



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**FITOQUÍMICA CUALITATIVA Y ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA SOBRE *Escherichia coli* DE ACEITES
ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Bixa orellana* L.
(ACHIOTE) COLECTADOS EN EL DISTRITO DE SAN PEDRO DE
PUTINA PUNCO, PUNO – 2022**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. MILENE CELINA FLORES MENDIZABAL

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2024



Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**FITOQUÍMICA CUALITATIVA Y ACTIVIDA
D ANTIBACTERIANA SOBRE Escherichia
coli DE ACEITES ESENCIALES Y EX**

AUTOR

MILENE CELINA FLORES MENDIZABAL

RECuento DE PALABRAS

23095 Words

RECuento DE CARACTERES

127778 Characters

RECuento DE PÁGINAS

108 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.6MB

FECHA DE ENTREGA

May 23, 2024 6:27 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 23, 2024 6:29 AM GMT-5

● 13% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 12% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Juan Pablo
Huarachi
Valencia



Resumen



DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado en especial a Dios por darme la vida, la sabiduría y la fuerza necesaria para salir adelante, con su amor e infinita bondad.

A mi querido padre Leonardo Flores Ramos, que, con todo su amor y comprensión, en los momentos más difíciles y especiales de mi vida, siempre creyó en mí, dándome el apoyo contante e incondicional hizo todo lo posible por llegar hasta aquí y que mejore cada día en todo el aspecto.

A mi querida madre Cristina Mendizabal Machaca que en los años que estuvo conmigo en vida me formo con valores y siempre me enseñó a no rendirme y a luchar por mis sueños y mis metas.

Milene Celina Flores Mendizabal.



AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la Universidad Nacional del Altiplano, por formarme con valores ético y morales, exclusivamente a mi carrera profesional de Biología y a los docentes por sus conocimientos que me brindaron durante mi formación profesional para ser una buena bióloga

A mi Padre, porque a pesar de las dificultades que tuvimos en el camino, cada día el me hace ver la vida de una forma diferente y confía en todas las decisiones que tomo y porque está siempre conmigo y con mi hermano.

Gracias a los miembros de jurado de esta Tesis Dr. Youri Teresa del Carpio Condori, Mg. Diana Elizabeth Cavero Zegarra, Dra. Sandra Beatriz Butron Pinazo, por sus sugerencias y consejos en las revisiones del proyecto de investigación de tesis.

De manera muy especial a mi Director de este proyecto al MSc. Juan Pablo Huarachi Valencia por la dirección, el apoyo y los consejos que me dio durante este tiempo.

A todos mis amigos que han estado conmigo a lo largo de los años, especialmente a Julio Cesar por su ayuda incondicional y mi Clan Pinky, (Chisi, Katia) que son importantes en mi vida porque he aprendido y crecido mucho de ellos mental y espiritualmente. Aunque algunos de las amistades se han alejado, siempre están conmigo, ya sea en los momentos de alegría o tristes, aunque no estemos juntos físicamente, nuestros corazones siempre están juntos, Frank D, Yaqui, Juan, Marga, Marco A, Wil y las nuevas amistades que conocí también Yuyus y Fabi.

Milene Celina Flores Mendizabal



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
ACRÓNIMOS	
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 ANTECEDENTES	16
2.2 MARCO TEÓRICO	22
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.2 Plantas medicinales	24
2.2.3 Metabolitos secundarios.....	27
2.2.4 Actividad antibacteriana.....	29
2.2.5 Aceite esencial	30
2.2.6 Medios de cultivo	30



2.2.7	Pruebas bioquímicas.....	33
2.2.8	Actividad antibacteriana.....	35

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	ÁREA DE ESTUDIO.....	38
3.2	DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN	39
3.3	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	39
3.4	METODOLOGÍA	40
3.4.1	Determinación de la composición fitoquímica cualitativa (alcaloides, fenoles y taninos) del aceite esencial y extracto etanólico de <i>Bixa orellana</i> L.....	40
3.4.2	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de aceites esenciales y extractos alcohólicos de <i>Bixa orellana</i> L. en concentraciones de 10%, 25%, 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> aislada de orinas positivas a infección urinaria de gestantes del Centro de Maternidad de Juli.....	49
3.4.3	Análisis estadístico.....	60

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA CUALITATIVA DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Bixa orellana</i> L.....	62
4.1.1	Análisis fitoquímico del aceite esencial de hojas de <i>Bixa orellana</i> L.	62
4.1.2	Análisis fitoquímico del extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> L.	64



4.2	EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA, CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA Y SUSCEPTIBILIDAD DE <i>Escherichia coli</i> FRENTE AL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE <i>Bixa orellana L.</i>.....	68
V.	CONCLUSIONES.....	82
VI.	RECOMENDACIONES	83
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS		99

ÁREA: Ciencias Biomédicas

SUB LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Diagnóstico y Epidemiología

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 29 de mayo de 2024



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Planta de <i>Bixa orellana</i> L. A. Fruto, B. Planta entera.....	25
Figura 2 Ubicación geográfica de la zona de recolección de la planta de achiote, <i>Bixa orellana</i> L.	38
Figura 3 Extracción de aceite esencial por el método de arrastre con vapor.....	44
Figura 4 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	60
Figura 5 Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria para el aceite esencial de hojas de <i>Bixa orellana</i> L. frente a <i>Escherichia coli</i>	68
Figura 6 Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria para el extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> L. frente a <i>Escherichia coli</i>	70
Figura 7 Análisis de la Concentración Mínima Bactericida para el aceite esencial de hojas de <i>Bixa orellana</i> L. frente a <i>Escherichia coli</i>	72
Figura 8 Análisis de la Concentración Mínima Bactericida para el extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana</i> L. frente a <i>Escherichia coli</i>	74
Figura 9 Análisis de varianza de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn correspondiente a la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de <i>Bixa orellana</i> L. por el método de difusión Kirby Bauer.....	76
Figura 10 Análisis de varianza de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de T Student correspondiente a la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de <i>B. orellana</i> L. por el método de difusión Kirby Bauer.....	79



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Rango colorimétrico de valoración cualitativa de metabolitos secundarios..	46
Tabla 2 Rango colorimétrico de valoración cualitativa de metabolitos secundarios...	47
Tabla 3 Rango colorimétrico de valoración cualitativa de metabolitos secundarios..	48
Tabla 4 Preparación de los tratamientos a base de extractos etanólicos y aceite esencial obtenidos de hojas de <i>B. orellana</i> L.....	50
Tabla 5 Análisis fitoquímico del aceite esencial de hojas de <i>B. orellana</i> L.	62
Tabla 6 Análisis fitoquímico del extracto etanólico al 100% de hojas de <i>B. orellana</i> L.	65



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1 Porcentaje de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> frente al aceite esencial y extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i> para determinación de Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida	99
ANEXO 2 Halos de susceptibilidad correspondientes a la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana L</i> frente a <i>E. coli</i>	100
ANEXO 3 Recolección de muestras de orina y obtención de extracto etanólico y de aceite esencial de hojas de achiote.	101
ANEXO 4 Aislamiento y determinación de microorganismos uropatógenos	101
ANEXO 5 Resultados del antibiograma con los discos de susceptibilidad en base a aceite esencial y extracto etanólico de hojas de <i>Bixa orellana L.</i>	102
ANEXO 6 Evaluación de la actividad antibacteriana	102
ANEXO 7 Caracterización fitoquímica cualitativa de hojas de <i>Bixa orellana L.</i>	103
ANEXO 8 Constancia de obtención de muestras de orina a partir de gestantes que acudieron al Complejo Materno Laboratorio Preventivo Promocional – primer nivel de atención de la localidad de Juli para el aislamiento de uropatógenos.....	104
ANEXO 9 Constancia de determinación taxonómica del achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) por el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín	105
ANEXO 10 Constancia de ejecución de tesis realizado en el Laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología.....	106



ACRÓNIMOS

%:	Porcentaje
°C:	Grados centígrados
CMB:	Concentración Mínima Bactericida
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
EMB:	Eosina Azul de Metileno
g:	Gramo
h:	Hora
ITU:	Infección de Tracto Urinario
Kg:	Kilogramos
LIA:	Lisina Hierro Agar
LO:	Longitud Oeste
LS:	Latitud Sur
ml:	Mililitros
mm:	Milímetros
n:	Tamaño de muestra
OMS:	Organización Mundial de la Salud
SIM:	Motilidad Indol Sulfuro
TSI:	Triple Azúcar Hierro
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias



RESUMEN

Las infecciones urinarias son enfermedades de alta prevalencia en madres gestantes en la región Puno, siendo *Escherichia coli* la causa principal, ante ello se tiene la información empírica por los expendedores del achiote *Bixa orellana* L. que ésta es empleada como tratamiento para las infecciones, pero debido a la carencia de investigaciones que respalden esta afirmación es que el objetivo fue determinar la composición fitoquímica cualitativa y actividad antibacteriana del aceite esencial (AE) y extracto etanólico (EE) de las hojas de achiote (*B. orellana* L.) frente a *E. coli* uropatógena aislada de gestantes del Centro de Maternidad de Juli; para lo cual en esta investigación de tipo experimental, se recolectó 5 kg de material vegetal del distrito de San Pedro de Putinapunco (Sandia) de ahí sobre el AE y EE al 100% se realizó el análisis fitoquímico cualitativo correspondiente a alcaloides (Dragendorff, Mayer y Wagner), fenoles (Cloruro Férrico 5%) y taninos (Cloruro de Sodio 5%), luego del cual se procedió a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) en 18 cepas (repeticiones) de *E. coli*, así como a la determinación de la susceptibilidad bacteriana mediante la técnica de Kirby Bauer, siendo los datos analizados mediante análisis de regresión y correlación lineal y análisis de varianza (Fisher, Kruskal Wallis) junto con la prueba de comparaciones múltiples de T Student y Dunn, previa verificación de supuestos con un $\alpha=0.05$, a través del Programa R 4.3.3. Como resultado el análisis de la composición fitoquímica del AE reveló la presencia leve de alcaloides (+) y fenoles (+), mientras que en el EE se determinó especialmente la presencia de fenoles (+++), seguido de taninos (++) y alcaloides (+); en cuanto al CMI para el AE esta fue de 102 % y para el EE de 100 %, mientras que la CMB del AE fue de 105% y para el EE de 102% sobre *E. coli*, y en cuanto a los halos de susceptibilidad se determinó que el AE al 100%^a y el EE al 100%^a y 75%^b ejercen actividad antibacteriana significativa. En conclusión, el EE presenta taninos a diferencia del AE, y al parecer una mejor actividad antibacteriana.

