



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bixa orellana* L. COMPARADA CON CEFALEXINA, SOBRE *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTOR:

JULIO MONTOYA OXOLON

ASESOR:

**DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ
MG. BLGO. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

TRUJILLO – PERÚ

2019



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

PÁGINA DEL JURADO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bixa orellana* L. COMPARADA CON
CEFALEXINA, SOBRE *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO**

Dra. Ana María Chian García

PRESIDENTE DEL JURADO

Dra. María Rocío Del Pilar Llaque Sánchez

SECRETARIA DEL JURADO

MG. BLGO. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

VOCAL DEL JURADO

FECHA DE SUSTENTACIÓN Y APROBACIÓN: 25 de febrero del 2019.

DEDICATORIA

A MI MADRE

En memoria de mi madre Aneliza, por darme la vida, por tu infinito amor y por haberme infundido el amor a Dios y al prójimo, por su apoyo en todo momento, tus consejos y valores que me han permitido ser hombre de bien, todo esto te lo debo a tí.

JULIO MONTOYA OXOLON

AGRADECIMIENTO

A Dios, por haberme permitido lograr mis objetivos y haberme dado una madre maravillosa para poder alcanzar mis metas, además de su infinita bondad y amor.

A mis asesores: Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez y Mg. Blgo. Jaime Abelardo Polo Gamboa por su gran apoyo y motivación permanente para la culminación de mis estudios y elaboración de mi tesis.

A mi familia, hermanos y hermanas mayores por sus ejemplos, del cual aprendí con aciertos en momentos difíciles. A mi hija Kimberly Jhuliet motor de mi vida.

A la Universidad César Vallejo de Trujillo, alma mater, a todos sus docentes y administrativos quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda formarme como profesional y persona, gracias a cada uno de ustedes.

JULIO MONTOYA OXOLON

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Montoya Oxolon, Julio con DNI 00961045 estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamentos de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bixa orellana* L. COMPARADA CON CEFALEXINA, SOBRE *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO, son:

1. De mi autoría
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad Cesar Vallejo.

Trujillo, febrero del 2019.

Montoya Oxolon, Julio

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bixa orellana* L. COMPARADA CON CEFALEXINA, SOBRE *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

El Autor.

ÍNDICE

PÁGINAS PRELIMINARES

PÁGINA DEL JURADO	ii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD.....	vi
PRESENTACIÓN	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	1
1.2 TRABAJOS PREVIOS.....	2
1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA.....	5
1.4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	7
1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	7
1.6 HIPÓTESIS.....	9
1.7 OBJETIVO GENERAL	9
1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
II. METODOLOGÍA	10
2.1 TIPOS DE ESTUDIO	10
2.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	10
2.3 VARIABLES	10
2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	12
2.5 UNIDAD DE ANÁLISIS	12
2.6 UNIDAD MUESTRAL:	12
2.7 MÉTODO DE MUESTREO	12
2.8 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	12
2.9 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	12
2.10 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:	12
2.11 EL PROCEDIMIENTO:	13
2.12 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS:	13
2.13 ASPECTOS ÉTICOS:	13

III.	RESULTADOS	14
IV.	DISCUSIÓN	18
V.	CONCLUSIONES	22
VI.	SUGERENCIAS.....	23
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
VIII.	ANEXOS.....	28
	ANEXO 01.....	28
	ANEXO 02.....	29
	ANEXO 03.....	30
	ANEXO 04.....	39
	ANEXO 05.....	40
	ANEXO 06.....	41
	ANEXO 07.....	42
	ANEXO 08.....	43
	ANEXO 09.....	44
	ANEXO 10.....	45
	ANEXO 11.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Identificación taxonómica de <i>Bixa orellana</i> L. por el Herbarium Truxillens	29
Figura 2: <i>Bixa orellana</i> en estado natural en la Selva Peruana	30
Figura 3: <i>Bixa orellana</i> en Proceso de Secado	31
Figura 4: Proceso de Filtrado de <i>Bixa Orellana</i>	32
Figura 5: Proceso de Concentración de <i>Bixa Orellana</i>	32
Figura 6: Proceso de Cultivo de <i>Bixa Orellana</i>	32
Figura 7: Preparación del inóculo de <i>Bixa Orellana</i>	34
Figura 8: Siembra del microorganismo de <i>Bixa Orellana</i>	35
Figura 9: Preparación de las concentraciones del EE.....	36
Figura 10: Preparación de los discos de sensibilidad con EE.....	37
Figura 11: Lectura e Interpretación mediante la regla Vernier	38
Figura 12: Manejo de Riesgos mediante la Bioseguridad	41
Figura 13: Constancia de Asesoría de Desarrollo de Tesis	45
Figura 14: Constancia de Ejecución de Desarrollo de Tesis	46

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comparación de la eficacia del extracto acuoso de las hojas del <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote” con la cefalexina	17
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”	14
Tabla 2: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”	15
Tabla 3: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”	16
Tabla 4: Promedios de Halos de Inhibición (mm).....	39
Tabla 5: homogeneidad de varianzas para el uso de post	42
Tabla 6: Efecto antibacteriano según criterio CLSI	43
Tabla 7: Comparaciones múltiples.....	44

RESUMEN

En el estudio se determinó el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. "Achiote", sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, a las siguientes diluciones: 100%, 75%, 50%, 25% comparado con cefalexina a 30 µg y control negativo con DMSO; se realizaron 10 repeticiones por cada grupo estudiado. Se evidenció efecto inhibitorio al 100% la media fue de 14.30 mm, DE: 1.418 ± 0.448 , (con valor máximo de 17 mm y mínimo de 12 mm), IC al 95% (de 13.29 – 15.31). Si bien se evidenció haber cierto grado de inhibición, no superó al estándar (CLSI: ≥ 15 mm). Al 75% - 50% de concentración, los halos de inhibición fueron mucho menores (entre 11.60 mm a 5.60 mm). La Cefalexina demostró halos de inhibición media de 16.60 mm, DE: 0.966 ± 0.306 (con un valor máximo de 18 mm y un mínimo de 15 mm), IC al 95% (de 15.95 – 17.29) considerado sensible. El análisis multivariado (ANOVA), fue altamente significativa 0.0000 ($p < 0.01$), la prueba post ANOVA Tukey nos evidencia que, a mayor concentración, mayor es el halo de inhibición, al 100% es 3 veces mayor que al 25%. Se concluye que el extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. "Achiote", si tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028 pero no supera el efecto de cefalexina. Pudiendo ser este producto utilizado como un medicamento coadyuvante en el tratamiento de *Proteus mirabilis* ATCC 14028.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, *Bixa orellana* L., *Proteus mirabilis*, halo de inhibición.

ABSTRACT

In the study, the antibacterial effect of the aqueous extract of the leaves of *Bixa Orellana L.* "Achiote" was determined on strains of *Proteus mirabilis ATCC 14028*, at the following dilutions: 100%, 75%, 50%, 25% compared with cefalexin at 30 µg and negative control with DMSO; 10 repetitions were performed for each group studied. A 100% inhibitory effect was evidenced; the mean was 14.30 mm, SD: 1.418 ± 0.448 , (with a maximum value of 17 mm and a minimum of 12 mm), 95% CI (13.29 - 15.31). Although there was evidence of a certain degree of inhibition, it did not exceed the standard (CLSI: ≥ 15 mm). At 75% - 50% concentration, zones of inhibition were much lower (between 11.60 mm to 5.60 mm). Cefalexin demonstrated mean zones of inhibition of 16.60 mm, SD: 0.966 ± 0.306 (with a maximum value of 18 mm and a minimum of 15 mm), 95% CI (15.95 - 17.29) considered sensitive. The multivariate analysis (ANOVA) was highly significant 0.000 ($p < 0.01$), the post-ANOVA Tukey-test shows that the higher the concentration, the higher the zone of inhibition, at 100% it is 3 times greater than 25%. It is concluded that the aqueous extract of the leaves of *Bixa Orellana L.* "Achiote" has an antibacterial effect on *Proteus mirabilis ATCC 14028* strains but does not exceed the effect of cefalexin. This product could be used as an adjuvant medicine in the treatment of *Proteus mirabilis ATCC 14028*.

