo acción antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas incluyendo *Bacillus subtilis*,

*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, los halos de inhibición obtenidas fueron de 15 a 17 mm contra las bacterias susceptibles. La concentración mínima inhibitoria del extracto fue de 4 a 16 mg / ml, mientras que su acción bactericida se realizó a dosis más altas (16 a 64 mg / ml). En conclusión, este estudio pudo demostrar que el extracto de achiote presenta un espectro estrecho de actividad antimicrobiana, siendo efectivo solo en bacterias Gram positivas utilizadas en este estudio.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Caries dental**

La caries dental es una patología de tipo crónico y de múltiples factores, que afecta inicialmente a la primera capa de la estructura dentaria , el esmalte, el cual está en contacto directo con los depósitos microbianos, cuando existe un desequilibrio en la cavidad oral de manera constante, señalando los tres factores principales: huésped, microbioma oral y sustrato, sumado a ellos el tiempo, esto da como resultado la pérdida mineral de la superficie dental, trayendo consigo el primer signo de afección conocida como mancha blanca.<sup>11</sup>

Es así que la caries dental es definida como la pérdida progresiva de tejidos duros del diente (esmalte y dentina) debido a la disolución de sus componentes inorgánicos por el efecto de los ácido producidos por el metabolismo bacteriano de la sacarosa y otros carbohidratos. Entre los principales patógenos etiológicos implicados en la caries dental humanos tenemos a los *Streptococcus mutans*.<sup>11</sup>

### 2.2.1.1. Etiología

#### **Microflora:**

Dentro de ellas están los microorganismos protectores y otros que son potencialmente patógenos. Las lesiones cariosas se desarrollan en las superficies del esmalte de las piezas dentarias, donde los microorganismos cariogénicos encuentran un hábitat ideal para proliferar y generar la enfermedad. Dentro de aquellos microorganismos patógenos se encuentra el *S. mutans*. Esta bacteria cariogénica, está relacionado con el desarrollo del inicio de la caries, asimismo, los *Lactobacillus acidophilus*, son los responsables de metabolizar los azúcares de la cavidad bucal y producir ácidos desmineralizantes.<sup>12,27</sup>

**La dieta:** se refiere a los alimentos con una elevada cantidad de azúcares, el cual, acelera la actividad bacteriana<sup>12</sup>. La sacarosa conformada por fructuosa y glucosa, es considerado como el más cariogénico, no solamente porque al metabolizarse se producen ácidos, sino porque el *S. mutans*, lo usa para generar glucano y polisacáridos extracelulares, los cuales, le permiten a la bacteria adherirse sobre la superficie del esmalte dental.<sup>12</sup>

**Tiempo:** cuando hay un mayor tiempo de exposición de la pieza dentaria a los ácidos producidos por las bacterias, existe un mayor riesgo de caries.<sup>12</sup>

**Huésped:** cuando el huésped es vulnerable debido a diversos factores heredados, o la edad, también influye los trastornos endocrinos, maloclusión dentaria y trastornos salivales.<sup>12</sup>

### **2.2.1.2. Factores relacionados con el huésped**

**Saliva:** es un fluido que contiene fósforo y calcio, además de, flúor, proteínas, enzimas, agentes amortiguadores, inmunoglobulinas, entre otros. En la saliva, el flúor se muestra en bajas concentraciones, sin embargo, presenta una gran importancia en el momento de la remineralización, ya que, al combinarse con los cristales del esmalte dental, forma fluorapatita, el cual es un compuesto mucho más resistente al ataque de los ácidos generado por las bacterias. Además. El pH salival baja de manera rápida dentro de los primeros minutos luego de ingerir carbohidratos, luego de 30 minutos regresa a sus niveles normales. <sup>13,14</sup>

**Microflora:** dentro de las grandes cantidades y variedades de microorganismos que encontramos en la cavidad bucal, se encuentran bacterias del género *Streptococcus*, dentro de las cuales están los *S. mutans* y *S. mitis*, también se encuentran *Rothia dentocariosa*, los cuales, han sido asociados a la caries dental. <sup>13,14</sup>

### **Flora microbiana**

La cavidad bucal, sirve de habitat para un aproximado de 700 especies que se encuentran colonizando mucosas y superficies dentarias en donde se forma el biofilm dental, dentro de los cuales, se encuentran los del género *Streptococcus*.<sup>13</sup>

### **Colonización bacteriana**

Para que se genere una lesión cariosa, es importante que primero se dé la adhesión inicial de bacterias sobre la superficie del esmalte dental. Para que la colonización se dé, antes, debe formarse una película muy fina de proteínas salivales sobre el esmalte dental, comúnmente llamada, película adquirida. <sup>13</sup>

### **2.2.2 Streptococcus mutans**

Los estreptococos del grupo *mutans*, son importantes agentes etiológicos asociados con las etapas iniciales en caries dental y entre estos *S. mutans* de serotipo c y e. los serotipos de *Streptococcus mutans* van desde serotipo a hasta h, siendo estos microorganismos más relacionados con esta patología. Teniendo en cuenta que la caries dental es una entidad ocasionada por un agente infeccioso específico. El *Streptococcus mutans* es un patógeno dental causante de bacteriamias y endocarditis infecciosa, determinándose su alta frecuencia en enfermedades cardiovasculares. Estos ácidos, circulan a través del biofilm hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosforo, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización. <sup>13</sup>

#### **2.2.2.1. Factores de patogenicidad:**

Los *S. mutans*, presentan un gran poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, también sintetizan polisacáridos extracelulares como los glucanos solubles e insolubles, además de fructanos. Sintetizan a los polisacáridos extracelulares; presentan una capacidad adhesiva, sobre todo en proteínas de la saliva que facilitan su adhesión a las superficies dentarias o superficies de materiales de restauración, en ausencia de glucanos, predominando su capacidad agregativa y coagregativa a través de los mutanos y glucosiltransferasas. <sup>13,28</sup>

También se encarga de producir bacteriocinas en diferentes bacterias de la cavidad bucal. Por último, sintetizan glucanos insolubles gracias a la sacarosa de los restos alimenticios, por las glucosiltransferasas, facilitando la formación del biofilm dental.