Palabras clave: Aceite esencial, Achiote, Extracto etanólico, *Escherichia coli*, Susceptibilidad.



ABSTRACT

Urinary infections are highly prevalent diseases in pregnant mothers in the Puno region, with *Escherichia coli* being the main cause. Given this, there is empirical information from the sellers of *Bixa orellana* L. achiote that it is used as a treatment for infections, but due to The lack of research to support this statement is that the objective was to determine the qualitative phytochemical composition and antibacterial activity of the essential oil (EO) and ethanolic extract (EE) of annatto leaves (*B. orellana* L.) against *E. coli* uropathogenic isolated from pregnant women at the Juli Maternity Center; For which in this experimental research, 5 kg of plant material was collected from the district of San Pedro de Putinapunco (Sandia) from there, on the AE and EE at 100%, the qualitative phytochemical analysis corresponding to alkaloids was carried out (Dragendorff, Mayer and Wagner), phenols (Ferric Chloride 5%) and tannins (Sodium Chloride 5%), after which the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined in 18 strains (repetitions) of *E. coli*, as well as the determination of bacterial susceptibility using the Kirby Bauer technique, the data being analyzed by regression analysis and linear correlation and analysis of variance (Fisher, Kruskal Wallis) together with the multiple comparisons test of T Student and Dunn, after verification of assumptions with an $\alpha=0.05$, through the R Program 4.3.3. As a result, the analysis of the phytochemical composition of the EO revealed the slight presence of alkaloids (+) and phenols (+), while in the EE the presence of phenols (++++) was determined, followed by tannins (++) and alkaloids (+); Regarding the MIC for the AE, this was 102% and for the EE, 100%, while the MBC of the AE was 105% and for the EE, 102% on *E. coli*, and as for the susceptibility halos It was determined that EO at 100%^a and EE at 100%^a and 75%^b exert significant antibacterial activity. In conclusion, EE has tannins unlike AE, and apparently better antibacterial activity.

Key words: Essential oil, Annatto, Ethanolic extract, *Escherichia coli*, Susceptibility.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales tiene raíces humanas y todos los extractos utilizados han ayudado a curar enfermedades desde tiempos prehistóricos cuando se utilizaban con fines de investigación. Esta práctica médica se ha realizado y mejorado con el tiempo, de generación en generación, por eso se le llama medicina tradicional (Marrelli, 2021).

Las plantas medicinales aportan varios principios activos con diferente actividad biológica. En los últimos años, los productos naturales han recibido nueva atención como fuentes de sustancias útiles medicinales, veterinarias, cosméticas y agroquímicas. Alrededor del 25% de las sustancias en el mercado provienen de plantas. Se conocen unas 250000 especies, pero solo el 1% de ellas se han explorado completamente en términos de composición química y uso terapéutico, y queda por explorar una gran cantidad de moléculas bioactivas (Bermúdez et al., 2005).

La bacteria *E. coli* es responsable de ~80% de las infecciones urinarias en mujeres embarazadas, las cuales cursan como bacteriuria asintomática, cistitis o pielonefritis severa (en casos severos). Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las complicaciones médicas más comunes durante el embarazo, junto con la anemia, afectando la salud de la madre y aumentando el riesgo de parto prematuro y bajo peso al nacer del bebé si no se detecta y trata adecuadamente (Herráiz et al., 2005).

Las infecciones de tracto urinario son ocasionadas principalmente por *Escherichia coli*, que como ocurre con otros uropatógenos se ha registrado resistencia a los antibióticos, causando morbilidad en gestantes, ante ello, una gran parte de la población



femenina hace uso de la medicina tradicional para tratar las infecciones, siendo el achiote recomendado para el tratamiento natural de infecciones bacterianas (Franklin et al., 2023).

Es por esto que, la presente investigación tuvo como objetivo general determinar la composición fitoquímica cualitativa y actividad antibacteriana sobre *E. coli* del aceite esencial y extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana L.*, la cual se comparó con un tratamiento control (gentamicina), así como determinar la composición fitoquímica concerniente a alcaloides, fenoles y taninos del aceite esencial y extracto etanólico con la intención de verificar las propiedades medicinales antimicrobianas atribuidas al achiote según la medicina tradicional y cierta literatura.

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la composición fitoquímica cualitativa y la actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* del aceite esencial y extracto etanólico de *Bixa orellana L.*

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición fitoquímica cualitativa (alcaloides, fenoles y taninos) del aceite esencial y extracto etanólico de *Bixa orellana L.*
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida del aceite esencial y extracto etanólico de *Bixa Orellana L.* en concentraciones de 10%, 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* aislada de orinas positivas a infección urinaria de gestantes del Centro de Maternidad de Juli.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

Gadisa y Tadesse (2021) en su investigación en Etiopía con extractos metanólicos al 80% de *Rumex abyssinicus*, *Cucumis pustulatus*, *Discopodium penninervium*, *Lippia adoensis*, *Euphorbia depauperata*, y *Cirsium englerianum* encontraron que la mayoría de los extractos analizados tuvieron actividad antimicrobiana en dos o más bacterias resistentes a los medicamentos con un CMI de 1,0 a 128,0 µg/ml y una zona de inhibición de 9 a 27 mm de diámetro, siendo así que los extractos obtenidos de *C. englerianum* y *E. depauperate* mostraron una potente actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* multidrogo resistente y *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 25 y 27 mm respectivamente, del mismo modo *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron inhibidos por estos extractos con un halo de 9 y 25 mm y entre 11 y 27 mm respectivamente. Además, se encontró como fitoquímicos comunes en la mayoría de plantas analizadas a los alcaloides, flavonoides, fenoles y terpenoides.

Mora et al. (2021) en México, realizaron una investigación para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos, acetónicos y hexánicos de las semillas de *L. esculenta* y *L. leucocephala* recolectadas en la comunidad de Tlayacapan Morelos, reportando que *E. coli* tiene un CMI de 2000 y 3000 µg/ml para *L. leucocephala* y *L. esculenta* respectivamente y frente a *S. aureus* un CMI de 4000 y 2000 µg/ml para *L. leucocephala* y *L. esculenta* respectivamente, siendo ambas cepas sensibles a los extractos etanólicos; asimismo, las CMB significativas correspondieron a 6000 µg/mL para *L. leucocephala* y 4000 µg/ml para *L. esculenta* a las primeras 10 horas de



tratamiento, lo cual estaría relacionado a la presencia de alcaloides, triterpenos, monoterpenos, esteroides, saponinas y compuestos fenólicos.

Zakaria et al. (2020) en Argelia, mencionan que los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación caracterizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) (timol 15.2–56.4%, carvacrol 2.8–59.6%, γ -terpineno 9.9–21.8% y *p*-cimeno 8.5–13.9%) presentaron actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco frente a ocho cepas de *E. coli* (seis cepas uropatógenas resistentes y dos susceptibles referenciadas), siendo el AE de la localidad de Bordj, la que contenía la mayor cantidad de carvacrol (59.6%), mostrando mayor actividad antibacteriana (diámetros de inhibición de 12 a 24.5 mm a una dilución de 1/10).

Navarrete et al. (2020), en la investigación sobre la actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas, ejecutada en Colombia, determinaron la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *L. camara* L., *P. alliacea* L. y *L. dulcis* T. sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 6380 y *S. aureus* ATCC 25923, encontrando mediante pruebas de difusión con disco y difusión en agar a concentraciones de 1 y 2 mg/ml que *S. aureus* ATCC 25923 es sensible a *L. camara* L. y *L. dulcis* T. siendo este último activo también sobre *P. vulgaris* ATCC 6380 con efecto inhibitorio superior al 50%; asimismo, el extracto de *L. dulcis* T. mostró una mayor actividad inhibitoria sobre *S. aureus* (CMI 1,95 mg/mL), mientras que ningún extracto mostró actividad sobre *E. coli* y *P. aeruginosa*, asimismo encontraron metabolitos secundarios, especialmente terpenoides y cumarinas (*L. dulcis*), concluyendo que los extractos etanólicos de *L. camara* y *L. dulcis*, demuestran actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *P. vulgaris*.



Xiao et al. (2019), en un trabajo colaborativo de China y Estados Unidos, evaluaron la actividad de 140 aceites esenciales frente a *E. coli* uropatógena UTI89 en fase estacionaria e identificaron 39 aceites esenciales a una concentración del 0.5%, 8 aceites esenciales a una concentración del 0.25% y 3 aceites esenciales a una concentración del 0.125% con alta actividad frente a *E. coli* en fase estacionaria, siendo así que entre los ocho principales aceites esenciales, el orégano mostró una mayor actividad que el conocido fármaco tosufloxacin. Las otras cuatro plantas benéficas, serían la pimienta de Jamaica, dedos de bandido, corteza de canela y *Syzygium aromaticum*, los cuales eliminarían la fase estacionaria de *E. coli* al 0.25% después de una exposición por tres o cinco días, mientras que la planta escudo, hoja de canela y clavo de olor fueron efectivos a más alta concentración y a nivel de combinaciones de aceite esencial de orégano con antibióticos comunes para las infecciones urinarias como algunas quinolonas (tosufloxacin, levofloxacin y ciprofloxacina) siendo capaces de erradicar por completo las células de *E. coli* en fase estacionaria, mostrando un moderado efecto en combinación con nitrofurantoína, y no existiendo una mejora aparente con la fosfomicina, meropenem y cefdinir.

Aguilar (2019), en México, en su estudio sobre determinación de actividades biológicas y tamiz fitoquímico de *Bixa orellana* L. de la Península de Yucatán, con el objetivo de valorar las actividades biológicas (actividad antioxidante, antimicrobiana y antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas) y perfil fitoquímico de los extractos metanólicos de las hojas del achiote mediante reacciones cualitativas, para determinar la actividad antibacteriana de los extractos halló efecto antiproliferativo sobre bacterias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922 y *S. typhimurium* ATCC 14028) y Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923) concluyendo que esta especie es un recurso natural con un gran potencial para la exploración de nuevos agentes bioactivos.