Keywords: Antibacterial activity, *Bixa Orellana L.*, *Proteus mirabilis*, zone of inhibition.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA

En el mercado mundial la industria farmacológica origina un consumo de 250,000 millones al año aproximadamente, países desarrollados como Francia, Suiza y Estados Unidos tienen un gasto aproximado de 160 dólares por habitante, y se calcula que de cada 100 preparados comerciales sólo 25 serían realmente útiles. La industria farmacéutica tuvo un importante crecimiento y un incremento continuo de nuevos y más eficaces productos medicinales sintéticos y biológicos, sin embargo la importancia de las plantas medicinales no ha disminuido en muchas sociedades actuales. Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de nuevos medicamentos. Los medicamentos herbarios, que formaron la base de la atención de salud en todo el mundo desde los primeros días de la humanidad, siguen utilizándose ampliamente y tienen una considerable importancia en el comercio internacional. Sigue en aumento el reconocimiento de su valor clínico, farmacéutico y económico, si bien esto varía ampliamente entre un país y otro.¹

La *Proteus Mirabilis* es una bacteria gram negativa enteropatógena, facultativamente anaeróbica y es la causa del 90% de todas las infecciones por proteus. Esta bacteria se encuentra comúnmente en el tracto intestinal humano como parte de su flora bacteriana. Esta bacteria puede producir litos renales, infecciones de heridas, septicemias y neumonías en pacientes hospitalizados. Esta bacteria es una de las causas más frecuentemente de infección en las vías urinarias altas y bajas; además es frecuente que ocasione infecciones ocultas, es decir, asintomáticas que solo al realizar el cultivo se puede diagnosticar.²

La Organización Mundial de la Salud, en base a los resultados y progresos avanzados en distintos países del mundo incluido el Perú y también en respuesta a la resolución del año 2009 de la Asamblea Mundial de la salud sobre la medicina tradicional y ante los nuevos retos que se plantean actualmente en este campo de la medicina complementaria, desarrollo las nuevas estrategias sobre la medicina tradicional para el periodo 2014 - 2023, la cual brindará el apoyo necesario a las autoridades sanitarias de cada país miembro para buscar estrategias con el fin de mejorar las prestaciones de salud la medicina tradicional y complementaria mediante reglamentación de productos, buenas prácticas y profesionales capacitados.³

Nuestro país posee una riqueza enorme de variedades de plantas medicinales más de 80,000 especies, ya que contamos con 28 climas de los 32 que existen en el planeta y que cuya magnitud aún es desconocida y lo más triste de nuestra realidad es que los conocimientos ancestrales se han ido perdiendo en el tiempo por no contar con un registro adecuado y políticas de estado que integren a la medicina tradicional complementaria a los sistemas de salud a lo largo de todo el territorio nacional y proteger los conocimientos ancestrales. Hace 18 años, EsSalud viene incorporando plantas medicinales a su sistema de salud, logrando disminuir el consumo de medicamentos entre sus asegurados, precisamente la ciudad de Trujillo cuenta con una de sus sedes.⁴

1.2 TRABAJOS PREVIOS

Alim S et al (USA, 2016), estudiaron el potencial antibacteriano in vitro de *Bixa orellana L.* contra algunas bacterias patógenas e investigó sobre algunos antibióticos estándar; donde el extracto de hoja metanólico (10 µl de 20 mg / ml a cada disco correspondiente a 200 µg / disco) de *Bixa orellana L.* significativamente exhibió fuertes efectos antibacterianos contra dos bacterias gram Positivas (*Bacillus subtilis*, *Sarcinalutea*) y seis bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* y *Proteus Vulgaris* con halo de inhibición de 9 a 14 mm, al 75 y 100% respectivamente.⁵

Yolmet M et al (Irán, 2014), estudiaron experimentalmente la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (MBC) del extracto acuoso de *Bixa orellana L.* "Achiote" contra las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 70876), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Proteus mirabilis* (ATCC14028), *Salmonella enteritidis*, *Listeria innocua* (ATCC 33090). De modo que los extractos acuosos de *Bixa orellana L.* "achiote" fueron extraídos por métodos convencionales y los métodos de los EAU, encontraron halos de inhibición antibacteriana de 13.5 y 14.2 mm de zona libre de microbios con concentraciones al 75 y 100% respectivamente. De acuerdo con los resultados, extracto acuoso de *Bixa orellana L.* "Achiote" resultando como efecto antibacteriano frente a estas bacterias mencionadas.⁶

Tamil S et al (India, 2011), estudiaron la actividad antibacteriana del extracto de metanol de las hojas de *Bixa orellana L.* (achiote), in vitro contra cepas MTCC de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus fecalis*,

Proteus mirabilis, *Vibro cholera*, *Moraxella catarrhalis*, *Acinetobacter sp*, *Brucella sp*. Junto con los patógenos fúngicos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y los dermatofitos *trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. El extracto de hoja de *Bixa Orellana L.* a 1000 µg / ml de concentración al 100%, mostró Inhibición significativa contra todas las bacterias y hongos probados, con la zona de inhibición más alta ($18 \pm 0,3$ mm). Extracto de semilla de *Bixa orellana L.* contra *S. typhi*, *Acinetobacter sp.*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, fue comparativamente menos eficaz en la mayoría de los patógenos probados, excepto en *Brucella sp*. El cual fue inhibido apreciablemente (15 ± 0.1 mm).⁷

Galindo V et al (USA, 2003), realizaron un estudio para determinar si los extractos acuosos de *annato* o *Bixa orellana L.* "Achiote", son capaces de influir en el crecimiento de los microorganismos patógenos seleccionados. Se utilizaron técnicas de difusión por discos y macro dilución de tubos para determinar las MIC y los MBC de extracto de *annato* o *Bixa orellana L.* "Achiote" solubles en agua de doble potencia. Se usaron discos antibióticos estándar como controles para como controles para el ensayo de difusión de disco. Los resultados demostraron que *annato* o *Bixa orellana L.* "Achiote" tienen efecto inhibitorio sobre *Bacillus cerus*, *Clostridium perfringens*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus*, con MIC de 0.08, 0.31 y 0.16% (vol/vol) y diámetro de halos de inhibición de 9 a 10, 12 a 13 y 15 a 16 mm, al 50, 75 y 100% respectivamente.⁸

Medina D et al (Perú, 2016), estudiaron la actividad citotóxica y el efecto antibacteriano del extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* sobre las cepas bacterianas con una inhibición las zonas de más de 12 mm se consideraron positivas; por *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y para *Proteus mirabilis* ATCC 14028 un halo de inhibición de 15,45 mm al 100% de la concentración; con el extracto de semilla produjo una zona de inhibición de 15,11 mm con una Desviación estándar de ± 1.03 y las hojas extraen una zona de inhibición de 19,97 mm, con una Desviación estándar de ± 1.31 , al 100% de concentración. Además, las placas de Petri con *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) mostraron una zona de inhibición de 16,15 mm con una Desviación estándar de ± 2.25 para semillas y para el extracto acuoso de las hojas y 19,97 mm con una Desviación estándar de ± 1.26 , respectivamente. En ambos cultivos bacterianos una mayor inhibición se observó en los extractos metanólicos de las hojas de *Bixa orellana L.*⁹

Adenea D (Perú, 2015), comparó el efecto antibacteriano y citotóxico del extracto acuoso y metanólico de hojas de *Bixa orellana L.* sobre *Streptococcus mutans*, *Proteus mirabilis* y

Streptococcus sanguis. Se prepararon dos extractos de hojas, realizándose 10 pruebas con un control de Clorhexidina al 0.12%. Se usó el método de discos de difusión, luego se procedió a la lectura. Se halló la CIM y se determinó el efecto citotóxico del extracto metanólico, el cual tuvo mayor efecto antibacteriano de las hojas con halos de 19.97 ± 1.31 mm y 15.1 ± 1.26 mm para el extracto acuoso a concentraciones del 100%. También realizaron pruebas con el extracto metanólico de las semillas, el cual mostro inhibición de 15.11 ± 1.03 mm y 16.15 ± 2.15 mm al 75 y 100%, sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* respectivamente.¹⁰

Espíndola M (Perú, 2015), evaluó la actividad fúngica del extracto etanólico de las hoja de *Bixa orellana* L. "Achiote" sobre *Candida albicans* ATCC 10231, por el método de Kirby Bauer (Difusión en disco) y la determinación de la concentración mínima inhibitoria, al comparar los halos de inhibición según la escala de Duraffourd, donde obtuvieron actividad antifúngica a partir de concentraciones mayor del 50% y 75% con promedios de halos que van desde 11.6 y 16.1 mm de diámetros respectivamente, mientras que al 100% un halo de 33.8 mm asemejándose al fluconazol 50mg/ml. Utilizó ANOVA y DUNCAN, observándose diferencia estadísticamente significativa entre diferentes concentraciones del extracto sobre el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 ($P < 0.05$).¹¹

Troncoso H (Perú, 2013), evaluó la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. "achiote" frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, mediante los métodos de maceración e infusión, dio como resultados la no generación de halos de inhibición de nuestros extractos frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomona aeruginosa*, por tal razón podemos confirmar que los extractos etanólicos y acuosos de hojas y corteza no poseen actividad antibacteriana frente a dichas bacterias; tal como fue descrito por Álvarez y col. (2007) de que los extractos de *Bixa orellana* L. ("achiote") no poseen actividad antimicrobiana ante las especies antes mencionadas.¹² Para el análisis de datos se realizó la técnica de análisis de varianza ANOVA, para tratamiento de los datos se partió de un modelo matemático unifactorial. Como prueba estadística se utilizó la distribución de probabilidad de Fisher con un nivel de confianza del 95%. Para reforzar la decisión tomada en el análisis de varianza, se realizó la prueba de especificidad de Tuckey. El presente estudio se realizó en la Región Arequipa Perú a 2,335 msnm.¹²

1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

La *Bixa orellana* L. ``achiote``, Familia: Bixaceae, Género: *Bixa* y Especie: *Orellana* L. es un árbol o arbusto de 3 – 8 metros de altura, con hojas ovadas o acorazonadas lisas y puntiagudas con una flor hermafrodita y fruto en capsula espinosa, que encierra las semillas en su interior y que son de color rojizo. Esta planta es oriunda del Brasil, y puede crecer hasta una altitud de 1800 msnm en zonas tropicales, es una de las pocas plantas aceptadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual ha sido utilizada para proteger y restaurar la salud antes de la llegada de la medicina moderna, aún tiene mucho por ser estudiada y analizada. En las hojas de esta planta se encontraron los flavonoides (apigenina, hipoaetina, cosmosiina) diterpenos (farnesilacetona, garanil geraniol, geranil formato) y un derivado sesquiterpénico, alcaloides, asteroides, fenoles, taninos pirogálicos, antraquinonas, cumarinas fijas, aceites esenciales y ácido gálico, vitaminas (A, B, y C); los cuales poseen acción antimicrobiana, los cuales convierten a *Bixa orellana* L. en una potencial fuente de antibiótico.¹³