13

#### **2.2.2.2. Se sub clasifican en los siguientes serotipos:**

- *S. mutans*: c,e,f y k.
- *S. sobrinus*: d y g.
- *S. cricetus*: a.
- *S. rattus*: a
- *S. ferus*: c
- *S. macacae*: en c.
- *S. downet*: en h. <sup>13</sup>

#### **2.2.2.3. Factores de virulencia**

**Los factores de virulencia más involucrados son:**

**Acidogenicidad:** el *Streptococcus* fermenta azúcares de los restos alimenticios para originar principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo, haciendo que el pH de la cavidad bucal baje, provocando la desmineralización sobre el esmalte dental. <sup>14</sup>

**Aciduridad:** Es la capacidad que tiene la bacteria, de producir ácidos en la cavidad bucal, así se encuentre en un medio con pH bajo. <sup>14</sup>

**Acidofilicidad:** la bacteria del *S. mutans* resiste la acidez del medio bombeando protones fuera de la célula. <sup>14</sup>

### **Adhesión de *S. mutans***

Algunos expertos indican que, dichas bacterias pueden adherirse en la cavidad bucal de los niños y producirse la lesión cariosa al erupcionar la primera pieza dental alrededor de los 6 meses de edad del infante. <sup>14</sup>

Sin embargo, la adhesión y colonización de *S. mutans* puede aparecer antes de la erupción de las piezas dentarias, ya que *S. mutans* y *sobrinus*, tienen la capacidad de adherirse en la superficie de la mucosa oral, por lo cual, hay un aumento de riesgo caries, haciendo que aparezca en edades tempranas. <sup>14</sup>

### **2.2.3 American type culture collection (ATCC)**

ATCC, es una organización de Norteamérica no gubernamental, indicada como una institución sin fines de beneficio que se encarga de conservar las muestras de los cultivos celulares y microbiológicos, además, se encarga de distribuir los cultivos a los centros de estudio y laboratorios de investigación en las comunidades académicas, científicas y médicas. <sup>15</sup>

La misión de ATCC, es servir como el reservorio principal del mundo para cultivos de referencia estándar, materiales biológicos relacionados y datos asociados, además, proporciona la preservación permanente y la disponibilidad de estos materiales para el uso de personas calificadas que se dedican a la ciencia, la industria y la educación. <sup>15</sup>

### **2.2.3.1. Misión**

Adquirir, preservar, propagar y distribuir cultivos celulares, microorganismos, virus, productos celulares y materiales biológicos utilizados y derivados de la tecnología de ADN recombinante.<sup>15</sup>

Mantener los más altos estándares de autenticación, documentación y mantenimiento de las características y la viabilidad de los materiales confiados a las colecciones.<sup>15</sup>

### **2.2.3.2. Perseguir la investigación basada o relacionada con las colecciones.**

Brindar un servicio de la más alta calidad a los miembros de los sectores científico, comercial y público que trabajan con materiales de recolección.<sup>15</sup>

Educar a los científicos y al público acerca de las actividades y actividades de ATCC a través de programas de capacitación, conferencias, publicaciones, bases de datos y otros medios.

Recopilar, gestionar, difundir e intercambiar información aplicable a los materiales de las colecciones.<sup>15</sup>

ATCC está afiliada a 22 organizaciones científicas profesionales, los principales usuarios de sus culturas y servicios. Las políticas de ATCC están determinadas por una junta directiva de 15 miembros compuesta por representantes de estas organizaciones y la comunidad en general.<sup>15</sup>



#### **2.2.4 Plantas medicinales**

Desde la antigüedad, las plantas medicinales han sido utilizadas para curar una gran cantidad de enfermedades, ya que, aquellas plantas utilizadas, presentaban propiedades curativas, gracias a su principio activo que producía un efecto fisiológico.<sup>16</sup>

En la actualidad, una gran variedad de estas especies vegetales, están siendo estudiadas por científicos, tratando de verificar sus principios activos que ayudan a mejorar la salud de las personas, entre estos compuestos se han encontrado, alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides y taninos, los cuales fueron encontrados en casi la totalidad de las plantas estudiadas, y en algunos casos solo en sus hojas o frutos.<sup>16</sup>

##### **2.2.4.1. *Bixa orellana* L. (ACHIOTE)**

La fitoterapia es uno de los campos científicos que viene generando grandes expectativas en el área de la salud. Diversos estudios han demostrado que muchas de estas plantas tienen propiedades que han brindado grandes beneficios para los seres humanos.<sup>16</sup>

Estas propiedades medicinales provienen ya sea de sus frutos, flor, tallo, semillas, hojas, etc. Muchas de sus efectos se pueden utilizar para combatir, prevenir o tratar distintas enfermedades. Todo a partir de un gran contenido de vitamina A, ácido fólico y ácido abscísico, hormona vegetal importantísima en la creación de fármacos para tratar afecciones inflamatorias.<sup>16</sup>

La *Bixa orellana* L. (Achiote) es una planta que, desde hace varias décadas, viene siendo estudiada, por lo que se ha descubierto que es de alta relevancia.<sup>16</sup>

En el Perú, es utilizada como alimento, condimento, colorantes de cosméticos, así como pintura de madera. Se ha comprobado la importancia de la *Bixa Orellana* L., pues brinda grandes beneficios en su uso medicinal porque comprende un gran cúmulo de nutrientes que benefician a nuestro organismo.<sup>17</sup>

En la actualidad es muy utilizada en varios tratamientos, por lo que es fundamental en el campo en el campo de la urología, en el tratamiento de prevención contra el cáncer y próstata, en el cual se le reconoce como una plata que posee características antioxidantes, antibacterianas y cicatrizantes.<sup>17</sup>

En odontología, la *Bixa Orellana* L. no ha sido muy estudiada, pero se cree que sus propiedades pueden ser aplicadas para contrarrestar las enfermedades más prevalentes, una de ellas es la caries dental.<sup>18</sup>

Mucho antes que se evaluaran sus propiedades científicamente, sus propiedades medicinales eran evidenciadas en la Amazonia peruana donde los nativos realizaban distintas preparaciones con las hojas para tratar las mordeduras de serpiente, también ayuda para la digestión y para aliviar la tos.<sup>18</sup> Además de sus beneficios medicinales, la semilla del achiote es el segundo colorante más importante del mucho, lo que indica la relevancia de la composición química de esta planta.<sup>18</sup>

Las hojas están compuestas de, Bixaganeno, ishwarano, sesquiterpenos, flavonoides, flavonas, antocianidinasn carotenoides, vitaminas, proteínas, azúcares, diterpenos, entre otros.<sup>19</sup>

**Efecto antimicrobiano:** algunos estudios han demostrado sus efectos antimicrobianos frente a una gran variedad de bacterias como *Neisseria gonorrea*, actividad

antimicrobiana contra bacterias que ocasionan la diarrea y disentería, incluyendo *Shigella dysenteriae*.<sup>19</sup>

### **2.2.5 Clorhexidina**

La clorhexidina, es una biguanida, bactericida de amplio espectro ante una gran variedad de bacterias, los estudios indican que no es irritante y no presenta capacidad de absorción, presenta un efecto entre 15 a 30 segundos de tiempo y dura hasta 6 horas.