Ongsakul et al. (2009), en su investigación sobre el efecto antibacteriano de extractos alcohólicos y acuosos de seis plantas medicinales frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, llevada a cabo en Tailandia, evaluaron la actividad antibacteriana de doce extractos crudos alcohólicos y acuosos de seis plantas medicinales contra *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 encontrando entre *Alstonia macrophylla* Wall., *Bixa orellana* L., *Blumea balsamifera* (L.) D.C., *Azadirachta indica* A. Juss., *Arcangelisia flava* (L.) Merr. y *Leea rubra* Blume, que los extractos etanólicos de hojas de *B. orellana* L. y corteza de *A. macrophylla* Wall. tenían efecto antibacteriano contra *S. aureus* a una CIM de 62.5 µg/ml, pero ningún efecto contra *E. coli*.

A nivel nacional, Usquiano (2022) en Lima, evaluó el efecto del aceite esencial de las hojas de *Melissa officinalis* L. las cuales contenían metabolitos secundarios como triterpenos y taninos, y halos de inhibición sobre cultivos in vitro de *E. coli* igual a 10.83+0.36mm al 50% del AE de toronjil, 12.07+0.41mm al 75% y 13.06+0.41mm al 100%, mientras que el control positivo (ciprofloxacino) generó un halo de inhibición de 29.48+0.38mm.

Infantes (2019), en Trujillo, evaluó el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Escherichia coli* comparado con norfloxacino”, hallando que el aceite esencial *M. mollis* (muña) tiene actividad antibacteriana frente a *E. coli*, sin embargo, es superado de manera significativa por el estándar farmacológico.

Asimismo, Alva (2018), en Trujillo, al evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Capsicum chinense* sobre *Escherichia coli* uropatógena mostró que el extracto etanólico de *C. chinense*, tiene poco efecto antibacteriano en *E. coli* por medio de halos de inhibición, encontrándose que al 25%, con un halo de 6.73 mm y al 100%,



con un halo de 8.87 mm, es inferior al control (Imipenem 10 ug), con un halo de 35.93 mm.

Otra investigación, en Trujillo, desarrollada por Cipra (2018) evaluó la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Plantago major* al 50% sobre *Escherichia coli* enteropatógena los resultados indicaron que el extracto etanólico al 50% demostró efectividad antibacteriana in vitro sobre ésta bacteria siendo fuertemente sensible a ciprofloxacino (40.87 mm) y muy sensible al extracto etanólico al 50% (15.53 mm).

De otro lado, Troncoso (2014), en Arequipa, realizó la evaluación del cultivo de *Bixa orellana* (achiote), analizando su potencial actividad antibacteriana, CMB y CMI in vitro de los extractos acuoso y etanólico de hojas y corteza frente al crecimiento de *E. coli*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, para lo que determinó la CMI y CBM por el método de disolución en tubo y dilución en placa de los extractos frente a *S. aureus*, encontrando más susceptibilidad en el extracto etanólico de hojas con un CMI de 200 mg/ml y CBM de 225mg/ml en comparación al extracto etanólico de corteza que presento un CIM de 240 mg/ml y CBM de 270 mg/ml, además se identificaron metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, alcaloides, fenoles y saponinas, de los cuales los dos primeros tendrían probablemente mayor efecto antibacteriano, lo mismo que los compuestos fenólicos frente a *S. aureus*, por lo que concluye se emplee las hojas y corteza de *Bixa orellana L.* (achiote).

Mesones & Donayre (2007), en Iquitos al estudiar el efecto antimicrobiano de *Bixa orellana L.* "achiote", *Genipa americana* "huito" y *Pistia stratiotes* "huama" en agentes que producen infecciones dérmicas y vaginales, encontraron entre tres plantas tropicales de la Amazonía peruana empleadas en medicina tradicional, que el extracto de achiote, tiene efecto antimicrobiano frente a *E. coli* y *S. aureus*; pero sólo *E. coli* mostró



un halo de inhibición considerado sensible, siendo la Concentración Bactericida Mínima (CBM) para *G. americana* frente a *E. coli* ATCC 35218 y a *S. aureus* ATCC 6538 de 2.5 mg/ml, y concerniente a la CBM del extracto de *Bixa orellana* L. frente a *E. coli* ATCC 35218 de 80 mg/ml, mientras que el extracto acuoso de *P. stratiotes* no tuvo efecto antimicrobiano alguno.

A nivel regional, Mamani (2023) caracterizó metabolitos secundarios de achiwa (*Cybistax antisyphilitica*) y evaluó su efecto antimicrobiano en *Escherichia coli* aisladas de orinas de gestantes del Centro de Salud Vallecito (Puno) encontrando que los extractos etanólicos tienen abundante concentración de alcaloides, taninos (++) y fenoles (+++), asimismo el aceite esencial mostró leves concentraciones de taninos y fenoles (+) y no presentaron alcaloides (-), mientras que la CMI de los extractos etanólicos y los aceites esenciales de achiwa sobre *E. coli* se presentaron al 100%, con inhibición del 85% y 100% de los aislamientos, respectivamente.

Mamani (2022), en Puno evaluó el efecto antibacteriano “*in vitro*” del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “Isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* de gestantes con infección del tracto urinario identificándose uropatógenos como *E. coli* (7), *Klebsiella sp* (1), y *S. aureus* (2), frente a los cuales determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de “isaño” siendo para *E. coli* de 12.5%, para *Klebsiella sp* de 25% y *S. aureus* de 6.25%. demostrando resistencia bacteriana en *E. coli* y *Klebsiella sp* a una dosis máxima de 50 µl y sensibilidad a una porción de 30 µl en *S. aureus*, concluyendo que el extracto etanólico de *T. tuberosum* “isaño” tiene efecto antibacteriano contra uropatógenos como *E. coli*, *Klebsiella sp*, *S. aureus* en gestantes con ITU del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno.



Otro trabajo, como el de Laura (2019), en Puno, determinó la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*) y muña (*Minthostachys mollis*) frente a *Staphylococcus aureus* y coliformes fecales, encontrando halos de inhibición con aceite de muña a 25%, 50% y 75%, frente a coliformes fecales, los que correspondieron a 9.79 mm, 10.74 mm y 13.27 mm respectivamente, mientras que sobre *S. aureus*, al 25% esta fue de 9.96 mm, al 50% de 10.74 mm y al 75% de 13.15 mm; en cambio con el aceite esencial de eucalipto frente a coliformes fecales a una concentración del 25% generó un halo de 12.09 mm, al 50% de 13.29 mm, al 75% de 14.58 mm, y frente a *S. aureus* al 25% de 11.72 mm, al 50% de 13.56 mm y al 75% de 14.37 mm, concluyendo que el aceite de eucalipto tiene mayor inhibición que el aceite de muña, donde participarían principios activos como monoterpenos, alcoholes, cetonas y óxidos terpénicos.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 *Escherichia coli*

a. Descripción

Es una enterobacteria significativa y relevante que se aloja en la mayor parte del organismo humano. Es móvil, con reacción a catalasa positiva y una oxidasa negativa, reduce nitrato a nitrito y tiene la capacidad de fermentar lactosa y producir indol a partir del triptófano. La reacción de Voges-Proskauer, la ureasa y la fenilalanina desaminasa son negativas.(Hernández, 2010).

b. Epidemiología

Las embarazadas presentan mayor predisposición para contraer la infección en el tracto urinario, las cuales pueden darse de manera asintomática o



sintomática. Los estudios realizados demuestran que el 5% de las gestantes presentan la patología, además se menciona que las que fueron tratadas de manera adecuada no presentan mayor complicación durante la gestación, sin embargo, las que no reciben tratamiento si tienen infección del tracto urinario superior (Cevallos & Pinos, 2017).

c. Síntomas

Cuando el sistema urinario está infectado se genera bacteriemia. El mayor porcentaje de infecciones del tracto urinario en un organismo sano son producidos por un cierto número de antígenos o factores de virulencia específicos que permiten una rápida colonización. En tal sentido, *E. coli* uropatógena es la denominación más precisa que identifica a estos microorganismos, que producen hemolisina y conducen a la infección de tejidos (Carroll et al., 2016).

d. Clasificación taxonómica

Se la clasifica de la siguiente manera (Perez, 2019):

Dominio	: Bacteria
Reino	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gamma proteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: Escherichia
Especie	: <i>Escherichia coli</i>



2.2.2 Plantas medicinales

En los últimos tiempos, ha habido un aumento en la popularidad del consumo de plantas medicinales. Se recurre a su uso tanto con fines preventivos como curativos, con el objetivo de disminuir la necesidad de medicamentos recetados (López, 2008). Según la Organización Mundial de la Salud, todas las plantas que contienen sustancias activas en una o más partes son utilizadas por el ser humano con fines terapéuticos ya que tienen una actividad biológica que altera o modifica el funcionamiento de órganos (WHO, 1998). Una sola planta puede contener muchos componentes que funcionan solos o en combinación con otros compuestos de la misma para producir un efecto farmacológico deseado (Vellingiri et al., 2020).

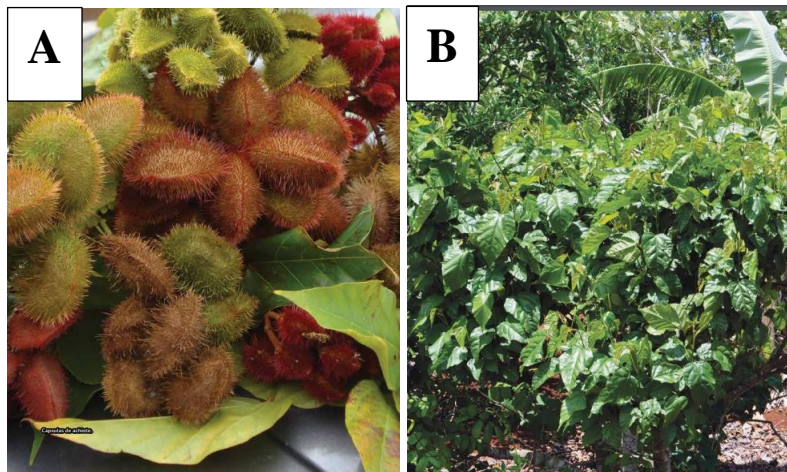
Las plantas medicinales son consideradas como aquellas que contienen uno o más componentes activos capaces de ser administrados en dosis adecuadas, y que poseen propiedades curativas frente a enfermedades tanto en seres humanos como en animales. El valor medicinal de las plantas radica en la presencia de sustancias químicas conocidas como "principios activos", los cuales tienen efectos fisiológicos complejos cuya naturaleza química aún no se comprende completamente. Estos principios activos pertenecen a diversas categorías, como los alcaloides, los glúcidos, los taninos, las saponinas, los fenoles, las quinonas, los terpenos, los carotenoides, las cumarinas, flavonoides y resinas. Gracias a la presencia de estos principios activos, las plantas medicinales ofrecen beneficios a quienes las consumen. A pesar de las investigaciones y estudios realizados sobre las plantas medicinales, aún se desconoce gran parte de los principios activos responsables de las propiedades extraordinarias de *Bixa orellana* L. (Cauna & Coronado, 2018).

a. Descripción botánica

La *Bixa orellana* L. ha sido estudiada durante varios años, así los nativos usaban las hojas de esta planta para tratar mordeduras de serpientes y para combatir la tos además de sus propiedades hemostáticas y antiinflamatorias (Silva et al., 2022).