Bixa es el nombre puesto por los nativos, que los hombres de Colón encontraron en la Isla Española, Ahora Santo Domingo. Asimismo, también lleva el apellido *Orellana*, en honor al aventurero compañero de Pizarro que descubrió el Amazonas; quedando bautizada la planta con el nombre científico de *Bixa orellana* L.; del Caribe pasaron a México donde encontraron que la planta recibía el nombre de “Achiotl”, esto dio origen a una serie de nombres locales encabezados por “Achiote”, “Achote”, “Achiotillo”, “Achiti”, “Achite Amarillo”, “Achite colorado”, “Achiuhiti”, etc.; cuando los ingleses se posesionaron de las islas del norte del Caribe, encontraron que los indígenas de esa región llamaban a esta planta “Onoto”, y de allí se derivó el término “Annatto” con que es conocida en la literatura inglesa y el mercado internacional.¹⁴

El *Proteus mirabilis*, es una bacteria Gram negativa enteropatógena, facultativamente anaeróbica, esta bacteria genera la infección del tracto urinario que es la patología con mayor frecuencia etiológicamente y que además son productoras de ureasa elevadas, la cual convierte la urea en dióxido de carbono y amonio. Este proceso conlleva a elevar el pH urinario, facilitando así la formación de cálculos renales. Otra alteración producida por esta bacteria es que aumenta la alcalinidad de la orina la cual es muy tóxica para el urotelio. La bacteria *Proteus mirabilis* puede disminuir su virulencia al aumentar la fagocitosis de los bacilos.¹⁴

El *Proteus mirabilis* es una de las bacterias más susceptibles a los antibacterianos, incluso a las penicilinas, en comparación con otros miembros de su grupo. La especie *Proteus mirabilis* es la que con mayor frecuencia está implicada, al igual que otras enterobacterias como *E. coli*, responsables en mayor frecuencia de infecciones urinarias y cutáneas; está también puede producir septicemia especialmente en pacientes inmunocomprometidos, y ocasionalmente produce infección pulmonar. Se cree que el germen alcanza la vía aérea por inhalación, implicándose el papel de la colonización intestinal como posible reservorio.^{15 y 16}

El efecto antimicrobiano, es la capacidad que tiene una droga vegetal para generar una actividad inhibitoria sobre el crecimiento de un determinado germen. Se emplean métodos de difusión en placas o discos con agar, o en tubos con caldo de cultivo. El método consiste en impregnar discos de papel secante de 6 mm de diámetro y 0,6 mm de grosor con 50 µl del extracto vegetal. Se aplican los discos en el cultivo y se incuban a 35°C durante 24 horas. Al retirar se deberá ver (en caso de actividad) halos de inhibición que se miden en mm. Si el halo inhibitorio dio mayor igual a 15 mm, el resultado se considera sensible. Si el halo inhibitorio es menor igual a 14 mm, el resultado se considera resistente (sin actividad). Con este método se puede determinar la concentración mínima Inhibitoria que requiere la droga vegetal para matar al microorganismo. La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja que requiere el extracto ensayo para que haya crecimiento visible^{17 y 18}.

La cefalexina, es un antibiótico de primera generación del grupo de las cefalosporinas, esta inhibe la síntesis de la pared bacteriana de una manera semejante como lo hace la penicilina, la actividad antibacteriana es similar al de las demás cefalosporinas de primera generación, pero posee además actividad contra algunas especies enterobacter, por lo que lo hace el Gold estándar para frente al *Proteus mirabilis*. La cefalexina es un ácido estable que puede administrarse por la vía oral juntamente con las comidas; y que es absorbida con rapidez en el tracto gastrointestinal la cual alcanza el pico de concentración plasmática una hora después de la administración. Se pueden determinar niveles plasmáticos hasta 6 horas luego de la ingestión. Se excreta por filtración glomerular y secreción tubular 70% de la droga, sin modificaciones, en orina, durante 12 horas después de la administración; la vida media de eliminación es de una hora y media¹⁹.

Las contraindicaciones e hipersensibilidad a la cefalexina o a otros compuestos del grupo de las cefalosporinas se pueden dar por el contenido sacarosa, este se no debe administrar en pacientes con intolerancia hereditaria a la fructosa, ya que tienen una mala absorción a la glucosa o galactosa o deficiencia de sacarosa isomaltasa; además se debe tener precauciones con la insuficiencia hepática y se debe evaluar la relación beneficio-riesgo; así como en la Insuficiencia renal, se recomiendan dosis reducidas; para pacientes con hipersensibilidad a las penicilinas y pacientes con antecedentes de alergia; debe evaluarse la relación beneficio-riesgo en caso de enfermedades hemorrágicas y enfermedad gastrointestinal (colitis ulcerosa, enteritis regional).²⁰

También se considera peligrosa en pacientes con porfiria y los pacientes con diabetes mellitus; los efectos indeseables frecuentes son, dolor abdominal, cefalea, hipersensibilidad, rash, prurito, urticaria y otras ocasionales como eosinofilia, fiebre, dolores articulares, mialgia, angioedema, edema y eritema, enfermedad del suero y anafilaxia, neutropenia, trombopenia, afectación de las enzimas hepáticas, hepatitis transitoria, íctero por colestasis, depresión de la médula ósea, nefritis intersticial reversible, nerviosismo, insomnio, confusión mental, hipertensión y mareos, superinfección con microorganismos resistentes especialmente *Candida* y colitis pseudomembranosa; y las más raras como náuseas, vómitos, diarrea, anemia hemolítica, sangramientos por hipoprotrombinemia y neurotoxicidad; se han observado convulsiones y otros signos de toxicidad sobre el Sistema Nervioso Central con dosis altas, especialmente en pacientes con disfunción renal grave.²¹

1.4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Tiene efecto antibacteriano in vitro el extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* “achiote” sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, comparado con cefalexina a la concentración de 30 µg, en un estudio in vitro?

1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Esta investigación permitirá tener alternativas de tratamiento complementario a las farmacológicas y aportar para el desarrollo de nuevos medicamentos, como agentes terapéuticos; así como un material de consulta base para futuros proyectos de investigación ya que empezamos con el fitocomplejo de la planta, pues este actúa debido a la interacción y potenciación de los principios activos una alternativa para la síntesis de medicamentos o como modelo para compuestos farmacológicamente activos.

El conocimiento de las bondades curativas de la gran variedad de plantas medicinales que podemos encontrar a lo largo de todo el territorio de nuestro país y que se fueron perdiendo en el tiempo, transmitidas de generación en generación, hoy pretendo aportar con este proyecto de investigación, con ciencia, basada en el conocimiento farmacológico de la planta *Bixa orellana L.*, identificar sus aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos con fines terapéuticos sobre una enterobacteria, como el *Proteus mirabilis*, responsable de una alta gama de enfermedades en el ser humano brindando una alternativa de tratamiento tradicional o como coadyuvante o sinergizándose al tratamiento convencional del antibiótico.^{22, 23}

Desde muchos años atrás, contamos con una de las definiciones más aceptada: “*terapia complementaria que utiliza plantas o parte de ellas donde el empirismo de la medicina tradicional se transforma en fundamento científico*” de acuerdo a esta notable definición podría decir que la medicina tradicional es puesta a prueba mediante estudios científicos de laboratorio para validar o desestimar su uso popular como tratamiento contra la enterobacteria *Proteus mirabilis*. La actividad antibacteriana de la *Bixa orellana L.* es una de las pocas aceptadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual ha sido utilizada para proteger y restaurar la salud antes de la llegada de la medicina moderna, reconoce la importancia en el tratamiento de muchas enfermedades, por lo que con apoyo de la Universidad César Vallejo de Trujillo, mediante el estudio científico de laboratorio del extracto acuoso del *Bixa orellana L.* pretendo demostrar o desestimar el efecto antibacteriano sobre la el *Proteus mirabilis* como tratamiento alternativo convencional.²⁴

La aplicabilidad de este estudio científico es el retorno a nuestras raíces con el fin de mejorar nuestra salud a costos realmente bajos, impulsando la revalorización de nuestra riqueza en plantas medicinales como una forma complementaria de curar, en que el empirismo queda atrás en función de la evidencia científica, armonizando las terapias complementarias con la medicina sintética derivada y mejorada de las plantas como alternativa de tratamientos coadyuvante a bajo costo.

La droga vegetal a utilizar para este estudio serán las hojas adultas de la planta del *Bixa orellana L.* emplearemos el extracto de las hojas adultas de la planta, la cual contiene una fuente rica en de moléculas farmacológicamente activas utilizadas de manera empírica por la población ancestral, esta técnica nos permitirá un acercamiento a los potenciales activos biológicos de la

planta, la cual aprovecharemos a través del fitocomplejo de la planta conformada por la unión de todos sus principios activos, sustancias coadyuvantes, minerales, etc., que se sinergizan y equilibran de tal forma que optimizan el resultado buscado. En este trabajo de investigación evaluaremos la dosis mínima inhibitoria antibacteriana del *Bixa orellana L.* mediante repeticiones múltiples, in vitro.²⁵

1.6 HIPÓTESIS

H₁: El extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* "Achiote" tiene efecto antibacteriano, comparada con la cefalexina a la concentración de 30 µg, sobre cepas de *Proteus mirabilis ATCC 14028*, estudio in vitro.