20,21

Uno de los agentes antibacterianos utilizado para irrigar las zonas afectadas por bacterias es el uso de la clorhexidina, la cual viene en distintas concentraciones y propiedades químicas. Es un compuesto con una variedad de usos, y es considerado como el agente más eficaz en tratamientos de enfermedades periodontales.<sup>22</sup>

El mecanismo de acción de la clorhexidina se basa en reducir la formación de la biopelícula adquirida, alterando el desarrollo de las bacterias. Estos agentes se pueden conseguir en digluconato, acetato e hidrocloreuro.<sup>23</sup>

### III. Hipótesis

El extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana L.* (Achiote) al 75% presenta mayor efecto antibacteriano que las dos concentraciones al 25% y 50% frente a cepas de *Streptococcus mutans ATCC 25175*.

### IV. Metodología

#### 4.1. Diseño de la investigación

- Experimental, Puesto que el investigador a manipulado la variable independiente y su efecto sobre la variable dependiente.<sup>26</sup> En el estudio se manipulò las concentraciones de extracto hidroetanólico de achiote.
- Prospectivo, se registró la información según ocurrieron los fenómenos.<sup>26</sup> Este estudio midió cada resultado según los objetivos propuestos y se colocó en la ficha de recolección de datos.
- Transversal, porque la información fue tomada en un momento dado del tiempo.<sup>26</sup> Este estudio midió el efecto antibacteriano a las 48 horas de ser expuestos a los extractos.
- Analítico, porque el estudio se centró en una relación causa-efecto.<sup>26</sup> Este estudio determinó la causa que presentaron los extractos en diferentes concentraciones de las hojas de achiote sobre *S. mutans*.

## 4.2. Población y muestra

### 4.2.1 Población:

- Placas Petri sembradas con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### 4.2.1 Criterios de selección

#### Criterios de inclusión:

- Placas Petri sembradas con Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 27175.

#### Criterios de exclusión

- Placas Petri con halos de inhibición no muy claros.
- Placas Petri con signos de contaminación.

### 4.2.2 Muestra:

#### Tamaño de muestra:

Para determinar el tamaño de la muestra, se empleó la siguiente fórmula.

$$n = 2 \left( Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 (DE)^2 / d^2$$

Dónde:

n: tamaño de muestra para el grupo de estudio.

$\alpha$ : probabilidad de cometer error tipo I.

$\beta$ : probabilidad de cometer error tipo II.

Z: valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: desviación estándar.

d: diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias.

Requerimientos:

De una confianza al 95% ( $\alpha=0.05$ ,  $Z=1.96$ ), y una potencia en la prueba del 80% ( $\beta=0.20$ ,  $Z=0.84$ ), para ( $DE/d=0.80$ ).

$$n = 2(1.96 + 0.84)^2(0.8)^2$$

$$n = 10$$

Se realiza 10 repeticiones por cada grupo experimental (75%, 50%,25%) de *Bixa orellana* L. (achiote).se utilizaron 3 discos en cada placa Petri en total se utilizó 10 placas Petri para los grupos experimentales y dos discos en cada placa Petri para los controles positivo y negativo en total se emplearon 10 placas Petri.

### 4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Valores finales	Tipo de variable	Escala de medida de la variable
<b>Variable Independiente</b>  Extracto hidroetanólico de Bixa orellana L. (achiote)	Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta por diversos procedimientos. <sup>22</sup>	Son las diferentes concentraciones que tendrá el macerado del extracto a base de hojas de Bixa orellana L. (achiote)	concentración	25 % 50 % 75 %	Cualitativa	Ordinal
<b>Variable Dependiente</b>  Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i>	Bacteria gran positiva, aerobia, facultativa, precursora de la caries dental. <sup>23</sup>	Sensibilidad que tendrá la bacteria frente al extracto.	Halos de inhibición/ diámetros	mm	Cuantitativo	De razón

#### **4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:**

**4.4.1. Técnica:** observación microbiológica

**4.4.2. Instrumento:**

Para medir el efecto antibacteriano se utilizó un Vernier Digital Marca Mitutoyo - Modelo 500-196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper 0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad 17025. (Anexo 1)

Ficha de Recolección de datos. (Anexo 2)

**4.4.3. Procedimientos:**

**Obtención de los extractos hidroetanólicos de *Bixa orellana* L.**

##### **Identificación Taxonómica**

Las hojas de *Bixa Orellana* L. fueron adquiridos del bioterio de la Universidad Nacional de Trujillo. Luego un ejemplar completo de la planta fue llevado al Herbarium Truxillense de la misma universidad para su identificación y posterior verificación taxonómica. (Anexo 3)

##### **Recolección**

Se recolectó 2 Kg de *Bixa orellana* por la mañana, del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo, del distrito de Trujillo, provincia de Trujillo y de la región La Libertad, durante el mes de enero del año 2018. (Anexo 11)

##### **Preparación de la muestra vegetal**

**Selección:** Las hojas de *Bixa orellana* fueron recolectados y transportados al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se seleccionó las hojas que estén en buenas condiciones, que no estén decolorados y marchitas.



**Lavado y desinfección:** Luego se lavó las hojas con agua destilada, y se desinfecto con hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente se realizó un enjuague de cada hoja con suficiente agua destilada estéril, para retirar los residuos de hipoclorito.<sup>24</sup>

**Secado:** Las hojas de *Bixa orellana* fueron colocadas sobre papel Kraft y sometidas a secado primero a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se llevó a secar a la estufa de circulación de aire por convección forzada a una temperatura de 40°C. Se realizó la determinación de peso cada 24 horas hasta valores constantes.<sup>24</sup>

**Pulverización:** Las hojas una vez secadas, fueron pulverizadas con ayuda de un molino y mortero.<sup>24</sup>

**Tamizaje:** Luego las hojas pulverizadas, fueron tamizadas a través del tamiz N° 075.<sup>60</sup>

**Almacenamiento:** El polvo de las hojas de *Bixa orellana* obtenidos, fueron guardados en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha.<sup>24</sup>

### **Preparación de los extractos hidroetanólicos de las hojas de *Bixa orellana***

Se pesó con exactitud 250 g de polvo de *Bixa orellana* previamente tamizados. Luego se colocó en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha, de capacidad de 1 litro y se añadió etanol al 70° G.L. cantidad suficiente hasta cubrir la muestra por sobre 2 cm de altura.<sup>24</sup>