Figura 1

Planta de Bixa orellana L. A. Fruto, B. Planta entera



Fuente: Solis et al. (2017)

La *Bixa orellana* L. presenta una altura variada (3 a 10 metros), tiene raíces secundarias y terciarias con un sistema radicular bien desarrollado, con un diámetro aproximado de 30 cm, corteza amarilla, hojas alternas con peciolo ovados de entre 8 a 20 cm truncados o redondeados en la base y lepidotados en el envés. Las flores son actinomorfas, hermafroditas, polistémonas con unicarpelo y óvulo unilocular, su estigma permanece por sobre las anteras, tienen un diámetro promedio de 3-6 cm, con pedicelos de 7-16 mm de largo, y un anillo de glándulas debajo del cáliz, florecen escalonadamente, comenzando por los capullos terminales. El ovario del pistilo es unicelular y contiene muchos óvulos en dos



placentas parietales, los estambres crecen adoptando una dirección circular. El fruto es una cápsula roja, de 2 a 6 cm de largo, compuesta de valvas o segmentos, con pelos gruesos espinosos, dehiscente (fruto abierto), que al madurar se separan en dos valvas de simetría bilateral, aunque pueden encontrarse variantes indehiscentes (frutos cerrados), que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro (Decraene, 1989; Leal & de Clavijo, 2010; León & Vásquez, 2013).

El fructificación generalmente ocurre entre diciembre a junio, pero este puede variar dependiendo del manejo que reciba la plantación. La cápsula puede tener la coloración verde, rojas ocres y amarillas y eso depende a la variante. Las frutas pueden ser completas o incompletas si están completamente secas. La parte exterior del fruto tiene protuberancias triangulares, mientras que en el interior tiene una placenta donde se aloja la semilla. La producción de semillas comienza después de dos años cuando la planta tiene tres años (Gallegos & Gallegos, 2020) las cuales son poliédricas, cubiertas por una carnosidad o arilo pulposo (López et al., 2018).

b. Composición química

Contiene retinol y carotenoides como son caroteno, bixina, metilbixina, transbixina, norbixina, criptoxantina, luteína y zeaxantina. Sus semillas presentan un pigmento rojizo que es una mezcla de carotenoides como bixina, norbixina, fitoeno y caroteno, además saponinas, compuestos fenólicos, aceites fijos, terpenoides, tocotrienoles y flavonoides, incluyendo luteolina y apigenina (Lorenzi et al., 2021).

En relación a las hojas hay alcaloides, flavonoides (Caceres, 1996) y el sesquiterpeno ishwarano (Lawrence & Hogg, 1973). La norbixina es un



carotenoide dicarboxilado soluble en agua que se encuentra como parte de la cubierta de la semilla de Bixa. Los principales carotenoides en las semillas son la *bixina* y *norbixina*, que forman un pigmento fuerte llamado annatto (Raddatz et al., 2017).

c. Clasificación taxonómica

La clasificación botánica del achiote es la siguiente (Gallegos & Gallegos, 2020):

Reino	: Plantae
Subreino	: Tracheobionta
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Malvales
Familia	: Bixaceae
Género	: <i>Bixa</i>

Especie: *Bixa orellana* L., 1753.

2.2.3 Metabolitos secundarios

No desempeñan una función directa en el desarrollo de las plantas, pero cumplen una función ecológica como parte del mecanismo de defensa vegetal y tienen la capacidad de atraer polinizadores por lo que, algunos de los metabolitos secundarios se emplean en tratamientos terapéuticos (Ávalos & Urría, 2011). Tres de los metabolitos secundarios más comunes se enumeran a continuación:

Alcaloides

Pertencen a los metabolitos secundarios de mayor presencia, en tanto los elementos heterocíclicos nitrogenados son solubles en el agua por lo que se



generan a partir de un conjunto de reacciones entre sí. Así los alcaloides de quinolisidina presentes en *Lupinus spp.* se deben al incremento de algunos aminoácidos, los cuales se puede clasificar en pseudoalcaloides y protoalcaloides (Campos, 2004).

Los alcaloides de quinolina son compuestos de alto poder antibacteriano, de amplio espectro y permiten combatir cepas de *S. typhimurium* y *E. coli* (Campos, 2004).

a. Flavonoides

Pertencen a los compuestos denominados fenólicos, los cuales se generan por el metabolismo secundario de vegetales inmersos en una ruta biosintética mixta, mediante las rutas del ácido shikímico y de los policétidos. Tienen propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias que son utilizadas por la medicina tradicional y alternativa. En este aspecto la quercetina es un flavonoide que tiene sinergia con la vitamina C para prevenir la oxidación y prolongar el tiempo de actividad antioxidante (Gonzales & Hoyos, 2019).

b. Taninos

Son compuestos altamente oxigenados y/o presentan azúcares en su composición química, dándoles una naturaleza hidrofílica (Costa et al., 2019). Se los clasifica en:

– Taninos hidrolizables

Son obtenidos mediante tratamiento con ácido o enzimas. Se demostró que el ácido gálico aplicado en la agricultura debido al poder antioxidante que tiene, aumenta la germinación de las semillas de trigo (Costa et al., 2019).



– **Taninos condensados**

Son aquellos compuestos formados por la polimerización de flavonoides, por ello, al pasar por un tratamiento de ácidos fuertes, estos taninos son hidrolizados a antocianinas (Costa et al., 2019).

2.2.4 Actividad antibacteriana

Es la capacidad que posee una sustancia para detener el crecimiento o la propagación de bacterias. La inhibición varía con respecto a las diferentes concentraciones que se utilicen en los solventes de los organismos empleados, asimismo la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se encuentra relacionada con la composición química (Borboa et al., 2010; Medina, 2015).

Entre algunos extractos utilizados en la valoración de la actividad antibacteriana se encuentran:

a. Extracto metanólico

Se extrae de una materia prima de origen vegetal que ha sido secada anteriormente en contacto con metanol. Existe procedimientos para mejorar la calidad del compuesto que se obtendrá a partir de la eliminación de algunos componentes. Un proceso básico consiste en hacer secar las hojas de la planta en un horno convencional en un tiempo definido. Cuando se obtienen las hojas secas, se realiza un proceso de extracción con metanol a un porcentaje establecido (Corzo, 2012).

b. Extracto etanólico

Es un extracto de olor característico, que se obtiene desde materia prima desecada de origen vegetal, la cual puede ser sometida a maceración o percolación



empleando etanol con solvente, seguida de la eliminación del solvente por un procedimiento físico, en la que algunos procesos pueden comprender determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (Gonzalez, 2004).

2.2.5 Aceite esencial

Presentan compuestos con diferentes niveles de actividad antibacteriana, se derivan de una variedad de frutas cítricas y plantas aromáticas, su volatilidad a temperatura ambiente, a diferencia de otros agentes antimicrobianos, los convierte en alternativas adecuadas y naturales de aditivos alimentarios (Gonzalez, 2004). Se utilizan como saborizantes en la industria alimentaria, y esta propiedad aumenta su potencial saborizante, antimicrobiano y antioxidante, lo que tiene grandes ventajas como producto natural ya que no representa una amenaza para la salud humana, así existen diversos estudios sobre aceites esenciales evaluando sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas e insecticidas como alternativa terapéutica en infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos, y debido a que los productos de origen natural son complejos, permite diferentes estrategias para combatir estos agentes infecciosos (Forero-Saldarriaga et al., 2020).

2.2.6 Medios de cultivo

Son formulaciones artificiales que deben cumplir una serie de características que los hagan óptimos para el crecimiento de organismos como bacterias o levaduras (Flores et al., 2017).



A. Condiciones de los medios de cultivo

- **Temperatura:** Las diferentes temperaturas dependen del tipo de cultivo (MDMC, 2020).
- **pH:** La escala de pH mide la acidez o la alcalinidad, por lo cual muchos microorganismos crecen mejor con un pH neutro, pero otras requieren condiciones más ácidas (MDMC, 2020).
- **Ambiente:** Para evitar alterar o impedir el crecimiento microbiológico normal, todos los medios de cultivo deben ser completamente estériles (MDMC, 2020).
- **Luz:** Los medios de cultivo deben estar ubicados donde no estén expuestos a la luz solar. La luz debe mantenerse siempre bajo control (MDMC, 2020).
- **Humedad:** Las condiciones en la humedad deben ser las apropiadas tanto del medio como del ambiente en el que se encuentra, ya que la mayoría de microorganismos requieren un bajo nivel de humedad (MDMC, 2020).

B. Consistencia del medio de cultivo

Pueden ser sólidos (deriva de un medio líquido, al que se le añade un agente coloide, que solidifica a esta solución), semisólidos (contienen menos de 1% de agar) o líquidos (libre de agar, más sí con peptona y extracto) y en cuanto a la consistencia se corresponde a cada tipo de cultivo seleccionado (MDMC, 2020).



C. Tipos

– Agar Eosina y Azul de metileno

Este medio esta combinado con las fórmulas de Holt-Harris y Teague con las fórmulas de Levine, para mejorar el rendimiento y para un buen aislamiento de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el crecimiento microbiano, y favorece la diferenciación entre organismos que pueden utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, lo cual se revela por los indicadores eosina y azul de metileno que ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas- (MCD, 2023).

– Agar Müeller Hinton

Este medio es utilizado para realizar pruebas y evaluaciones de susceptibilidad de las bacterias aerobias y anaerobias de rápido crecimiento como es el caso de estafilococos, enterococos, especies de *Enterobacteriaceae* y bacilos gramnegativos aerobios (p. ej. *Pseudomonas spp.*) (Calderon et al., 2023).