H₀: El extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* "Achiote" NO tiene efecto antibacteriano comparada con la cefalexina a la concentración de 30 µg, sobre cepas de *Proteus mirabilis ATCC 14028*, estudio in vitro.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* "Achiote", comparada con la cefalexina a la concentración de 30 µg, sobre cepas de *Proteus mirabilis ATCC 14028*, estudio in vitro.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.8.1** Determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.*, a la concentración del 100%.
- 1.8.2** Determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.*, a la concentración del 75%.
- 1.8.3** Determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.*, a la concentración del 50%.
- 1.8.4** Determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.*, a la concentración del 25%.
- 1.8.5** Establecer el efecto antibacteriano de la cefalexina a la concentración de 30 µg.

II. METODOLOGÍA

2.1 TIPOS DE ESTUDIO

El tipo de estudio que se usará será el BÁSICO

2.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Experimental: Con repeticiones múltiples, post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Donde:

RG: Grupos de estudio: 06.

X1: Extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* al 25%

X2: Extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* al 50%

X3: Extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* al 75%

X4: Extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* al 100%

X5: Control positivo: Cefalexina 30µg.

X6: Control negativo: Agua destilada

O: Observaciones del halo de inhibición

2.3 VARIABLES

Variable Independiente: Agente antibacteriano

- No farmacológico: Extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana L.* "Achiote".
- Farmacológico: Cefalexina a la concentración de 30 µg.

Variable Dependiente: Efecto antibacteriano

- Eficaz: tamaño del halo de inhibición: ≥ 15 mm
- No eficaz: tamaño del halo de inhibición: ≤ 14 mm

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V.I.: Agente antibacteriano	Para el tratamiento del <i>Proteus mirabilis</i> , se utiliza: Tratamiento no farmacológico con el extracto acuoso de las hojas del <i>Bixa orellana L.</i> ^{13, 14, 15} Tratamiento farmacológico con cefalexina ^{21, 22}	La población será dividida en los siguientes grupos: a) <i>Bixa orellana L.</i> al 100% b) <i>Bixa orellana L.</i> al 75% c) <i>Bixa orellana L.</i> al 50% d) <i>Bixa orellana L.</i> al 25% e) cefalexina f) Solución salina	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa nominal
V.D.: Efecto antibacteriano.	Es la disminución del crecimiento bacteriano del <i>Proteus mirabilis L.</i> que se manifiesta con la presencia del halo inhibitorio en placas petri ^{13, 23, 30}	Se evaluó normas y procedimientos establecidos en los estándares M02-A12 ²⁹ y M100 ³⁰ si: Resistente: (Menor igual ≤ 14 mm). Sensible : (Mayor Igual a 15 mm).	Eficaz: (≥ 15 mm) No eficaz: (≤ 14 mm)	Cualitativa nominal

2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

2.4.1 Población: Estuvo constituido por todas las cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028. Cultivadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad Cesar Vallejo de Trujillo, bajo condiciones controladas.

2.4.2 Muestra: Tamaño de muestra, En el presente estudio se aplicó la muestra para diferencia de dos promedios²⁵. (Ver Anexo 01) Se obtuvo un total de 10 repeticiones para cada dilución. Se realizaron 60 observaciones.

2.5 UNIDAD DE ANÁLISIS

Cada cepa cultivada de *Proteus mirabilis* ATCC 14028.

2.6 UNIDAD MUESTRAL:

Cada placa Petri con medio de cultivo que contienen cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028.

2.7 MÉTODO DE MUESTREO

Fue aleatorio simple en cada grupo de observación.

2.8 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todos los cultivos con cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, que no presente contacto con medicamentos o alguna solución antimicrobiana.

2.9 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Todos los cultivos con cepas de *Proteus mirabilis* contaminadas.
- Todas las cepas cultivadas donde no creció la bacteria.

2.10 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

La técnica, consistió en la observación del crecimiento de las colonias de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, mediante la medición de los halos de inhibición.

2.11 EL PROCEDIMIENTO:

- a) La planta fue identificada taxonómicamente por el Herbarium Truxillense - HUT. (Anexo 02)
- b) Se obtuvo el extracto acuoso de *Bixa orellana L.*, mediante el método de infusión en agua destilada³¹. (Anexo 03)
- c) Se utilizó el medio de cultivo agar Muller-Hinton, para el cultivo de la cepa de *Proteus mirabilis ATCC 14028*, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI a través del estándar M02-A12³⁰.
- d) Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M02-A12²⁹ y M100³⁰ del CLSI, mediante el método de Kirby Bauer.

El instrumento, Se utilizó, la ficha de recolección de datos que consta el número de placas, las diluciones y los milímetros de los halos de inhibición. (Ver Anexo N° 04).

La validación del instrumento, El instrumento fue validado por opinión de tres profesionales médico y biólogo quienes analizaron que los ítems considerados en la ficha de recolección de datos, fueran relevantes para el estudio y tuvieran claridad, objetividad, actualidad, organización, suficiencia, intencionalidad, consistencia, coherencia, metodología y oportunidad para su aplicación²⁹. (Ver Anexo N° 05)

2.12 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS:

La información fue analizada en el programa IBM SPSS STATISTICS 25, la cual permitió elaborar tablas para el análisis correspondiente. En el presente estudio, por ser multivariable, se utilizó el método de análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de por lo menos un tratamiento diferente que tuviera significancia estadística para determinar qué dilución del extracto acuoso de la hoja de *Bixa orellana* será la mejor. Se aplicó también la prueba de Tukey para establecer la homogeneidad de los resultados.

2.13 ASPECTOS ÉTICOS:

El presente estudio conto con la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo. El estudio se realizó respetando los criterios de las Normas de Ética en la investigación considerados las normas de bioseguridad en el laboratorio clínico³¹ (Ver anexo N° 06).

III. RESULTADOS

Tabla 1: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. "Achiote", comparada con la cefalexina a la concentración de 30 µg, sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, estudio in vitro.

Tabla 1: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del Bixa orellana L. "Achiote"

DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN								
Tratamiento	N	Media	DE	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media			
					Límite inferior	Límite superior	Mín	Máx
EABO al 100%	10	14.30	1.418	0.448	13.29	15.31	12	17
EABO al 75%	10	11.60	1.713	0.542	10.37	12.83	9	15
EABO al 50%	10	7.70	0.949	0.300	7.02	8.38	7	10
EABO al 25%	10	5.60	0.699	0.221	5.10	6.10	5	7
Cefalexina	10	16.60	0.966	0.306	15.91	17.29	15	18

Fuente: Reporte de resultados del SPSS versión 25, El

EABO=Extracto acuoso de *Bixa orellana* L.; DE=Desviación Estándar; Min=Mínimo; Máx=Máximo;

Tabla 2: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. "Achiote", comparada con la cefalexina a la concentración de 30 µg, sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, estudio in vitro.

Tabla 2: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del Bixa orellana L. "Achiote"

ANOVA					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	825,320	4	206,330	141,970	0,0000
Dentro de grupos	65,400	45	1,453		
Total	890,720	49			

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

Tabla 3: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. “Achiote”, comparada con la cefalexina a la concentración de 30 µg, sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, estudio in vitro.

Tabla 3: Eficacia del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. “Achiote”

Pruebas Post – hoc de Tukey						
ENSAYOS						
HSD Tukey ^a						
GRUPOS	Nº	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
EABO al 25%	10	5,60				
EABO al 50%	10		7,70			
EABO al 75%	10			11,60		
EABO al 100%	10				14,30	
Cefalexina	10					16,60
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

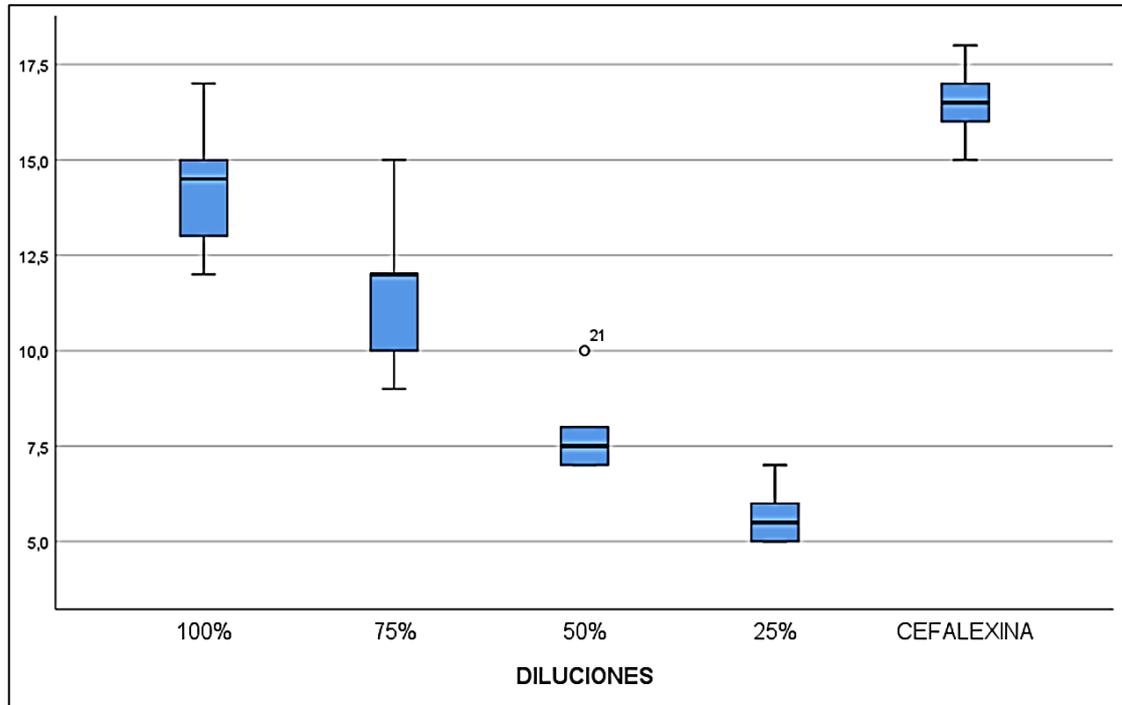
Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

EABO=Extracto acuoso de *Bixa orellana* L.