Se mezclaron bien, teniendo en cuenta que la mezcla debe ocupar como máximo las  $\frac{3}{4}$  partes del recipiente. Se tapó los recipientes y se macero por 7 días, agitándose 15 minutos, dos veces al día.<sup>24</sup>

Transcurrido el tiempo de maceración, se filtró el macerado, al vacío con papel de filtro Whatman N° 1. Las soluciones resultantes fueron llevadas a sequedad en una cámara de secado al vacío a una presión reducida y a una temperatura de 40 °C; luego

se pesó los residuos secos y se guardó en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio de color ámbar estéril. A partir de los extractos secos, se preparó las concentraciones de 25%, 50% y 75% disueltas en etanol de 70° G.L. respectivamente. Finalmente, los extractos hidroetanólicos de *Bixa orellana* fueron guardados en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su posterior utilización.<sup>24</sup>

#### **Preparación de las concentraciones del extracto *Bixa orellana***

A partir de los extractos hidroetanólicos de *Bixa orellana* (*Achiote*) se prepararon las concentraciones de 25%, 50% y 75% respectivamente.

#### **Reactivación frente a *S. mutans* ATCC 25175.**

Para este estudio se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La reactivación se realizó sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Brain Heart Infusión (BHI) o Cerebro Corazón Infusión, luego se incubo a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar TSYB e incubo a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se eligió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar coloración gram.<sup>25</sup>

A partir de una colonia se sembró en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), y se conservó hasta su posterior empleo.

#### **Estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175.**

La cepa *S. mutans* ATCC 25175 mantenida en Caldo BHI se sembró en Agar TSA, se incubo bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 24 horas. Luego de 24 horas de 3 a 4 colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se diluyo en caldo BHI

o solución salina fisiológica estéril hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  ufc/mL).<sup>25</sup>

### **Inoculación de las placas**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo ( $1.5 \times 10^8$  ufc/ml), se tomaron una alícuota de 100µl y se colocaron en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión, se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa. Se dejó secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.<sup>25</sup>

### **Enfrentamiento Microbiológico**

#### **Evaluación del efecto antibacteriano mediante el método de Kirby Bauer.**

La evaluación del efecto antibacteriano, se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar<sup>25</sup>

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

#### **Preparación de los discos con los extractos hidroetanólicos de hojas de *Bixa orellana*.**

Se prepararon discos de papel filtro whatman número 3 y se esterilizaron, luego se embebió con 50 ul de cada una de las concentraciones de 25%, 50%, 75% de extracto hidroetanólico de *Bixa orellana*. Respectivamente, y la mezcla de cada concentración. Se utilizó una pinza estéril, y se procedió a la colocación de los discos en las diferentes

placas de Müller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Se empleó como control positivo a clorhexidina al 0.12% y teniendo como control negativo a etanol al 70°.

### **Incubación:**

Se incubaron las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, a 37°C durante 48 horas en microanaerobiosis utilizando jarra Gaspak y con el método de la vela.

### **Lectura de los resultados**

Después del tiempo de incubación de 48 horas se examinó cada placa, y se midió los diámetros en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco. Para lo cual se utilizó una regla milimetrada vernier digital, abarcando el diámetro del halo.<sup>25</sup>

Se realizó 10 repeticiones de cada ensayo (disco)

Para la interpretación de los resultados, se tomó como referencia la escala de Duraffourd que es utilizada para evaluar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro según el diámetro de inhibición:

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

#### **4.5. Plan de análisis**

Los datos recolectados fueron procesados empleando el programa IBM SPSS Statistics 23, para comparar el tamaño de los halos de inhibición se usó la prueba estadística ANOVA; para obtener las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos se usó la prueba de Duncan. Ambas pruebas fueron consideradas con un nivel de significancia estadística del 5% ( $p < 0.05$ ). Los datos fueron organizados y presentados en Tablas y Gráficos estadísticos para su análisis e interpretación.

#### 4.6 Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Metodología	Población
<p>¿Cuál es el efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) frente a cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>?</p>	<p><b>Objetivo general:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparar el efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) frente a cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>.</li> </ul> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar el efecto del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) al 25% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>.</li> <li>• Evaluar el efecto del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) al 50% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>.</li> <li>• Evaluar el efecto del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) al 75% frente a <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>.</li> <li>• Comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) y gluconato de clorhexidina al 0,12% frente a cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>.</li> <li>• Comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) y etanol al 70° frente a cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>.</li> </ul>	<p>El extracto hidroetanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> (Achiote) al 75% presenta mayor efecto antibacteriano que las otras dos concentraciones frente a cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>.</p>	<p><b>Tipo de investigación.</b> Cuantitativa.</p> <p><b>Nivel de la investigación.</b> Explicativo</p> <p><b>Diseño de la investigación.</b> Experimental, prospectivo, transversal, analítico.</p>	<p>La población estuvo conformada por el conjunto de placas Petri sembrada con 100 µl de suspensión bacteriana de Cepas de <i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i></p>

#### **4.7 Principios éticos**

Este estudio de investigación se fundamentó en el código de ética de la Universidad Católica Los Ángeles De Chimbote.<sup>29</sup> Además al finalizar el estudio las placas Petri con cultivos utilizados fueron expuestas a 121° C Y 1 Bar de presión fueron inactivadas en autoclave a fin de desechar el material biológico contaminado aplicando las normas de manejo de desechos hospitalarios.<sup>30</sup>

Los residuos microbiológicos y patológicos fueron eliminados de forma tal que se asegure su descontaminación en autoclave (residuos microbiológicos) o incineración (residuos patológicos). Esto significa una bolsa primaria de color negro, se llenó solo hasta  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad y anudada y sobre ésta una bolsa color amarillo con logo y pre impreso de residuos especiales, se marcar el tipo de residuos que contuvo, el laboratorio o área de generación y la fecha. Estas bolsas cerradas anudadas, fueron almacenadas temporalmente en las áreas sucias en contenedores de color amarillo con logo de Residuo Biológico.<sup>31</sup>

## V. Resultados

### 5.1 Resultados

**Tabla 1**

*Comparación, in vitro, del efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetánico de hojas de Bixa orellana L. (Achiote) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.*

ANOVA

Concentración	N	Halo <i>x</i>  mm	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		p*
				Límite inferior	Límite superior	
25%	10	19.43	0.94	18.76	20.10	0.000
50%	10	23.35	0.78	22.79	23.91	
75%	10	26.38	0.69	25.89	26.87	
Clorhexidina 0.12 %	10	26.04	0.30	25.83	26.25	
Etanol 70°	10	9.20	0.42	8.90	9.20	

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

Nivel de significancia estadística ( $p < 0.05$ )

#### **Interpretación:**

Se utilizó la prueba ANOVA y se obtuvo  $p = 0.000$ , lo cual indica que existe diferencia estadística significativa entre los tres tipos de concentración.