– Agar Infusión Cerebro Corazón

Se sustenta en experimentos clínicos y es adecuado para llevar a cabo el cultivo de una amplia gama de organismos, bacterias, parásitos y hongos filamentosos (BD, 2013).



2.2.7 Pruebas bioquímicas

a. Prueba TSI (Agar Triple Azúcar Hierro)

Se utiliza para hacer una diferenciación de enterobacterias en base a la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico. El crecimiento bacteriano se visualiza en el entorno del cultivo y el extracto de carne y la pluripeptona son los encargados de aportar los nutrientes para que se realice este proceso (Rodríguez & Muñoz, 2017).

El cambio de color amarillo indica la producción de ácido y el rojo es para la alcalinización son fácilmente identificables. El tiosulfato sódico se reduce a SH_2 , que al reaccionar con una sal de hierro genera sulfuro de hierro negro. La degradación de la lactosa ocurre en la parte superior (pico de flauta), de la sacarosa en la parte intermedia, mientras que la glucosa es fermentada en la parte profunda y en condiciones anaeróbicas; y la presencia de burbujas corresponde a la producción de CO_2 (Mendo, 2014).

b. Prueba LIA (Lisina Hierro Agar)

Este medio de cultivo sirve para diferenciar microorganismos, la presencia de peptona y extracto de levadura proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. El hidrato de carbono ayuda a la fermentación de glucosa y el sustrato lisina se utilizan para determinar la existencia de la enzima descarboxilasa y desaminación. Los indicadores de la elaboración de ácido sulfúrico son citrato de hierro y amonio y tiosulfato de sodio. El púrpura de bromocresol es un indicador de pH (su color es amarillo cuando el ambiente es ácido y violeta cuando el pH es alcalino) y cuando hay producción de SH_2 se presenta un ennegrecimiento del medio de cultivo (Britania, 2012).



c. Prueba Citrato de Simmons

Este agar nos ayuda a evaluar si los organismos tienen la capacidad de utilizar el citrato como la única fuente de carbono y los compuestos de amoniacales al nitrógeno como única fuente en su metabolismo, lo que da como resultado para la alcalinización del medio ambiente. Este medio presenta citrato de sodio y acetato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, el indicador de pH de este medio es el azul de bromotimol. Solo las bacterias capaces de metabolizar el citrato pueden multiplicarse en este medio y liberar iones de amoníaco, lo que provoca una fuerte alcalinización del medio, como lo demuestra el cambio de color del indicador de pH de verde a azul (García & Mendoza, 2014).

d. Prueba Motilidad Indol Sulfuro

Este medio conocido como SIM es utilizado para diferenciar los bacilos entéricos en base a la producción de ácido sulfhídrico, indol y su movilidad (MDM, 2020).

Las bacterias que reducen el sulfato producen ácido sulfhídrico el cual reacciona con el amonio ferroso para producir sulfato ferroso (H_2S) que da como resultado un color oscuro a lo largo de la línea de inoculación. La movilidad es visible ya que es un medio semisólido y cuando es positivo el crecimiento aparece por fuera de la línea de lo que se siembra, en forma de turbidez alrededor del canal de siembra; la no movilidad se caracteriza por el crecimiento exclusivamente a lo largo de dicho canal (MDMC, 2020).

Esta prueba se realiza para determinar la capacidad de las bacterias de producir indol a partir del triptófano, lo cual se demuestra mediante el reactivo de



Kovacs, el cual en presencia de indol da lugar a una coloración rojo-púrpura de forma anular (Lara et al., 2011).

e. Prueba urea

Se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan la urea, como *Proteus* spp., otras enterobacterias y estafilococos (Britania, 2019).

Este medio de cultivo, presenta la tripteína y la glucosa lo cual facilitan los nutrientes para la proliferación de microorganismos, también el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y su marcador de pH es el rojo fenol. De este modo, los microorganismos que hidrolizan la urea mediante la ureasa son las que liberan amoníaco y CO₂, los cuales alcalinizan a los medios y hacen cambiar de amarillo a rojo fenol. Cuando la glucosa se fermenta activa la enzima ureasa, habiendo un incremento de la velocidad en el metabolismo de aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea. Es muy recomendado para la detección de actividad ureásica como es el caso de *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp y *Citrobacter* spp (Britania, 2019).

2.2.8 Actividad antibacteriana

A. Definición

Se refiere a la habilidad de una sustancia para impedir el desarrollo o la propagación de bacterias. La magnitud de la inhibición está determinada por la concentración empleada en los organismos (Medina, 2015).



B. Métodos de evaluación

Según Horna et al. (2012), la medición cuantitativa de la actividad in vitro de los componentes antimicrobianos se lleva a cabo generalmente por medio de los diversos métodos. Entre algunos de ellos están:

- **Dilución:** La técnica de dilución se utiliza para determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) y la concentración bactericida mínima (CMB). La CMB es la concentración más baja que puede evitar el crecimiento de un organismo después de ser subcultivado en un medio libre del compuesto evaluado (Picazo, 2000).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se refiere al nivel más bajo de concentración de componentes antimicrobianos en $\mu\text{g/ml}$ que hace posible la inhibición del crecimiento de un microorganismo luego de 24 horas de incubación a 37°C , la cual es considerada como “Gold Standard” y difiere de otros métodos que evalúan las susceptibilidades de los antimicrobianos. Asimismo, verifica las resistencias inusuales en base a la obtención de resultados definitivos siempre que la estimación por otros métodos sea indeterminada (Picazo, 2000).

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Concierno a la mínima concentración de antimicrobianos, que logra eliminar a casi el 100% de los microorganismos visibles luego de un tiempo definido de incubación que por lo general dura 24 horas. En otro caso se requiere establecer la actividad bactericida de un agente antimicrobiano como por ejemplo la endocarditis, osteomielitis, meningitis u otro tipo de



infecciones en enfermos inmunosuprimidos por lo que requiere aplicar métodos de laboratorio que definan con precisión la actividad de los mencionados agentes (Ramirez & Castaño, 2009).

- **Difusión:** Este método es más comúnmente empleado para analizar los extractos de plantas que poseen actividad antibacteriana. Esta técnica se fundamenta en el método de Kirby Bauer, el cual consiste en determinar una concentración y medir si es capaz de eliminar la cepa bacteriana (Picazo, 2000).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

La investigación se llevó a cabo en la región de Puno, donde las hojas de achiote fueron recolectadas en el distrito de San Pedro de Putina Punco, en el centro poblado de San Ignacio sector Alto Urubamba, provincia de Sandía, región Puno a una Latitud Sur de $14^{\circ} 06' 47''$ y una Longitud Oeste de $69^{\circ} 02' 51''$.

Figura 2

Ubicación geográfica de la zona de recolección de la planta de achiote, Bixa Orellana L.



Fuente: Google Earth (2023)

Las muestras de orina recolectadas procedieron de gestantes atendidas en el Laboratorio Preventivo Promocional del primer nivel de atención del Complejo Materno del Hospital Rafael Ortiz Ravines de Juli, Red de Salud Chucuito, provincia de Chucuito, el cual se ubica a $16^{\circ}12'48''$ de latitud Sur y $69^{\circ}27'31''$ de longitud Oeste, con la respectiva autorización del director y del jefe de laboratorio del Hospital Rafael Ortiz Ravines.



Asimismo, las plantas recolectadas fueron llevadas al laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas (15°49' 31.3" LS y 70°01'03.9" LO).

3.2 DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación es de tipo experimental y transversal (Hernández et al., 2014). Experimental debido a que se trabajó con tratamientos referidos a diferentes concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico, que fueron contrastados con un tratamiento control (gentamicina) además de las 18 repeticiones referidas a cada una de las cepas de *E. coli*, correspondiendo a un diseño experimental completamente randomizado. Y es transversal porque se desarrolló una sola evaluación entre los meses de febrero a mayo del 2022.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población está representada por todas las cepas de *Escherichia coli* aisladas de orinas procedentes de gestantes atendidas en el Centro de Maternidad del Hospital Rafael Ortiz Ravines, de las cuales se obtuvo una muestra de 18 cepas de *Escherichia coli*, entre febrero y abril del 2022, determinado por la siguiente fórmula para población con tamaño desconocido con el objetivo de estimar la media poblacional, para lo cual se dispuso de un marco muestral de 36 urocultivos sin diagnóstico de preeclampsia, de los cuales 7 fueron descartadas por ser negativas y 11 correspondieron a uropatógenos diferentes a *Escherichia coli*, siendo 18 los urocultivos de la especie *Escherichia coli*, seleccionados por muestreo no probabilístico de tipo intencional (Arias, 2012).

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

=Zeta crítico: valor determinado para un nivel de confianza del 95%, elevado al cuadrado= $1,96^2$



e = Error muestral: falla que se produce al extraer la muestra de la población=0.05

S = Desviación típica o desviación estándar=0,109

$$n = \frac{1.96^2 \cdot 0.109^2}{0.05^2} = 18.25 = \sim 18$$

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Determinación de la composición fitoquímica cualitativa (alcaloides, fenoles y taninos) del aceite esencial y extracto etanólico de *Bixa orellana* L.

3.4.1.1. Recolección de muestra vegetal

a. Técnica

Recolección manual

b. Fundamento

Las plantas albergan productos naturales con una alta cantidad de metabolitos secundarios propios de cada zona geográfica (Atanasov et al., 2015). El material vegetal debe secarse a temperaturas inferiores a 30°C y lejos de la luz solar para evitar la degradación química de los componentes termolábiles o sensibles a los rayos UV (Abubakar & Haque, 2020). Los constituyentes del material vegetal recientemente recolectado, son susceptibles a la descomposición y por lo mismo deben ser extraídos lo antes posible (Jones & Kinghorn, 2012).



c. Procedimiento

El material vegetal fue obtenido del distrito de San Pedro de Putina Punco, en el centro poblado de San Ignacio, sector Alto Urubamba, provincia de Sandía, región Puno (Perú), para lo cual se fue a las 9:00 am y empleó unas tijeras con las que se cortó las hojas del achiote (5 kg de material vegetal fresco) y fueron colocadas en un cooler de tecnopor, el cual de inmediato fue trasladado al laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, donde a su vez para su identificación taxonómica se utilizó claves dicotómicas como la de Mostacero et al. (2009) y Condori (2002), asimismo se certificó su identificación en el Herbario de la Universidad Nacional de San Agustín (Arequipa).