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Gráfico 1: Comparación de la eficacia del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. "Achiote" con la cefalexina



Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

Gráfico 1. Eficacia del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. "Achiote", comparada con la cefalexina a la concentración de 30 µg, sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, estudio in vitro.

IV. DISCUSIÓN

En la siguiente investigación el objetivo fue evaluar la eficacia del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. “achiote”, a diferentes concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%), comparada con cefalexina (30 µg), sobre cepas de *Proteus mirabilis* ATCC 14028, observándose 10 placas por grupo con un total de 60 cultivos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

En la Tabla 1, se observa de manera descriptiva la media de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones y el antimicrobiano de referencia. A la concentración del 100%, del extracto acuoso de las hojas del *Bixa orellana* L. “achiote” observamos que obtuvo una media del 14.30 mm, con una DE: 1.418 ± 0.448 , (donde el valor máximo fue de 17 mm y un mínimo de 12 mm), el IC al 95% para la media tuvo como límite inferior 13.29 y el límite superior fue de 15.31, encontrando significancia. Si bien es cierto, el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. al 100% muestra tener cierto grado de inhibición, éste no supera lo observado por el CLSI (≥ 15 mm)³¹. A las concentraciones de 75%, 50% y 25% los halos de inhibición fueron mucho menores que varían entre 11.60 mm, 7.70 mm y 5.60 mm respectivamente.

Por otro lado, la cefalexina demostró halos de inhibición con una media del 16.60 mm, con una DE: 0.966 ± 0.306 (donde el valor máximo fue de 18 mm y un mínimo de 15 mm), el IC al 95% para la media tuvo como límite inferior 15.95 y el límite superior fue de 17.29, considerado sensible según el CLSI (≥ 15 mm).³¹

Estos resultados son similares al trabajo de investigación de Yolmeh M. et al⁶, quienes encontraron que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre el efecto que tienen el extracto acuoso de *Bixa orellana* L. contra enterobacterias, utilizando el mismo método de disco difusión para la prueba de susceptibilidad, lo cual indica que existe la posibilidad que los fitoquímicos activos antibacterianos del extracto de *Bixa orellana* L. “achiote” sean diferentes en tipo y cantidades; ya que obtuvieron halos de inhibición entre 13,2 a 14,5 mm (75 y 100% de concentración). En el estudio de Galindo V. et al⁸, para determinar si los extractos acuosos de *annato* o *Bixa orellana* L. “achiote”, son capaces de influir en el crecimiento de los microorganismos patógenos tienen efecto inhibitorio sobre *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus*, con MIC de 0.08, 0.31 y 0.16% (vol/vol) y diámetros de halos de inhibición de 9 a 10, 12 a 13 y 15 a 16 mm (50, 75 y 100% de concentración respectivamente).

Los resultados que se obtuvieron en la presente investigación, tienen valores que difieren de otros; como los obtenidos por Alim S. et al⁵ quienes obtuvieron una zona de inhibición entre 9 y 14 mm a concentraciones de 75 y 100% respectivamente, lo cual se considera que *Proteus mirabilis* es resistente al extracto de hojas de *Bixa orellana L.* Los cual, difiere mucho de lo obtenido por Tamil et al,⁷ quienes observaron que las medidas de los halos de inhibición mayores de 18 mm \pm 3 mm al 100% de concentración, no estaban distantes respecto al promedio obtenido, por lo que la desviación estándar estuvo entre 0,1 a 0,2.

En estudios como el de Medina D. et al⁹, encuentran que el extracto acuoso de las hojas de bixa Orellana presentó halos de inhibición, para bacterias como *Streptococcus mutans*, el halo de inhibición fue de 12 mm, para *Proteus mirabilis* 15.45 mm, *Streptococcus sanguinis* 16.15 mm, de halo de inhibición al 100% de concentración, evidenciando que la planta para estos agentes patógenos si tiene efecto inhibitorio; igualmente Adenea D.¹⁰, con extracto acuoso y metanólico de hojas de *Bixa Orellana L.* comparándolas entre ellas se determinó para *Streptococcus mutans*, *Proteus mirabilis* y *Streptococcus sanguis* valores de halos de inhibición con extracto metanólico de 19.97 \pm 1.31 mm y 19.97 \pm 1.26 mm para ambas cepas y en relación al extracto de acuoso el halo de inhibición fueron de 15.11mm y 16.15 mm, a concentraciones del 100% para ambas cepas respectivamente.

Espínola R.¹¹, evaluó el efecto antimicótico del extracto de las hojas del *Bixa orellana L.* con *Candida albicans* encontrando efecto antimicótico al 50% y 75% (11.6 mm y 16.1 mm) y al 100% el halo fue de 38.8 mm semejante al Fluconazol; utilizó ANOVA y DUNCAN observándose diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones del extracto ($p < 0.001$), sin embargo se puede observar que la Cefalexina es relativamente mayor su halo de inhibición, por el tipo de bacteria en estudio. Troncoso H. evaluó la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana L.* "achiote" frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, mediante los métodos de maceración e infusión, dio como resultados la no generación de halos de inhibición de nuestros extractos frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomona aeruginosa*, podemos confirmar que los extractos etanólicos y acuosos de hojas se recolecto dentro de la región de Arequipa Perú, ya que dicha planta es de origen tropical por debajo de los 1800 msnm.

La enterobacteria *Proteus mirabilis* se diferencia a otras bacterias porque es sensible a cefalosporinas y ampicilina, muchos organismos aislados de todas las especies son sensibles antibióticos aminoglucósidos y a la combinación de trimetoprima y sulfametoxazol. Se constatan formas resistentes, particularmente en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo, por lo que se sugiere estudios usando el extracto acuoso de *Bixa orellana L.* unido a la cefalexina para evaluar si potencia su efecto antibacteriano¹⁸.

Se desarrolló el método de infusión para la utilización del complejo fitoquímico de la planta de manera sencilla, sin altos costos y de proceso rápido, que mediante reacciones químicas produce la alteración rápida en la estructura molecular del *Proteus mirabilis ATCC 14028*, estos complejo fitoquímico se sinergizan entre si potenciándose, entre ellos tenemos los Flavonoides, conocida también como antitoxina, posee efecto antiinflamatorio, antimicrobiano, antialérgico, analgésico entre otro; los Taninos, posee acción astringente, hemostático, antiséptico, antibacteriana, priva a los microorganismos del medio apropiado para su desarrollo, debido especialmente a que provocan desnaturalización de las proteínas; también presenta Alcaloides, poseen propiedades antineoplásicas; las Saponinas, poseen importante actividad antibacteriana debido a que reduce la tensión superficial y actúa sobre los lípidos de la membrana bacteriana y que probablemente debido a la presencia de lipopolisacáridos en la pared celular de las enterobacterias gramnegativas (*Proteus mirabilis*), éstos complejos fitoquímicos que posee la planta se complementan entre sí, presentando una importante actividad antibacteriana provocando alteraciones de las mismas, lo que conlleva a la muerte celular de estas bacterias. Influye el tipo de suelo tropical y clima húmedo a menor de 1800 msnm^{17 y 38}.

Cabe destacar que, a pesar de los grandes avances tecnológicos (medios de cultivo, automatización, biología molecular), las enfermedades infecciosas no han sido erradicadas, por el contrario, la susceptibilidad de las personas versus el incremento de la resistencia antibiótica nos invita a buscar nuevas alternativas de tratamiento como la medicina complementaria^{14 y 15}.

En la tabla 2, nos indica que al realizar el análisis multivariado (ANOVA), y considerando la normalidad de los datos, se comprobó que entre las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Bixa orellana L.* existe una diferencia altamente significativa entre las medias que fue de 0.0000, al inhibir el crecimiento bacteriano del *Proteus mirabilis ATCC 14028*. Lo que implica que al menos una de las concentraciones del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana L.* es

mejor que la otra, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa puesto que el resultado fue menor que el valor de $P < 0.01$.

Tabla 3, consideramos la existencia de homogeneidad de sus varianzas por lo que es pertinente la ejecución de la prueba post ANOVA Tukey, donde se puede visualizar las diferentes diluciones y halos de inhibición por grupos, se obtuvo que a mayor concentración del extracto acuoso de las hojas de *Bixa Orellana* L. mayor es el halo de inhibición. A la concentración del 100% (14.30) es tres veces mayor que al 25% (5.60), y al 75% (11.60) es dos veces mayor y al 50 % es menor (7.7mm).