Al 25% se obtuvo una media 19.43mm, al 50% se obtuvo una media 23.35 mm, y al 75% se obtuvo una media 26.38mm.



**Tabla 2**

***Subgrupos del efecto antimicrobiano, entre los extractos hidroetánicos de Bixa Orellana L. (Achiote) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.***

<b>DUNCAN</b>					
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Etanol 70%	10	9,200			
25%	10		19,430		
50%	10			23,350	
Clorhexidina al 0.12%	10				26,040
75°	10				26,380
Sig.		1,000	1,000	1,000	0,261

Fuente: Datos proporcionados por el investigador  
Nivel de significancia estadística ( $p < 0.05$ )

**Interpretación :**

Donde podemos indicar que las medias que presentan una diferencia significativa son:

En la columna 1 el etanol 70°; en la columna 2 el achiote 25%, en la columna 3 el achiote 50%.

Por otro lado, en la columna 4 la Clorhexidina al 0.12% con el achiote al 75%, no presentan diferencia significativa entre ambos.

## 5.2 Análisis de los resultados

En la presente investigación experimental, *in vitro*, se comparó la efectividad antibacteriana de los extractos hidroetanólicos de hojas de *Bixa orellana L.* (Achiote), a concentraciones del 25%, 50% y 75% frente a cepas de *Streptococcus mutans*. Los resultados demostraron que el *Streptococcus. mutans* es susceptible a la acción del extracto hidroetanólico de *Bixa orellana L.* a medida que aumenta la concentración se obtiene mayores halos de inhibición. Así mismo la acción antibacteriana del extracto hidroetanólico al 75% fue significativamente mayor que el etanol al 70% y presentó una igualdad de acción antibacteriana con Digluconato de clorhexidina 0,12%. Esto se debería a la presencia dentro de las hojas de *Bixa orellana L.* una composición de polifenoles, los cuales desempeñan un papel importante en la protección contra agentes patógenos, donde pueden retrasar el crecimiento bacteriano debido a que cambian las condiciones del medio y penetran en la membrana celular de los microorganismos provocando lisis.<sup>19</sup>

Al evaluar el efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana L.* frente a cepas de *Streptococcus mutans*, se demostró que las tres concentraciones de las hojas de achiote presentan efecto antibacteriano, sin embargo, la concentración al 75% presentó mayor diámetro de los halos de inhibición. Presentan similitud los estudios experimentales realizado por, **Tamil A<sup>8</sup>, (India, 2011)** e **Irobi O<sup>9</sup>, (Canadá, 2008)**; **Espinoza J<sup>4</sup>, (Perú,2016)** y **Troncoso H<sup>5</sup>, (Perú,2014)** también han demostrado las propiedades antibacterianas de las hojas de *Bixa orellana*

L., pero en otras cepas de microorganismos Gram positivos, sin embargo presentaron métodos similares a nuestro estudio. Tal efecto podría deberse al contenido de flavonoides presentes en las hojas, los cuales tienen la capacidad de ensamblar complejos extracelulares y proteínas solubles con la pared celular de los *S. mutans*. Asimismo, los flavonoides lipofílicos de las hojas de achiote pueden alterar las membranas celulares de las bacterias.<sup>13</sup>

Al comparar el efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetánolico de las hojas de *Bixa orellana* L. y Digluconato de Clorhexidina al 0.12% frente a cepas de *Streptococcus mutans*, se demostró que la concentración al 75% obtuvo iguales efectos antibacterianos que la clorhexidina. Estos resultados se pudieron dar porque, además de los flavonoides, las hojas de achiote, también contienen saponinas y esteroides, los cuales tienen capacidad de causar filtración de proteínas y enzimas de las células bacterianas, además, de causar fugas de liposomas. Por otro lado, presentan diferencias los estudios de **Medina D<sup>3</sup>, (Perú, 2016)** demostraron que, los extractos metanólicos de hojas y semilla de *Bixa orellana* presentan menor efecto que la clorhexidina al 0.12% porque su actividad antimicrobiana es atribuida a su unión y disrupción de la membrana citoplásmica, alterando el equilibrio osmótico y causando la precipitación de los contenidos celulares bacterianos.<sup>13</sup> Por otro lado, los estudios de, **Duailibe S<sup>6</sup>, (Brasil, 2015)** demostraron que, el extracto de *Bixa Orellana* no presenta actividad antimicrobiana.

Hay resultados contradictorios con **Duailibe S<sup>6</sup>, (Brasil, 2015)** quien en su estudio obtuvo resultados diferentes en sus halos de inhibición, pudiéndose deber a las variaciones metodológicas y los materiales empleados, señalando que debe deberse a diversos factores como la técnica de valoración, medio de crecimiento, microorganismos empleados y la composición química de los extractos. Esto también se debería las condiciones del lugar donde se desarrolló, como el suelo, clima, altura generando alteraciones en su composición.<sup>16</sup>

Al comparar el efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetánolico de hojas de *Bixa orellana L.* y Etanol al 70° frente a cepas de *Streptococcus mutans*, se demostró que, las hojas de *Bixa orellana* presentó mayor efecto antibacteriano en comparación del etanol al 70°. Estos resultados se pudieron dar porque, el extracto al 70% actuó un solvente orgánico muy efectivo para extraer los fenoles y flavonoides de las hojas de *Bixa orellana*, los cuales son responsables de la actividad antibacteriana.<sup>19</sup>

## VI. Conclusiones

1. El extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* L. al 75% presentó mayor efecto antibacteriano que las otras 2 concentraciones frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. El extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* L. al 75% presenta igual efecto antibacteriano que el Digluconato de clorhexidina al 0.12%, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
3. Las concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* L. al 25%, 50% y 75% presentan mayor efecto antibacteriano que el Etanol al 70°, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## **Aspectos complementarios**

- 1.** Realizar estudios, in vivo, para la elaboración o formulación de enjuagatorios bucales, dentífricos que contengan extracto de *Bixa orellana L.* (ACHIOTE).
- 2.** Impulsar a realizar estudios de más plantas medicinales para impulsar conocimiento de su acción sobre bacterias que causan la caries dental.