3.4.1.2. Obtención del extracto etanólico

a. Técnica

Maceración

b. Fundamento

El extracto se obtiene a partir de materia prima seca de origen vegetal mediante maceración en contacto con etanol y luego separación del mismo a través de un proceso físico, para lo cual se pueden realizar determinadas manipulaciones con la finalidad de eliminar determinados componentes, mejorando la calidad del producto requerido en la que el extracto llega a tener un olor característico (Nortjie et al., 2022). La finalidad de la extracción con solventes es inactivar las enzimas que puedan estar presentes en la planta (Jones & Kinghorn, 2012). El agua presente en el etanol favorece su alta



polaridad y miscibilidad con disolventes orgánicos, además el etanol es autoconservante a una concentración superior al 20% (Abubakar & Haque, 2020).

c. Procedimiento

De acuerdo a las recomendaciones de uso y consumo por parte de los expendedores para el tratamiento de infecciones urinarias, se procedió a secar las hojas achiote en secadora de aire circulante a 40 °C por 48 a 72 horas. Los extractos etanólicos se obtuvieron mediante extracción sólido – líquido (percolación) a presión atmosférica y temperatura ambiente hasta agotamiento, empleando etanol de 96% como solvente (Navarrete et al., 2020). Para el proceso de percolación se colocó 445 g de material seco y molido (pulverizado) de achiote por litro de etanol (Pimentel et al., 2015). La fitoquímica preliminar se realizó con el extracto etanólico luego de una maceración de 7 días lo cual fue obtenido luego de filtrado en papel Whatman N° 5 tomado como el 100% de extracto obtenido por percolación, la misma que sirvió para la preparación de los extractos al 10%, 25%, 50%, 75% y 100%.

3.4.1.3. Obtención del aceite esencial

a. Técnica

Destilación por arrastre de vapor de agua (López et al., 2005).

b. Fundamento

Consiste en calentar la planta en agua, hasta que sus componentes más volátiles pasen a la fase de vapor y a continuación se enfría el vapor



para recuperar dichos componentes, cuyos puntos de ebullición son esencialmente mayores al del agua, que comienza con la evaporización por burbujeo de vapor de agua y por consiguiente se condensan por enfriamiento junto con el agua (López et al., 2005), dando lugar a un destilado líquido constituido por dos fases inmiscibles, la acuosa y la orgánica que es el aceite esencial, las cuales se pueden separar por decantación debido a la diferencia de densidad existente entre ambas (Casado, 2018).

Se puede extraer una gran cantidad de principio activo con una pequeña cantidad de disolvente (Abubakar & Haque, 2020).

c. Procedimiento

El proceso de obtención de aceite esencial se realizó colocando 5 litros de agua destilada en una olla a presión de 7 litros (Marca Clock), luego se agregó 400 g de hojas secas de achiote, de ahí se cerró la tapa herméticamente y se procedió a encender la cocinilla eléctrica por 1 h. Asimismo, la olla a presión estuvo conectado al refrigerante de vidrio por el cual pasaba el agua fría del caño, el vapor y el aceite los cuales fueron recepcionados en el otro extremo de un matraz, para luego separar el aceite esencial con la ayuda de una micropipeta automática, siendo de ahí almacenada en frasco de vidrio acaramelado para evitar la radiación solar, para posteriormente determinar su densidad y rendimiento (Ochoa et al., 2012).

Figura 3

Extracción de aceite esencial por el método de arrastre con vapor



Fuente: Banco de imágenes

3.4.1.4. Análisis fitoquímico

Estos se realizaron con el aceite esencial y extracto etanólico al 100%, siendo los procedimientos los siguientes:

A. Determinación de alcaloides

a. Técnica

Colorimétrica

b. Fundamento

Los alcaloides son solubles en solventes orgánicos como éter y cloroformo los cuales son prácticamente no se disuelven en agua; sus sales, por otro lado, si se disuelven fácilmente en agua y suelen ser insolubles en los solventes orgánicos. Su extracción se realiza, por lo tanto, ya sea tratando la droga con un solvente orgánico, después de haber puesto en libertad sus combinaciones por un álcali (amoníaco, soda), o bien haciendo actuar un ácido (ácido clorhídrico o sulfúrico diluido) por pasajes



sucesivos del alcaloide de la fase acuosa a la orgánica, después de acidificación (Villafan, 2014).

Para el caso de la reacción de Dragendorff se fundamenta en que los alcaloides en su mayor parte tienen un grupo amino terciario (R_3N), los cuales puede reaccionar de manera similar al amoníaco (NH_3) y actuar como base, que reacciona con un ácido para formar una sal de amonio, la cual conduce a la reacción de cambio iónico entre la sal de amonio y el tetrayodo bismutato de potasio que permite la formación de una sal compleja insoluble y dependiendo de la naturaleza del alcaloide (o amina terciaria), este ion desarrolla un color que va de amarillo a naranja u rojo a marrón. Así las aminas secundarias crearán colores menos intensos, no obstante algunos alcaloides no reaccionan (Raal et al., 2020).

Respecto a la reacción de Mayer el átomo de nitrógeno del alcaloide forma un enlace covalente coordinado con el ion potasio del reactivo de Mayer, también conocido como tetrayodomercurato de potasio, el cual aparece como un precipitado de color crema (Laboratoryinfo, 2022).

Y en cuanto a la reacción de Wagner inicialmente el yodo reacciona con el ion (I^-) del yoduro de potasio creando el ion I_3^- (solución marrón), donde el ión metálico de potasio (K^+) se unirá con un enlace coordinado covalente al nitrógeno del alcaloide creando un precipitado complejo de alcaloide de potasio (Hamasalih, 2023).

c. Procedimiento

Se desarrollaron 3 reacciones: se colocó en el tubo de ensayo 5 ml del extracto o aceite esencial al que se agregó 2 ml de reactivo de Dragendorff, se homogeneizó y se realizó una lectura visual teniendo en cuenta el rango de intensidad de la evaluación, la cual formó un precipitado café rojizo (Medina, 1997).

De otro lado, a otro tubo de ensayo se le agregaron 5 ml del extracto o aceite esencial a examinar y 2 ml de reactivo de Mayer, se homogeneizó y se tomó una lectura visual teniendo en cuenta el rango de intensidad del color, la cual formó un precipitado amarillo pálido (Medina, 1997).

Y finalmente, en un tubo de ensayo se colocó 5 ml del extracto o aceite esencial al que se le agregó 2 ml del reactivo Wagner, se homogenizó y se procedió a realizar la lectura visual, tomando en cuenta el rango de intensidad de la coloración descrito en la Tabla 1, la cual formó un precipitado naranja oscuro (Medina, 1997).

Tabla 1

Rango colorimétrico de valoración cualitativa de metabolitos secundarios

Lectura	Rango
Color intenso	+++ = muy abundante
Color regular	++ = abundante
Color débil	+ = leve

Fuente: (Medina, 1997).



B. Identificación de fenoles

a. Técnica

Colorimétrica

b. Fundamento

El fenol reacciona con el cloruro férrico neutro acuoso para formar un complejo de fenóxido férrico que es de color violeta (Valenzuela, 2015).

c. Procedimiento

Para esto en un tubo de ensayo se adicionó 2 ml de cloruro férrico al 5% y 5 ml del extracto o aceite esencial a investigar, se homogenizo y se procedió hacer la lectura visual, tomando en cuenta para ello el precipitado verde oscuro (Medina, 1997).

Para la interpretación de la concentración de metabolitos se empleó el rango colorimétrico descrito en la Tabla 2.

Tabla 2

Rango colorimétrico de valoración cualitativa de metabolitos secundarios

Lectura	Rango
Color intenso	+++ = muy abundante
Color regular	++ = abundante
Color débil	+ = leve

Fuente: (Medina, 1997).

C. Identificación de taninos

a. Técnica

Colorimétrica

b. Fundamento

El cloruro de sodio al 5% facilita la precipitación de los taninos sobre todo si es en caliente, pudiendo ser facilitado por solventes orgánicos (SU, 2024).

c. Procedimiento

Para esto en un tubo de ensayo se adicionó 2 ml de cloruro de sodio al 5% y 5 ml del extracto o aceite esencial a investigar, se homogenizo y procedió a realizar la lectura visual, tomando en cuenta para ello el precipitado crema (Medina, 1997).

Para la interpretación de la concentración de metabolitos se empleó el rango colorimétrico mencionado en la Tabla 3.

Tabla 3

Rango colorimétrico de valoración cualitativa de metabolitos secundarios

Lectura	Rango
Color intenso	+++ = muy abundante
Color regular	++ = abundante
Color débil	+ = leve

Fuente: (Medina, 1997).



3.4.2 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de aceites esenciales y extractos alcohólicos de *Bixa orellana L.* en concentraciones de 10%, 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* aislada de orinas positivas a infección urinaria de gestantes del Centro de Maternidad de Juli.

3.4.2.1. Tratamientos de extracto etanólico y de aceite esencial de hojas de *Bixa orellana L.*

a. Técnica

Microbiológica

b. Fundamento

Los extractos etanólicos extraen altas cantidades de compuestos fenólicos en comparación con la acetona, el agua y el metanol para lo cual se emplea un polvo seco vegetal del cual se extraen compuestos bioactivos (Altemimi et al., 2017). De otro lado, los aceites esenciales son mezclas de 20 a 60 componentes en concentraciones bastante diferentes, con algunos de ellos a concentraciones bastante altas (20 a 70%) y otros en cantidades mínimas. Los componentes en altas concentraciones (terpenos, terpenoides, moléculas con un anillo aromático) desempeñan un papel importante en el efecto antimicrobiano (Perricone et al., 2015).

c. Procedimiento

Para obtener los resultados de este objetivo, se realizó los procedimientos recomendados por Ali et al. (2019), donde la preparación

de las concentraciones a 10%, 25%, 50%, 75% y 100% de los extractos etanólicos y del aceite esencial se prepararon según la Tabla 4.

Tabla 4

*Preparación de los tratamientos a base de extractos etanólicos y aceite esencial obtenidos de hojas de *Bixa orellana* L.*

Tratamiento	Preparación
10%	1 ml de extracto/aceite + 9 ml de etanol al 96%
25%	2.5 ml de extracto/aceite + 7.5 ml de etanol al 96%
50%	5.0 ml de extracto/aceite + 5.0 ml de etanol al 96%
75%	7.5 ml de extracto/aceite + 2.5 ml de etanol al 96%
100%	10.0 ml de extracto/aceite*

Nota: * Las concentraciones equivalentes a las del extracto etanólico para un volumen de 10 ml, correspondientes al aceite esencial se realizaron para un volumen de 100 μ l.