En el Gráfico 1, se visualiza claramente el comportamiento de las medias de los halos de inhibición anteriormente manifestado, donde cefalexina muestra un halo de inhibición con valor mínimo de 15 mm, con una media de 16.6 mm y una máxima de 18 mm, se visualiza también que, a mayor concentración del extracto acuoso de la planta, mayor es el halo de inhibición, donde observamos al 75% llegando a obtener 15 mm y en el 100% hasta 17.5 mm como valores máximos, con lo cual se evidencia que, si tiene efecto inhibitorio, pero menor a la cefalexina. Frente a estos resultados, el CLSI considera los puntos de corte de sensibilidad y resistencia, para la familia *Enterobacteriaceae* en conjunto, y no individual por especie de bacteria de esta familia. Por lo cual, el efecto que tiene la cefalexina para *P. mirabilis*, es el mismo que tiene para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, y todas las demás especies de la familia *Enterobacteriaceae*. De igual modo, el efecto del extracto acuoso de la *Bixa orellana* es el mismo para todas las *Enterobacteriaceae*. Por ello, al momento de hacer el análisis de los resultados, se puede comparar el efecto con otras enterobacterias²⁹.

V. CONCLUSIONES

- ✓ El extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote", evidenció tener efecto antibacteriano sobre *Proteus mirabilis* ATCC 14028, a mayores concentraciones, sin embargo, fue menor que el de la cefalexina, según los criterios del CLSI (≥ 15 mm).
- ✓ A concentraciones del 100%, el halo de inhibición es mayor, fue de 14.30 mm.
- ✓ A concentraciones del 75%, el halo de inhibición, fue de 11.60 mm.
- ✓ A concentraciones de 50%, el halo de inhibición, fue de 7.70 mm.
- ✓ Y a la concentración de 25%, el halo de inhibición, fue de 5.60 mm.
- ✓ La cefalexina a 30 μg mostro un halo de inhibición media de 16.6 mm.

VI. SUGERENCIAS

- ✓ La planta que se utilizó en el estudio fue traída de la selva peruana en su estado silvestre del Caserío de Tananta, provincia de Tocache, departamento de San Martín, se recomienda ampliar el estudio utilizando el Achiote silvestre de otras zonas del Perú como la sierra para evaluar si la temperatura, suelo, clima influyen en la concentración de los componentes fitoquímicos de la planta que le dan el efecto antibacteriano.

- ✓ Se recomienda realizar estudios de susceptibilidad del achiote con extractos alcohólicos, extractos crudos, aceites esenciales, etc. y confrontarlos con diversos patógenos bacterianos y fúngicos.

- ✓ Se sugiere realizar estudios del efecto antibacteriano de la planta en modelos animales, que permita valorar su acción antibacteriana o antimicótica en seres vivos que están sujetos a otra dinámica fisiológica.

- ✓ Realizar estudios usando el extracto acuoso de Bixa Orellana L. unido a la cefalexina para evaluar si potencia su efecto antibacteriano.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso J Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. [en línea]. Argentina: Ed. Corpus; 2004. [citado 12 jun 2017]. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/publicaciones/documentacion/monographs-selected-medicinal-plants-semen-344.html>
2. Kasper D, et al Principios de la medicina interna, 19a ed. México DF: Mc CRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES; 2012.
3. Organización Mundial de la Salud, Estrategias de la Organización Mundial de la Salud sobre medicina tradicional 2014-2023. [en línea]. EEUU; 2013. [Citado el 10 mayo 2017]; disponible en: URL <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>.
4. EsSalud, Boletín informativo de medicina complementaria. [en línea]. Perú; mayo del 2016. 8 (5). [Citado el 10 mayo del 2017]. Disponible en: http://www.essalud.gob.pe/downloads/MAYO_BOLETIN_2016.pdf.
5. Alim S, Bairagi N, Shahriyar S In vitro antibacterial potential of *Bixa orellana* L. against some pathogenic bacteria and comparative investigation on some standard antibiotics. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2016; 5(2): 178-181. Disponible en: <http://www.phytojournal.com/archives/2016/vol5issue2/PartC/5-1-54-830.pdf>.
6. Yolmeh M, Habibi M, Shakouri S, y Hosseini F Comparing antibacterial and antioxidant activity of annatto dye extracted by conventional and ultrasound-assisted methods. Zahedan J Res Med Sci. 2015; 17(7): e1020. Disponible en: <https://profdoc.um.ac.ir/articles/a/1049599.pdf>.
7. Tamil S, Dinesh M, Satyan R, Chandrasekaran B y Rose C. Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011; 1(09); 116-120. Disponible en: http://japsonline.com/admin/php/uploads/273_pdf.pdf.
8. Galindo V, Westhoff D, Rankin S. Antimicrobial Properties of Commercial Annatto Extracts against Selected Pathogenic, Lactic Acid, and Spoilage Microorganisms. Journal of food Protection. 2003; 66(6): 1074-1078. Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-66.6.1074>
9. Medina D Actividad antibacteriana de *Bixa Orellana* L. contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. [en línea]. Colombia: 2016. [Citado 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10757/604437>.

10. Adenea M Evaluación in vitro del efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de Bixa Orellana L. (achiote) sobre cepas de streptococcus mutans (atcc 25175) y streptococcus sanguinis (ATCC 10556). (tesis). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Perú, 2015. Disponible en:
<http://repositorioacademico.upc.edu.pe/upc/bitstream/10757/584214/1/original.pdf.pdf>
11. Espínola M Efecto antifúngico in vitro del extracto atanólico de las hojas de Bixa Orellana L. "Achiote" sobre Cándida albicans (ATCC 10231). (tesis). Universidad Privada Antenor Orrego. Perú, 2015. Disponible en:
http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPAO_018e2195e2705a5d42e95b5394bc51ab.
12. 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 etanolito de hojas y corteza frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. [tesis pregrado en línea]. Perú, 2013. [citado 22 oct 2018]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/54221002.pdf>
13. Mantilla J, Pulido M, y Jaime J Rev. Med. Vet. Zoot. [en línea]. Colombia 2010. [Citado en: 23/06/17]. Disponible en : <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v57n3/v57n3a02.pdf>.
14. Agapito T Fitomedicina 1100 plantas medicinales. Perú: Editorial Isabel I.R.L.; 2000; p. 55 – 56.
15. Cabieses F Apuntes de medicina tradicional. Perú: A & B S.A. 1993; p. 227 – 234.
16. Patrick R Microbiología Médica. Madrid, España: Editorial. EDIDE S.L.; 2003; p. 298.
17. Brooks G, Carroll K, Butel J y Morse S Microbiología médica. México: Editorial. El Manual Moderno S.A. de C.V.; 2007; P. 623.
18. Chow A, Taylor P, Yoshikawa T y Guze L. A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. [en línea]. Colombia: 1979. [citado 06 jun 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/376760>
19. Alondo J Curso de Fitomedicina: Técnicas de comprobación de actividades biológicas. [en línea]. Argentina: 2017. [citado 11 jun 2017]. Disponible en: www.fitomedicina.org
20. Berdondes J Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales Océano. Barcelona: España; 2004. P. 691.
21. Hardman J, et al Las bases farmacológicas de la terapéutica. México: Editorial. McGraw-Hill interamericana Editores S.A. 2007; p. 1144 – 1163.

22. Mendoza N, et al. Farmacología médica. México: Editorial médica panamericana S.A. de C.V.; 2008.
23. Jayasuriya D. The regulation of medicinal plants - a preliminary review of selected aspects of national legislation. [en línea]. Colombia: 2015. [Citado: 30-05-17]. Disponible en: file:///C:/Users/Administrador/Downloads/article_wjpr_1415078183.pdf
24. Bodeker G, Kronenberg F. A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. [en línea]. EEUU: 2002. [Citado: 30-05-17]. Disponible en: <http://www.minsal.cl/portal/url/item/8c121ee2c1a1a527e04001011e015b83.pdf>
25. Julio W y Palacios V Formulario Magistral de Fitofármacos. Perú. 2016.
26. Montes M y Wilkomisrky T Compendio de Fitoterapia. [en línea]. Chile: 1996. [Citado: 31-05-17]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books/about/Compendio_de_fitoterapia.html?id=lzggSQAA-CAAJ&redir_esc=y
27. Hoffmann A Plantas Medicinales de Uso Común en Chile. [en línea]. Santiago, Chile: 1992. [Citado: 31-05-17]. Disponible en: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=6&sid=ed5f696d-d508-4ccc-8984-c19e95bf4af1%40sessionmgr120>
28. Dawson B, Trapp R. Bioestadística Médica. 4° ed. México: El manual moderno; 2005.
29. Tasha L, Cabrillo C y Shashidnar V Kirby Bauer disk difusión susceptibility test. [en línea]. Colombia: 2014. [Citado: 18/06/17]. Disponible en: <https://www.asm.org/index.php/kirby-bauer>
30. Validación del instrumento según: CLSI. [en línea]. Perú: 2017. [citado: 17/06/17]. Disponible en: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>
31. Manual de bioseguridad tercera edición OMS. [en línea]. USA: 2016. [citado: 18/06/17]: Disponible en: http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
32. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; [en línea]. 2015. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>
33. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>

34. Carrión A y García C. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. [Tesis de titulación]. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
35. Venugopalan A y Giridha P. Bacterial growth inhibition potential of annatto plant parts. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012; 2(3):1879-1882. Disponible en: <http://www.apjtb.com/zz/2012s3/127.pdf>
36. Rajendra S. Antibacterial activity of the ethanolic leaves extract of *Bixa orellana*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014; 3(9): 389-394. Disponible en: <http://www.wjpps.com/download/article/1409033567.pdf>
37. Shahid U, Luqman J y Faqeer M. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A Review, Journal of Advanced Research, 2016; 7: 499-514. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/82650413.pdf>
38. Salva truchos Foro, [en línea]. El Salvador, 2009 [citado 19 de Octubre de 2017]; Disponible en: <http://www.salvatruchos.com/foro/index.php?topic=2880.0>

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

Formula X :

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

DONDE:

$$Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 0.842$$

$$\bar{X}_1 = 20 \text{ (Ref. 12)}$$

$$\bar{X}_2 = 18 \text{ (Ref. 11)}$$

$$\sigma^2 = 1.31 \text{ (Ref. 12)}$$

$$n = 7$$

Se aumentó a un número de 10 repeticiones por cada dilución.