## Referencias bibliográficas

1. Nuñez D, García L. Bioquímica de la caries dental. Rev Hab de Cienc Med. 2010; 9 (2): 156 – 166.
2. Calixto M. Plantas medicinales utilizadas en odontología. Kiru.2006; 3 (2): 80-5. Disponible en: <http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2006rv2/kiru7.pdf>
3. Medina D, Ulloa G, Camere R, Caballero S, Mayta F, Valle J. Antibacterial activity of *Bixa orellana* L. (achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. As. Pacif. J. Trop. Biom. [Online] 2016 [Cited may 31; 2018]; 6(5): 400-403. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115309485>
4. Espinoza J. Eficacia antibacteriana de la *Bixa orellana* “Achiote” sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, comparado con oxacilina, estudio in vitro [Tesis]. Perú: Universidad César Vallejo. Facultad de ciencias médicas; 2016. Disponible en: [http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/20969/Espinoza\\_RJS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/20969/Espinoza_RJS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
5. Troncoso H. Valoración del cultivo de *Bixa orellana* (achiote), evaluando su actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima in vitro de los extractos acuoso y etanólico de hojas y corteza frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Arequipa, 2013 [Tesis]. Perú: Universidad Católica de Santa María. Facultad de odontología: 2014. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/54221002.pdf>

6. Duailibe S, Macedo M, Lima K, Uzeda M. *In vitro* antibacterial activity of two plants extracts against *Enterococcus faecalis*. *Afric. J. Microbiol. Res.* [Online] 2015 [Cited may 31; 2018]; 9(14): 1020-1025. Available in: [http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/123456789/22929/1/In%20vitro%20antibacterial%20activity%20of%20two%20plant%20extracts%20against%20Enterococcus%20faecalis\\_2015.pdf](http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/123456789/22929/1/In%20vitro%20antibacterial%20activity%20of%20two%20plant%20extracts%20against%20Enterococcus%20faecalis_2015.pdf)
7. Abayomi M, Adebayo A, Bennett D, Porter R, Campbell J, Dawkin G. Phytochemical Testing and In vitro Antibacterial Activity of *Bixa orellana* (Annatto) Seed Extract. *British Journal of Pharmaceutical Research.* [Online] 2014 [Cited march 28; 2019]; 4(11): 1387-1399. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/269411674\\_Phytochemical\\_Testing\\_and\\_In\\_vitro\\_Antibacterial\\_Activity\\_of\\_Bixa\\_orellana\\_Annatto\\_Seed\\_Extract](https://www.researchgate.net/publication/269411674_Phytochemical_Testing_and_In_vitro_Antibacterial_Activity_of_Bixa_orellana_Annatto_Seed_Extract)
8. Tamil A, Dinesh G, Satyan S, Chandrasekaran B, Rose C. Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *J. App. Pharmac. Science.* [Online] 2011 [Cited may 31; 2018]; 1(9): 116-120. Available in: [http://japsonline.com/admin/php/uploads/273\\_pdf.pdf](http://japsonline.com/admin/php/uploads/273_pdf.pdf)
9. Irobi O, Young M, Anderson W. Antimicrobial Activity of Annatto (*Bixa orellana*) Extract. *Pharmac. Biol.* [Online] 2008 [Cited may 31; 2018]; 34(2): 87-90. Available in: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1076/phbi.34.2.87.13201?needAccess=true>
10. Ryam K, Ray G. *Microbiología médica.* 4 ed. México: McGraw Hill. Interamericana.2005. pp. 214-918



11. Gonzales S, Pedroso L, Rivero M, Reyes V. Epidemiología de la caries dental en la población venezolana menor de 19 años. Rev. Cient. Med. Habana. [Revista en línea] 2014 [Citado el 5 de enero del 2019]; 20(2): 208-218. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revciemedhab/cmh-2014/cmh142i.pdf>
12. Miguelañez B, Pastor M, Sarría B. Estado actual de la etiología de la caries dental. Revisión bibliográfica del último año [internet]. Univ. Rey. Ju. Carl. 2007 [citado el 17 de noviembre del 2018]. disponible en: [https://biopat.es.urje.es/conganat/files/2006-2007\\_G13.pdf](https://biopat.es.urje.es/conganat/files/2006-2007_G13.pdf)
13. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* and dental caries. Ces Odontol. 2013; 26(1):44-56.
14. Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica 2a ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana; 2009. p. 237-9.
15. American Type Culture Collection. [Página principal en Internet]. Virginia: ATCC; c2009 [consultada el 25 de octubre 2018]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/25175.aspx>.
16. Lourido H, Martínez G. La *Bixa orellana L.* en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. Rev Cub Farmacia. 2010; 44(2): 231-44.
17. Ciro G, Quintana J, Alarcón J, Zapata J. Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana L.*: A potential natural food preservative. Interciencia. 2012; 37 (7): 547- 51.
18. Ball AJ, Carr W, Gillespie A, Kelly M, Simpson A, Smith J. Bladder irrigation with chlorhexidine for the prevention of urinary infection after transurethral operations. A prospective controlled study. J Urol. 1987; 138(3): 491-494.

19. Instituto Nacional de Salud. Achiote. Disponible en: [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/7/jer/censi\\_plant\\_indi/Achiote\\_Vademecum.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/7/jer/censi_plant_indi/Achiote_Vademecum.pdf)
20. Lowbury E, Lilly A. Use chlorhexidine detergent solution and other methods of skin disinfection. *Br Med J.* 1973;1 (5852): 510-515.
21. Gerd N, Larsson L, Christensen K, Christensen P, Dykes A. Clorhexidine for prevention of desinfection with Group B streptococci. Effect washing with chlorhexidine. *Eur J Odontologia Reproduct Biol.* 1989; 31(3): 221-226.
22. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba. 2002.
23. Instituto Nacional de Salud. Achiote. Perú: MINSA; 2010. p.1-18
24. Miranda M. Métodos de análisis e drogas y extractos, Cuba: Universidad Nacional Ciudad de la Habana.Instituto de farmacia y alimentos; 2002.
25. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement.2013; 33(1):1-200  
Available in: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=55d77c2f614325f5d38b461b&assetKey=AS:273836702928896@1442299165694>
26. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6ª ed. México: Interamericana; 2014.