Fuente: Elaboración propia

Cada disco de sensibilidad a base de papel filtro Whatman N° 5 fue impregnado con la preparación descrita líneas arriba, para ello se colocaron en una luna de reloj la preparación (extracto etanólico y/o aceite esencial) y a continuación los discos de papel por un tiempo de 10 segundos, de ahí se los dispuso en una estufa a 37 °C con la finalidad de que el alcohol se evapore y que los principios activos del aceite queden impregnados en los discos de papel filtro.

3.4.2.2. Aislamiento bacteriano

a. Técnica

Cultivo *in vitro* en agar Eosin Methylen Blue (EMB)



b. Fundamento

El agar EMB incluye peptona, lactosa, sacarosa y los colorantes eosina y azul de metileno; lo cual se utiliza comúnmente este medio seleccionar y diferenciar. El agar EMB es exclusivo para bacterias Gram negativas. El colorante azul de metileno en pequeñas cantidades inhibe eficientemente el crecimiento de gran parte de las bacterias Gram positivas. La colorante eosina expresa los cambios de pH, pasando de incoloro a negro en ambiente ácidas. El medio agar EMB contiene lactosa y sacarosa, pero no glucosa, como fuente de energía, de este modo los azúcares que se encuentran en el medio son sustratos fermentables que estimulan el crecimiento de algunas bacterias Gram negativas, especialmente coliformes fecales y no fecales, así como la diferenciación de bacterias entéricas (Lal & Cheeptham, 2007).

Las bacterias Gram negativas pueden fermentar la lactosa (generalmente entéricas) acidificando el medio, por lo que en condiciones ácidas los colorantes producen un complejo de color púrpura oscuro que habitualmente se asocia con un brillo verde metálico, el cual es un indicador de una fuerte capacidad de fermentación de lactosa y/o sacarosa, típica de las coliformes fecales. De otro lado, la generación de cierta acidez en el medio, es el resultado de una lenta fermentación (por organismos fermentadores lentos de lactosa), dando un color marrón rosado, mientras que las colonias no fermentadoras de lactosa aparecen translúcidas o rosadas (Lal & Cheeptham, 2007).



c. Procedimiento

Se utilizó un asa calibrada de orina para 0,001 ml, la cual fue esterilizada por calentamiento del alambre hasta el rojo vivo en el mechero, se enfría la asa y luego se introdujo en la muestra de orina ya homogenizada y se observó la formación de una película en el asa y posteriormente se extendió sobre un área de la placa con agar, en forma de estrías, pero sin presionar para no romper el agar y finalmente se flameó el asa (León & Vásquez, 2013).

Se pusieron las placas en la incubadora, siempre invertidas, a 37°C durante 24 horas; luego de la incubación, con la presencia de *Escherichia coli* se observaron las colonias típicas de color violeta intenso con un brillo metálico característico o colonias atípicas (León & Vásquez, 2013).

3.4.2.3. Tinción de Gram

a. Técnica

Gram

b. Fundamento

Es una tinción ampliamente que es usada en bacteriología, el cual permite dividir a las bacterias en dos grandiosos grupos taxonómicos: Gram positivas y Gram negativas, según sea su comportamiento frente a la tinción, lo cual se debe a la distinta composición química de la pared celular. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de mureína o peptidoglicano (de 20 a 80 nm de espesor) en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano (2 nm) más



fina y una capa más externa de lipopolisacáridos, lipoproteínas y lípidos (Corrales & Caycedo, 2020).

El fundamento básico de la tinción de Gram involucra la capacidad que tiene la pared celular bacteriana para retener el tinte cristal violeta durante el tratamiento con disolvente. Los microorganismos Gram positivos tienen un mayor contenido de peptidoglicano, mientras que los organismos Gram negativos tienen un mayor contenido de lípidos (Tripathi & Sapra, 2023).

Al principio, todas las bacterias absorben el tinte cristal violeta; sin embargo, la capa lipídica de los organismos Gram negativos se disuelven con el uso del disolvente. Con eso los Gram negativos pierden la tinción primaria. Por el contrario, el disolvente deshidrata las paredes de las células Gram positivas y cierra los poros obstaculizando la expansión del complejo violeta-yodo, por tanto, las bacterias perduran teñidas. La duración de la decoloración es un paso crítico en la tinción de Gram, ya que la exposición prolongada a un agente decolorante puede eliminar todas las coloraciones de ambos tipos de bacterias (Tripathi & Sapra, 2023).

El último paso en la tinción de Gram se aplica una tinción de fucsina básica que da a las bacterias Gram negativas decoloradas un color rosado para facilitar su identificación. También se le conoce como contratinción, aunque algunos laboratorios utilizan safranina como contratinción; sin embargo, la fucsina básica tiñe los organismos Gram negativos con mayor intensidad que la safranina (Tripathi & Sapra, 2023).



c. Procedimiento

Se levantó una colonia del cultivo puro de *E. coli* con el asa kolle de punta redonda para extenderlo y fijar el frotis bacteriano, de ahí se tiñó con cristal violeta 1 minuto, luego se lavó con abundante agua el exceso de colorante, seguidamente se cubrió con solución yódica 1 minuto, luego se lavó con agua la abundancia de la solución yódica. Después, se decoloró con alcohol-acetona durante 30 segundos. Se lavó con abundante agua para eliminar el resto de disolvente y tiñó con fucsina durante 1 minuto. Finalmente, se lavó con agua para eliminar el colorante de contraste, se dejó secar la preparación y se observó al microscopio con objetivo 100x, empleando aceite de inmersión (León & Vásquez, 2013).

3.4.2.4. Pruebas de diferenciación bioquímica

a. Fundamento

Para el reconocimiento bacteriano de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* se emplean pruebas de diferenciación bioquímica que comprenden los medios de cultivo Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Agar Citrato de Simmons (CS) y Medio Motilidad Indol Sulfuro (SIM) para lo cual se inocular una colonia sospechosa con el asa recta por el centro hasta el fondo del tubo y se retira por el mismo trazo, sembrando en estría en la parte inclinada, para inmediatamente después incubarla a 35-37°C por 18-24 h (Sacsquispe, 2001).

El medio TSI, hace una exclusión con el consumo de lactosa, glucosa y sacarosa con producción o no de gas y la producción de ácido sulfhídrico siendo por ejemplo A/A igual a reacción ácida (amarilla) en la



parte superior del pico de flauta (lactosa) y en la parte del fondo del tubo (glucosa). Respecto al medio LIA, la lectura se realiza en la columna y en la superficie inclinada, asimismo se observa la formación de ácido sulfhídrico el cual se evidencia por una coloración negra. En el medio Citrato de Simmons el desarrollo del color azul es positivo, y el verde, indica que es negativo al consumo de este compuesto orgánico (Sacsquispe, 2001).

Y el medio SIM es positivo siempre y cuando los microorganismos migren de la línea de siembra y se circulen en el medio provocando turbidez, también puede manifestarse semejando “vellosidades” a lo largo del trazo de siembra. En caso sea negativo se observa un crecimiento bacteriano acentuado siguiendo el trazo de siembra, y el medio circundante se mantiene claro (Sacsquispe, 2001).

b. Procedimiento

Una vez que se confirmó que el microorganismo es una enterobacteria se procedió a realizar las pruebas bioquímicas para determinar la especie, para esto se realizó la siembra a partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, con aguja de kolle en punta inocular el medio de cultivo (León & Vásquez, 2013).

En cuanto al TSI, su siembra se realizó haciendo un picado o el fondo del tubo y extendiendo sobre la superficie del mismo. En cuanto al LIA, la siembra se realizó por picadura en el agar y estría en la superficie inclinada, concerniente al citrato, la siembra se realizó por picadura en el agar y estría en la superficie inclinada, sobre el SIM, este se inoculó por



picadura recta y para el SIM, además de verificar motilidad y producción de SH_2 se añadió por las paredes del tubo 3 a 5 gotas del reactivo de Erlich y se observó la formación o no de un anillo de color fucsia o rojo sobre el agar (Ventura & Sacsquispe, 2005).

Finalmente, todas estas reacciones bioquímicas fueron contrastadas con la Tabla de Reacciones Bioquímicas de la Familia Enterobacteriaceae y de otras bacterias Gram negativas (Mendo, 2014).

3.4.2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

A. Difusión en discos de susceptibilidad

a. Técnica

Kirby Bauer

b. Fundamento

En este procedimiento bien conocido, se inoculo en placas de agar estandarizado del microorganismo de prueba. A continuación, se colocaron en la superficie del agar los discos de papel de filtro (de unos 6 mm de diámetro), que contienen el compuesto de ensayo a la concentración deseada. Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe el crecimiento del microorganismo de prueba y luego se miden los diámetros de las zonas de crecimiento de inhibición (Balouiri et al., 2016).



c. Procedimiento

Se preparó diluciones bacterianas de *E. coli* con una turbidez similar a 0.5 de McFarland, a continuación, con un hisopo estéril se realizó el cultivo de las diluciones bacterianas sobre una placa conteniendo agar Müeller Hinton (MH). En cada placa Petri, sobre el cultivo bacteriano, se colocó los discos de papel filtro Whatman secos y embebidos con las diferentes concentraciones de extracto etanólico y de aceite esencial de achiote (20 μ l), un disco embebido con 20 μ l de agua (control negativo) y un disco de gentamicina (control positivo).

Los cultivos se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37 °C, y la actividad antibacteriana fue determinada con la medida del diámetro de inhibición producido alrededor de cada disco de papel filtro.

B. Dilución

a. Técnica

Macrodilución

b. Fundamento

En este método se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano donde al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (considerando que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que, una vez



inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluye nuevamente el antimicrobiano). Tras mezclar adecuadamente (Picazo, 2000).

Para la determinación del punto final de la concentración mínima inhibitoria (CMI), los dispositivos de visualización pueden facilitar la lectura de las pruebas y el registro de los resultados con una alta capacidad para discernir el crecimiento en los tubos, así luego de la incubación se apreciarán unos tubos sin turbidez y otros, posiblemente, con diferente grado de turbidez. De este modo, la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano, es donde no se observa turbidez, mientras que el tubo control sin antimicrobiano debería estar turbio (Pérez & Rivas, 2021).