ANEXO 03

PROCEDIMIENTO

1. Tratamiento de la muestra

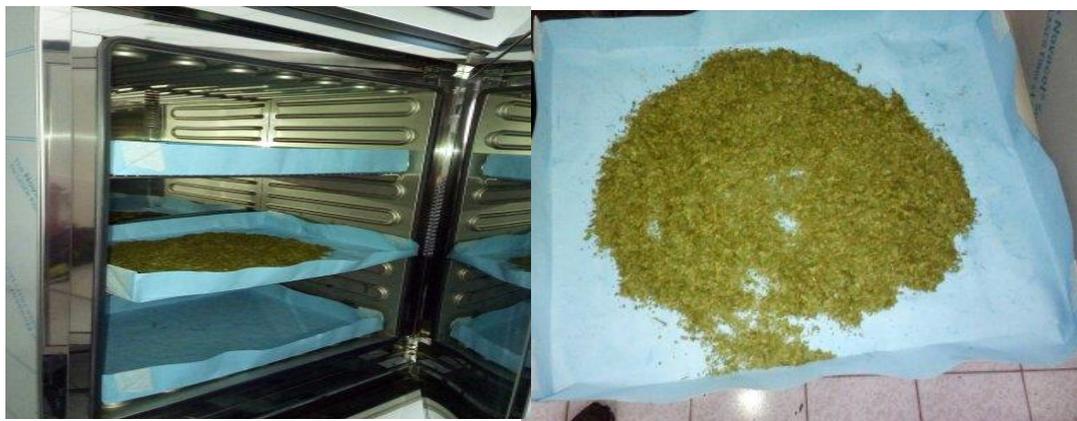
Las plantas frescas de *Bixa orellana* L “Achiote”, se obtuvieron en el Centro Poblado de Tananta, Lote D5A parcela de Augusto Carbajal Margarín, ciudad de Tocache, departamento de San Martín, en una cantidad de 1 a 2 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró Como “muestra seca” (MS).

Figura 2: Bixa orellana en estado natural en la Selva Peruana



Fuente: Elaboración Propia

Figura 3: Bixa orellana en Proceso de Secado

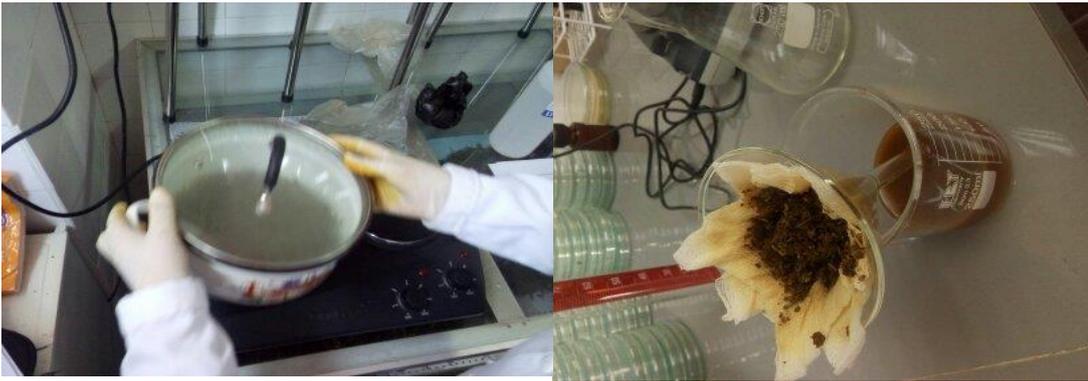


Fuente: Elaboración Propia

2. Obtención del extracto acuoso por infusión

El extracto acuoso de *Bixa orellana* L “Achiote”, se obtuvo por el método de infusión; para ello, en un recipiente de vidrio resistente al calor se colocó la droga (20 mg) y se añade sobre ella agua previamente hervida (200 ml) a una proporción de 1 a 10, y se dejó en contacto por 15 minutos, luego se filtró. El filtrado debe de hacerse de forma inmediata para evitar que aumente la viscosidad del medio lo que dificulta el colado o filtrado. El proceso se lleva a cabo a menos de 100° C. Después, se hizo una doble filtración. Primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de un papel filtro Whatman N°41. Este filtrado, se evaporó por ventilación con corrientes de aire frío en circuito cerrado en estufa, por 1 a 2 días, hasta que quede a una concentración mayor a 100 mg/mL. De este modo, se obtuvo el extracto acuoso por infusión considerado al 100%; el cual, se reservó en un frasco de vidrio ámbar a 4°C–6°C hasta su utilización.

Figura 4: Proceso de Filtrado de Bixa Orellana



Fuente: Elaboración Propia

Figura 5: Proceso de Concentración de Bixa Orellana



Fuente: Elaboración Propia

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

Figura 6: Proceso de Cultivo de Bixa Orellana



Fuente: Elaboración Propia

4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Proteus mirabilis* ATCC 14028, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aprox.)

Figura 7: Preparación del inóculo de Bixa Orellana



Fuente: Elaboración Propia

b) Siembra del microorganism

Se sembró el microorganismo *Proteus mirabilis* ATCC 14028, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

Figura 8: Siembra del microorganism de Bixa Orellana



Fuente: Elaboración Propia

c) Preparación de las concentraciones del EE

A partir del EE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 μ L de EE y 250 μ L de DMSO al tubo de 75%, 500 μ L de EE y 500 μ L de DMSO al tubo de 50%, y 250 μ L de EE y 750 μ L de DMSO al tubo de 25%.

Figura 9: Preparación de las concentraciones del EE



Fuente: Elaboración Propia

d) Preparación de los discos de sensibilidad con EE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 μL en cada disco de papel filtro Whatman N^o 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 μL de EE al 25% y se colocó en un disco, 10 μL de AE al 50% en otro disco, 10 μL de EE al 75% en otro disco y 10 μL de EE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

Figura 10: Preparación de los discos de sensibilidad con EE



Fuente: Elaboración Propia

e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Proteus mirabilis* ATCC 14028, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con cefalexina a la concentración de 30 μg (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de EE de *Bixa orellana* L "Achiote" y para el cefalexina a la concentración de 30 µg. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.

Figura 11: Lectura e Interpretación mediante la regla Vernier



Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 04

Tabla 4: Promedios de Halos de Inhibición (mm)

Promedios de Halos de Inhibición (mm)							
Extracto Acuoso de Hojas Bixa orellana L. (INFUSIÓN)	N°	100%	75%	50%	25%	Cefalexina	Agua destilada
	01	17	15	10	5	16	0
	02	14	10	8	6	17	0
	03	15	12	8	6	18	0
	04	14	10	7	6	16	0
	05	15	12	8	7	17	0
	06	13	11	7	5	16	0
	07	12	9	7	6	15	0
	08	15	12	8	5	18	0
	09	15	13	7	5	17	0
	10	13	12	7	5	16	0

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 05

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

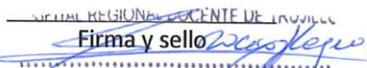
ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1												
2												
3												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES			SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos					
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación					
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial					
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir					
VALIDEZ					
APLICABLE		NO APLICABLE	APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Instrumento validado por:


 Firma y sello
 Jaime A. Pineda Gamboa
 MICROBIOLOGO
 CDP 0751


 Firma y sello
 UNIVERSIDAD DEL VALLEJO
 FACULTAD CIENCIAS MEDICAS
 UCV
 Dr. David García Cedrón
 DOCENTE T.P. ESCUELA MEDICINA
 UCV. CAMPUS TRUJILLO


 Firma y sello
 HOSPITAL REGIONAL FACENTE DE TRUJILLO
 Dra. María R. Llaque Sánchez
 MÉDICO FAMILIAR Y COMUNITARIA
 S.M.P. 19275 R.N.E. 62014

ANEXO 06

La bioseguridad incluye las medidas de protección contra los riesgos de contaminación con gérmenes patógenos en los laboratorios que manipulan patógenos, almacenan o manipulan productos potencialmente contaminados o realizan pruebas microbiológicas con fines de investigación médica o científica, así como los medios de protección ambiental y colectividades humanas contra contaminaciones de riesgo como tienen de punto de partida estos laboratorios. Además, últimamente surgió una nueva noción de bioseguridad, que se refiere a la suma de medidas destinadas a proteger a los trabajadores, al medio ambiente de agentes biológicos patógenos. El trabajo revisa las preocupaciones actuales para recuperación de estas dos nociones y la forma en que deben documentarse e implementarse un sistema para el manejo de los riesgos biológicos en un laboratorio que maneja patógenos. Se hace hincapié en la necesidad de la formación profesional continua del personal y en el establecimiento de las responsabilidades individuales y colectivas para prevenir los incidentes de la seguridad de la biotecnología y las normas de bioseguridad intrusas. Se señalan las principales medidas de bioseguridad y se mencionan una serie de consideraciones relativas a la bioseguridad y al bioterrorismo en correlación con el laboratorio médico²⁸.