27. Ingraham J. Ingraham C. Enfermedades humanas causados por microorganismos. En: Introducción a la microbiología. 1 ed. España: Reverté S.A.; 1998. p.555-557.
28. Huarino M, Ramos D. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) sobre flora salival mixta. *Odontol. Sanmarquina*. 2013; 16(1): 32-35.
29. Código de ética para la investigación. ULADECH. Versión 001 [Internet]. [citado 02 marzo 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/7455/codigo-de-etica-paralainvestigacionv001.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
30. Fica, A, Ruíz G, Yunes Alí. Normas de manejo de desechos hospitalarios. *REV. Medwave* [Internet] 2008 [citado 02 diciembre 2019];3(3)
31. Procedimiento para el manejo de eliminación de residuos biológicos. Universidad católica pontificia de Chile. 2013; 1-7 Disponible en: <http://postgrado.bio.uc.cl/wp-content/uploads/2015/06/manejo-y-eliminacion-de-residuos-biologicos.pdf>

# ANEXOS

## Anexo 1

**VERNIER DIGITAL** marca MITUTOYO, Modelo 500-196-20 ABSOLUTE  
Digimatic Caliper 0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad  
17025



Anexo 2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

REPETICIONES	HALOS DE INHIBICIÓN EN MM				
	extracto hidroetanólico de las hojas de Bixa orellana			control positivo	control negativo
	25%	50%	75%	clorhexidina 0.12%	etanol 70°
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

## Anexo 3

### CONSTANCIA DE TAXONOMÍA



#### Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 006 – 2018- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae.
- Superorden Rosanae
- Orden: Malvales
- Familia: Bixaceae
- Género: *Bixa*
- Especie: *B. orellana* L.
- Nombre vulgar: "achiote"

Muestra alcanzada a este despacho por MERLY COLLANTES VARGAS, identificada con DNI 47024744, con domicilio legal en Alto Trujillo, Barrio 3 Mz. P., Lt. 28, El Porvenir, Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la Realización de un proyecto de tesis titulada: 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.

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 13 de Febrero del 2018



Dr. JOSÉ MOSTACERD LEÓN  
Director del Herbario HUT



cc. Herbario HUT

E- mail: [herbariumtruxillensehut@yahoo.com](mailto:herbariumtruxillensehut@yahoo.com)

## Anexo 4

Constancia de colaboración de **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ** Dra. En farmacia y bioquímica en la ejecución del proyecto de investigación

### CONSTANCIA

Yo, **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**, Docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727 y acreditada como Docente investigadora por CONCYTEC.

Dejo constancia de haber colaborado en la preparación de la muestra vegetal y las concentraciones, de los extractos hidroetanólicos de hojas de *Bixa orellana L.* (ACHIOTE), en el laboratorio de farmacognosia de la facultad de farmacia y bioquímica de la universidad de Trujillo, a la alumna COLLANTES VARGAS MERLY, identificada con DNI 47024744, con domicilio legal en Alto Trujillo, Barrio 3 Mz. P, Lt. 28, El Porvenir\_ Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, en la ejecución de la tesis titulada 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

Se expide esta constancia, a solicitud del interesado, para los fines que estime pertinentes.

Trujillo, 05 de febrero del 2018.



  
Dra. **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**  
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Laboratorio de Farmacognosia  
Universidad Nacional de Trujillo



## Anexo 5

Constancia de colaboración de **MANUELA NATIVIDAD LUJAN VELÁSQUEZ**,  
Biólogo – Microbióloga en la ejecución del proyecto de investigación.

### CONSTANCIA

Yo, **MANUELA NATIVIDAD LUJAN VELÁSQUEZ**, Bióloga\_Microbiologa Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, dela Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N°2132.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado con la alumna COLLANTES VARGAS MERLY, identificada con DNI 47024744, con domicilio legal en Alto Trujillo, Barrio 3 Mz. P, Lt. 28, El Porvenir\_ Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, en la ejecución de la tesis titulada 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

Trujillo 13 de febrero del 2018

Manuela Natividad Lujan Velásquez

Docente De La Escuela De Microbiológica Y Parasitología

Universidad Nacional De Trujillo.

.....  
Manuela Natividad Lujan Velásquez  
SECRETARIA DE INMUNOLOGIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

## Anexo 6

Constancia de colaboración de **DAVID CUBA CAMPOS**, Ingeniero Estadístico en la ejecución del informe final de investigación.

### CONSTANCIA

Yo, **DAVID JONATÁN CUBA CAMPOS** con DNI: 45488304, Ingeniero Estadístico de la Universidad Nacional de Trujillo.

Dejo constancia de haber colaborado con la alumna **COLLANTES VARGAS MERLY**, identificada con DNI 47024744, con domicilio legal en Alto Trujillo, Barrio 3 Mz. P, Lt. 28, El Porvenir\_ Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote.

Se hace constar que se colaboró con el análisis estadístico de la tesis titulada 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

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.



FIRMA

David Jonatán Cuba Campos

Trujillo, 5 de febrero 2018

## Anexo 7

### RESULTADOS

*Comparación del efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetánolico de hojas de Bixa orellana l. (achiote) frente a Streptococcus mutans ATCC 25175”, determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, método Kirby Bauer.*

<b>Extractos</b> <b>Concentraciones</b> <b>Repeticiones</b>	<b>Bixa orellana</b> <b>achiote</b> <b>(mm)</b>			<b>C+</b> <b>(mm)</b>	<b>C-</b> <b>(mm)</b>
	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>		
<b>1.</b>	<b>17.8</b>	<b>24.2</b>	<b>26.7</b>	<b>25.6</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>19.6</b>	<b>22.4</b>	<b>26.9</b>	<b>26.3</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>20.4</b>	<b>22.1</b>	<b>27.2</b>	<b>26</b>	<b>9</b>
<b>4.</b>	<b>20</b>	<b>24.2</b>	<b>26.3</b>	<b>25.7</b>	<b>9</b>
<b>5.</b>	<b>19.3</b>	<b>22.9</b>	<b>25</b>	<b>25.8</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>17.8</b>	<b>24.9</b>	<b>27.2</b>	<b>26.1</b>	<b>9</b>
<b>7.</b>	<b>19.2</b>	<b>23.2</b>	<b>25.7</b>	<b>26.4</b>	<b>9</b>
<b>8.</b>	<b>20.2</b>	<b>23.7</b>	<b>26</b>	<b>25.9</b>	<b>9</b>
<b>9.</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>26.5</b>	<b>26.1</b>	<b>9</b>
<b>10.</b>	<b>20</b>	<b>23.4</b>	<b>26.3</b>	<b>26.5</b>	<b>9</b>