Figura 12: Manejo de Riesgos mediante la Bioseguridad



Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 07

BASE DE DATOS ESTADÍSTICOS

Prueba de homogeneidad de varianzas para el uso de post anova de Tukey

Tabla 5: homogeneidad de varianzas para el uso de post

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,843	4	45	,137

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 08

Tabla 6: Efecto antibacteriano según criterio CLSI

Concentración	Eficaz	No Eficaz
25%	–	100
50%	–	100
75%	10	90
100%	50	50
Cefalexina	100	–

Fuente: CLSI, elaboración propia

ANEXO 09

Tabla 7: Comparaciones múltiples

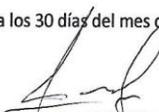
Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Diámetro del halo de inhibición HSD Tukey						
HSD Tukey						
(I) DILUCIONES		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Extracto acuoso de Bixa orellana L. al 100%	75%	2,700*	0,539	0,000	1,17	4,23
	50%	6,600*	0,539	0,000	5,07	8,13
	25%	8,700*	0,539	0,000	7,17	10,23
	CEFALEXINA	-2,300*	0,539	0,001	-3,83	-0,77
Extracto acuoso de Bixa orellana L. al 75%	100%	-2,700*	0,539	0,000	-4,23	-1,17
	50%	3,900*	0,539	0,000	2,37	5,43
	25%	6,000*	0,539	0,000	4,47	7,53
	CEFALEXINA	-5,000*	0,539	0,000	-6,53	-3,47
Extracto acuoso de Bixa orellana L. al 50%	100%	-6,600*	0,539	0,000	-8,13	-5,07
	75%	-3,900*	0,539	0,000	-5,43	-2,37
	25%	2,100*	0,539	0,003	0,57	3,63
	CEFALEXINA	-8,900*	0,539	0,000	-10,43	-7,37
Extracto acuoso de Bixa orellana L. al 25%	100%	-8,700*	0,539	0,000	-10,23	-7,17
	75%	-6,000*	0,539	0,000	-7,53	-4,47
	50%	-2,100*	0,539	0,003	-3,63	-0,57
	CEFALEXINA	-11,000*	0,539	0,000	-12,53	-9,47
CEFALEXINA	100%	2,300*	0,539	0,001	0,77	3,83
	75%	5,000*	0,539	0,000	3,47	6,53
	50%	8,900*	0,539	0,000	7,37	10,43
	25%	11,000*	0,539	0,000	9,47	12,53

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

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 10

Figura 13: Constancia de Asesoría de Desarrollo de Tesis

 UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO	
CONSTANCIA DE ASESORÍA DE DESARROLLO DE TESIS	
<p>El que suscribe MG. Blgo. POLO GAMBOA, JAIME ABELARDO, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.</p>	
CERTIFICA:	
<p>Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, del alumno: JULIO MONTOYA OXOLON, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado:</p>	
EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Bixa orellana</i> L. COMPARADA CON CEFALEXINA, SOBRE <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO	
<p>Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.</p>	
<p>En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor técnico, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.</p>	
<p>Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 30 días del mes de enero del 2019.</p>	
 Jaime A. Polo Gamboa MG. Blgo. POLO GAMBOA, JAIME ABELARDO	

Fuente: Universidad Cesar Vallejo

ANEXO 11

Figura 14: Constancia de Ejecución de Desarrollo de Tesis

 UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

CONSTANCIA DE EJECUCION DEL DESARROLLO DE TESIS

El que suscribe **MG. Blgo. POLO GAMBOA, JAIME ABELARDO**, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

Hace constar:

Que, el estudiante **JULIO MONTOYA OXOLON** de esta superior casa de estudios, solicitó los ambientes de la universidad Cesar Vallejo para la ejecución de su desarrollo de tesis. Por lo que, se le brindó todas las facilidades para que realice su trabajo de investigación experimental e hizo uso de los laboratorios, instrumental y equipos para ejecutar su desarrollo de tesis titulado:

EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bixa orellana* L. COMPARADA CON CEFALEXINA, SOBRE *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO

Utilizó el(los) laboratorio(s) de microbiología desde el 09 de noviembre hasta el 17 de diciembre del 2017.

Se expedido el presente a solicitud de la parte interesada solo para fines académicos que estime conveniente. Dado en la ciudad de Trujillo a los 30 días de enero del 2019.



Jaime A. Polo Gamboa
MG. Blgo. POLO GAMBOA, JAIME ABELARDO

Fuente: Universidad Cesar Vallejo

EVALUACIÓN DEL INFORME DE TESIS (ENFOQUE CUANTITATIVO)

FACULTAD: De Ciencias Médicas

ESCUELA: De Medicina

ALUMNO: Julio Montoya Oxolon

FECHA: 25 de febrero 2019

TEMA: "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bixa orellana* L. COMPARADA CON CEFALEXINA, SOBRE *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO"

INDICADORES	NIVEL MÁXIMO POSIBLE A LOGRAR	NIVEL EFECTIVO LOGRADO POR JORNADA I	NIVEL EFECTIVO LOGRADO POR JORNADA II
1. TÍTULO			
1.1. El título contiene las variables del problema de investigación e informa adecuadamente el contenido del trabajo.	2		
2. INTRODUCCIÓN			
2.1. Presenta antecedentes sustentados con fuentes confiables y congruentes con el problema de investigación.	2		
2.2. Desarrolla la fundamentación científica, técnica y humanística (marco teórico) de la investigación organizada en base a fuentes actuales vinculadas directamente con las variables del problema de investigación.	2		
2.3. Justifica la pertinencia científico-tecnológica y relevancia de la	2		
2.4. El problema está claramente contextualizado, delimitado y	2		
2.5. El problema está formulado en forma clara, concreta y precisa, e incluye explícitamente las variables a trabajar. *	2		
2.6. Los objetivos se relacionan directamente con la formulación del	2		
3. MARCO METODOLÓGICO			
3.1. La hipótesis se relaciona con los objetivos y es verificable.	2		
3.2. Identifica de manera clara y precisa las variables de estudio.	2		
3.3. Define teóricamente las variables de estudio	2		
3.4. Operacionaliza las variables adecuadamente	3		
3.5. Los indicadores se derivan de la definición teórica de las variables.	3		
3.6. Selecciona adecuadamente el tipo de estudio y diseño de	2		
3.7. Establece la población y la muestra de acuerdo a la naturaleza y carácter del estudio.	2		
3.8. Selecciona técnicas adecuadas a la naturaleza del estudio.	2		
3.8. Selecciona y /o elabora el/los instrumento(s) que le permitan recoger los datos relacionados con las variables e indicadores del estudio.	2		
3.10. De ser necesario, realiza correctamente la validación de su	2		
3.11. Selecciona los métodos estadísticos adecuados para el análisis de	2		
4. RESULTADOS			
4.1. Procesa los resultados elaborando cuadros y/o gráficos estadísticos.	4		
4.2. Ordena los cuadros de resultados de acuerdo a sus objetivos	3		
4.3. Interpreta adecuadamente los resultados	4		
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS			

5.1. Elabora un análisis minucioso de los resultados tomando en cuenta los antecedentes y el marco teórico.	5		
6. CONCLUSIONES			
6.1. Las conclusiones se derivan directamente de los objetivos y/o	4		
7. RECOMENDACIONES			
7.1. Las recomendaciones son pertinentes a las conclusiones planteadas.	3		
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS			
8.1. La bibliografía deben contener las referencias señaladas al interior	2		
8.2. Cita correctamente las fuentes revisadas en base a las Normas Internacionales correspondientes	2		
9. DE LA SUSTENTACIÓN			
9.1. Elabora adecuadamente las diapositivas para su exposición.	3		
9.2. Revela conocer el contenido de su tema de investigación.	9		
9.3. Demuestra conocimiento y entrenamiento en el manejo y empleo del método científico	10		
9.4. Utiliza los términos con propiedad, sigue las normas de la sintaxis.	7		
9.5. Frente a preguntas sobre temas nuevos que se le plantea, responde con propiedad y se deja entender claramente.	6		
TOTAL	100		

Escala de conversión del Puntaje a Escala vigesimal:

PUNTAJE	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
NOTA	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2	2.4	2.8	3.2	3.6	4	4.4	4.8	5.2	5.6	6	6.4

PUNTAJE	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66
NOTA	6.8	7.2	7.6	8	8.4	8.8	9.2	9.6	10	10.4	10.8	11.2	11.6	12	12.4	12.8	13.2

PUNTAJE	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98	100
NOTA	13.6	14	14.4	14.8	15.2	15.6	16	16.4	16.8	17.2	17.6	18	18.4	18.8	19.2	19.6	20

Dra. Ana María Chian García

PRESIDENTE

Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez

SECRETARIO

Mg. Blgo. Jaime Abelardo Polo Gamboa

VOCAL



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

El que suscribe Dra. María Rocío Del Pilar Llaque Sánchez, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Informes de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, del alumno: Julio Montoya Oxolon, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulada:

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bixa orellana* L. COMPARADA CON CEFALEXINA, SOBRE *Proteus mirabilis* ATCC 14028 ESTUDIO IN VITRO”. Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor Metodológico, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 25 días del mes de febrero del 2019.

Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez

CPM 19275