C+= Gluconato de clorhexidina al 0.12%

C- = etanol

## Anexo 8

### PRUEBA DE NORMALIDAD

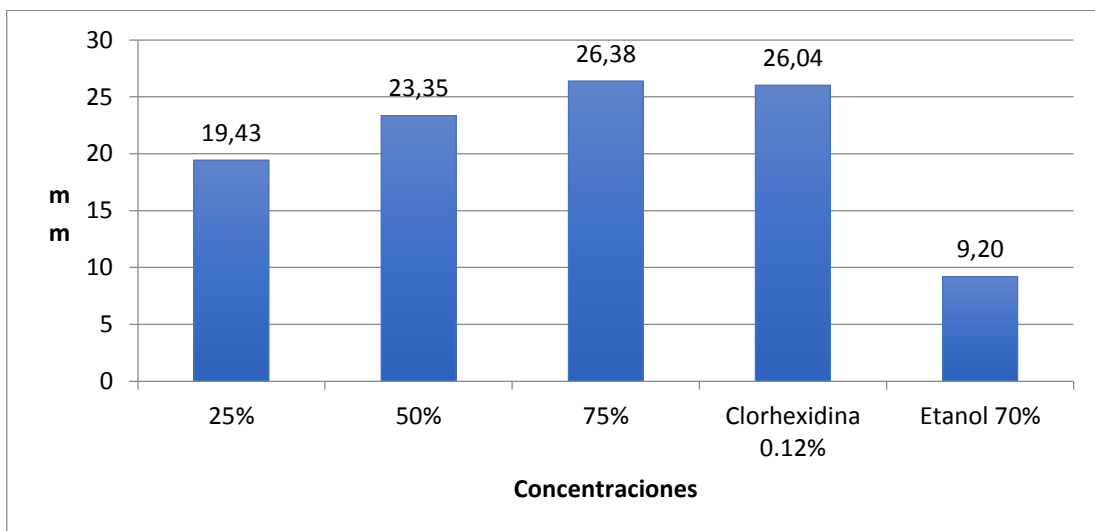
<b>Grupo</b>	<b>Shapiro-Wilk</b>			<b>Distribución Normal</b>
	<b>Estadístico</b>	<b>gl</b>	<b>Sig.</b>	
25%	0,945	10	0,612	Normalidad
50%	0,951	10	0,684	Normalidad
75%	0,945	10	0,612	Normalidad
Clorhexidina 0.12%	0,968	10	0,875	Normalidad
Etanol 70°	0,890	10	0,172	Normalidad

Al tener menos de 50 datos por cada extracto y controles, es recomendable usar la prueba de normalidad del Shapiro- Wilk, para evaluar la normalidad de los mismos, donde se observa una distribución normal de datos para todos los grupos evaluados.

## Anexo 9

Gráfico 1:

*Comparación in vitro del efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetánolico de hojas de Bixa orellana L. (Achiote) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.*



Fuente: Datos proporcionados por el investigador

## Anexo 10

### PROCESAMIENTO DE LOS EXTRACTOS HIDROETANOLICOS DE *Bixa Orellana L.* REALIZADO EN LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNT

#### SELECCIÓN, LAVADO Y DESINFECCIÓN



Se lavaron las hojas de la Planta *Bixa orellana L.* (ACHIOTE) y se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 0,5%

#### SECADO



Secado a Temperatura Ambiente por 24 horas y en estufa a 40°C de Hojas de la Planta *Bixa orellana L.* (ACHIOTE). Pulverización, Tamizaje se pesó 250gr. de *Bixa orellana L.* (ACHIOTE)

## PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROETANÓLICOS DE *Bixa orellana* L. (ACHIOTE)



Mezcla de Alcohol 96° con Agua Destilada (etanol al 70°) para *Bixa orellana* L. (ACHIOTE) Tiempo de maceración por 7 y se agitara 15 minutos dos veces al día el frasco.



Se filtró el macerado de *Bixa orellana* L. (ACHIOTE), al vacío con papel filtro Whatman N°1. Equipo de rotavapor que se utilizó para eliminar el solvente y obtener un residuo seco de los extractos hidroetanólicos de *Bixa orellana* L. (ACHIOTE).  
Extractos Hidroetanólicos de *Bixa orellana* L. (ACHIOTE).

### Concentraciones:

*Bixa orellana* L. (ACHIOTE), las concentraciones de 25% (250 mg/mL), 50% (500 mg/mL), 75% (750 mg/mL) disueltas en etanol de 70°.

## INOCULACION DE LAS PLACAS



Hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inoculo de la placa.

## PREPARACION DE LOS DISCOS DE PAPEL FILTRO WHATMAN

### NÚMERO 3 ESTÉRILES



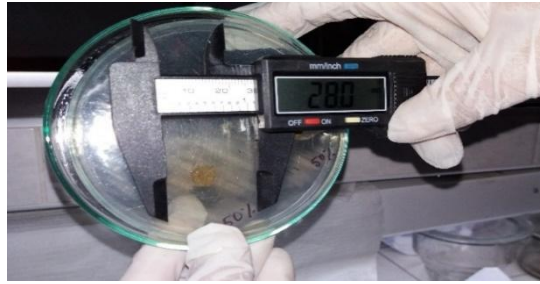
Preparación de los discos de papel filtro whatman número 3 estériles, embebidos con 50 ul de cada una de las concentraciones de 25% ,50% y 75% del Extracto Hidroetanolico de *Bixa orellana L.* (ACHIOTE)

## LECTURA DE RESULTADOS

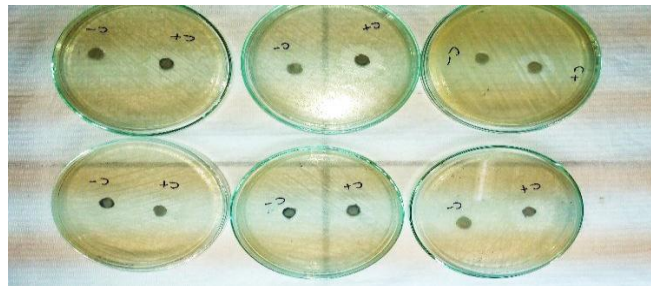


Se midieron los diámetros de los halos de Inhibición de *Bixa orellana L.* (ACHIOTE)





Se midieron los diámetros de halos de Inhibición del efecto sinérgico de *Bixa orellana* L. (ACHIOTE al 50%)



Placas Petri del control positivo clorhexidina al 0,12% y control negativo etanol 70°



Se midieron los halos de Inhibición del Control Positivo (Clorhexidina al 0,12%)



Se midieron los halos de Inhibición del Control Negativo (Etanol al 70°)