En cuanto a la concentración mínima bactericida (CMB) se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano necesaria para matar el 99,9% del inóculo final después de la incubación durante 24 h bajo un conjunto estandarizado de condiciones descritas en el documento M26-A, en el que el CMB puede determinarse después de la macrodilución del caldo mediante el subcultivo de una muestra de tubos, produciendo un crecimiento microbiano negativo después de la incubación en la superficie de placas de agar no selectivas para determinar el número de supervivientes (UFC/ml) después de 24 h de incubación. El criterio de valoración bactericida se ha definido subjetivamente como la concentración más baja, en la que se elimina el 99,9% del inóculo final (Balouiri et al., 2016).



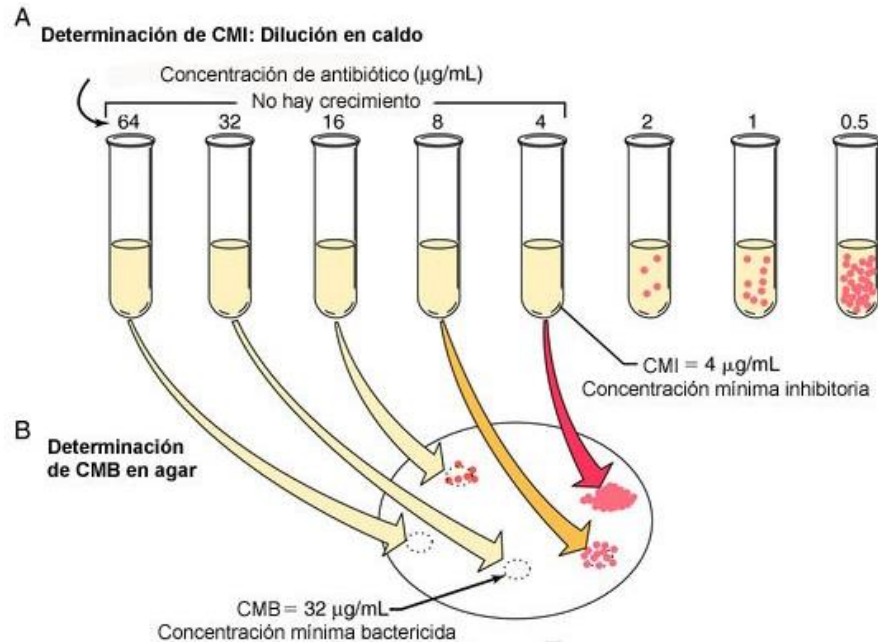
c. Procedimiento

La evaluación del efecto antibacteriano se realizó midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) (Ochoa et al., 2012), para lo cual la CMI se determinó midiendo la turbidez de cada una de las concentraciones de extracto etanólico y aceite esencial (10, 25, 50, 75 y 100%) con respecto a la concentración bacteriana de 1.5×10^8 cél/ml (Estándar MacFarland 0.5), mientras que la CMB se determinó mediante las concentraciones del CMI a partir de la batería de tubos las que no tuvieron turbidez, se hace la siembra en agar Müeller Hinton en placas Petri. Finalmente, los medios se incubaron a 37 °C por 24 horas y los ensayos se realizaron por triplicado, después de la incubación se verifico si tenía el crecimiento en las placas. (Picazo, 2000).

Figura 4

Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y

Concentración Mínima Bactericida (CMB)



Fuente: SEM (2023)

3.4.3 Análisis estadístico

El análisis fitoquímico del extracto y aceite de hojas de achiote fue por triplicado ($n=3$) y expresado cualitativamente por número de cruces (+, ++, +++) donde la ausencia de metabolitos secundarios se denotó con un signo negativo (-) para lo cual se utilizó la moda como medida de tendencia central, siendo validada mediante el estadístico chi cuadrado; en cuanto a la disposición de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) ésta se hizo mediante un análisis de regresión y correlación lineal verificando los supuestos de normalidad, homogeneidad y autocorrelación del promedio de los porcentajes de crecimiento bacteriano para 18 ensayos (cada uno correspondiente a suspensiones de cepas de *E. coli* uropatógena con el extracto



etanólico o aceite esencial) que para CMI fueron de 10%, 25%, 50%, 75% y 100% y para CMB fue de 25%, 50%, 75% y 100% (Anexo 1).

Asimismo, la determinación de la susceptibilidad por difusión (Kirby Bauer) de *E. coli* frente a los extractos etanólicos y de aceite esencial de hojas de achiote (10%, 25%, 50%, 75% y 100%) y control positivo [gentamicina] fueron realizados mediante un diseño completamente randomizado con 6 tratamientos (diferentes concentraciones de extracto etanólico o aceite esencial con su control positivo) y 18 repeticiones (18 cepas de aislamientos de *E. coli* uropatógena) para lo cual se verificó los supuestos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov, $n > 50$) y homocedasticidad (prueba de Levene) que en caso se cumplió se realizó el análisis de varianza de Fisher y la prueba de comparaciones múltiples de T Student, y para el caso en que no se cumplió los supuestos estadísticos indicados se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn con un nivel de significancia de 5% mediante el programa R 4.3.3. (Hernández et al., 2014).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA CUALITATIVA DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO DE *Bixa orellana* L.

4.1.1 Análisis fitoquímico del aceite esencial de hojas de *Bixa orellana* L.

El rendimiento de aceite esencial a partir de hojas de achiote fue de 0.75% el cual presentó consistencia oleosa de color amarillento, olor sui generis con una densidad de 0.91 g/ml.

Comparado con el aceite esencial obtenido también de hojas de *Bixa orellana* L. por Valarezo et al. (Valarezo et al., 2023) que presentó una densidad de 0.89 g/ml, sería casi igual a lo hallado y concerniente al rendimiento menciona que se obtuvo 0.13% que es una cantidad mucho menor a la encontrada.

Tabla 5

*Análisis fitoquímico del aceite esencial de hojas de *Bixa orellana* L.*

Metabolito	Reacción	Resultado	Valoración Cualitativa				Valor p
			r ₁	r ₂	r ₃	Mo	
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado café rojizo	-	-	-		1,000
	Mayer	Precipitado amarillo palillo	+	-	+	+	0,606
	Wagner	Precipitado naranja oscuro	+	+	+		1,000
Fenoles	Cloruro Férrico 5%	Precipitado verde oscuro	+	-	+	+	0,606
Taninos	Cloruro de Sodio 5%	Precipitado a Crema	-	-	-	-	1,000

Fuente: Elaboración propia

Nota: + = leve , ++=abundante, +++=muy abundante, Mo=Moda, r₁...r₃= repeticiones; Valor p=Es la probabilidad correspondiente al valor de chi cuadrado calculado () que con grados de libertad (gl) igual a 2 y un nivel de significancia (α) de 0.05 permite rechazar la hipótesis nula si es menor a 0.05, el cual indica que hay diferencias estadísticas con respecto a los valores esperados



En la Tabla 5 se observa el análisis fitoquímico del aceite esencial de las hojas de achiote, que para el caso de la determinación de alcaloides, no se aprecia presencia de éstos con el reactivo de Dragendorff lo cual resulta unánime en las tres repeticiones realizadas ($p>0,05$) lo que indica que no hay alcaloides con aminas terciarias o secundarias, sin embargo, en la reacción de Mayer si se aprecia que en la mayoría de repeticiones ($p>0,05$) hay una leve presencia indicando que hay alcaloides de aminas primarias, confirmado por la reacción de Wagner ($p>0,05$) que para las 3 repeticiones realizadas hay una presencia leve de estos metabolitos, probablemente debido a la reacción más sensible del potasio con el nitrógeno del alcaloide y al precipitado complejo que se forma. Asimismo, según la reacción de cloruro férrico al 5% se aprecia una concentración leve de fenoles, ($p>0,05$) y según la reacción con cloruro de sodio al 5% no hay taninos ($p>0,05$).

Al respecto, resultados parcialmente similares corresponden al aceite esencial de *Mentha spicata* y *Mentha piperita* en la que hay alcaloides (+ [~Drangendorff]), algunos compuestos fenólicos (flavonoides [cromatografía de capa fina], pero no taninos [cloruro férrico-ferricianuro de potasio]), saponinas (+ [prueba de la burbuja]), esteroides (+ [reacción Liebrmann Burchard]) y glicósidos cardíacos (+ [prueba de glicósidos cardíacos]), sin presencia de terpenos (reacción de Liebrmann Burchard) indicando que alcaloides y flavonoides, actúan contra *E. coli* y otros microorganismos (Zaidi & Dahiya, 2015).

No obstante, otros estudios como el de Zakaria et al. (2020) sugieren que la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y tallos de *Origanum glandulosum* frente a *E. coli* ATCC 25922 está relacionada con compuestos terpénicos (timol, 58,4% [cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría



de masas, CG-EM]), lo mismo que es corroborado a nivel local por Balda (2024) quien reportó principalmente monoterpenos (tujona, 83% [CG-EM]) que participarían de la actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *S. aureus* e incluso tendría actividad antifúngica contra *C. albicans*, lo cual concuerda con la baja cantidad de fenoles y alcaloides encontrados aquí, junto a la ausencia de taninos.

De este modo, el mecanismo de acción antibacteriano para un aceite esencial que contiene terpenos es inhibiendo la síntesis de proteínas y ADN (labdano diterpeno) y alterando la membrana celular (monoterpeno bicíclico); concerniente a los polifenoles (éster de catequina) éstos inhiben a las proteínas que participan en la formación del septum, la segregación del ADN y la división celular, así como en la ruptura de la membrana y pared celular, y en la reducción de la actividad biosintética y metabólica. Y en cuanto a los alcaloides, éstos inhiben principalmente la biosíntesis de proteínas y alteran la estructura de la membrana y pared celular (ácido benzofenantridínico) (Álvarez et al., 2021).

4.1.2 Análisis fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L.

El análisis fitoquímico se realizó en el extracto etanólico al 100% de concentración, para la determinación de alcaloides, fenoles y taninos siendo valorada cualitativamente en una escala colorimétrica.

Tabla 6

Análisis fitoquímico del extracto etanólico al 100% de hojas de B. orellana L.

Metabolito	Reacción	Resultado	Valoración Cualitativa				Valor P
			r ₁	r ₂	r ₃	Mo	
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado café rojizo	++	++	+++		0.867
	Mayer	Precipitado amarillo palillo	+	+	+	+	1.000
	Wagner	Precipitado naranja oscuro	+	++	+		0.779
Fenoles	Cloruro Férrico 5%	Precipitado verde oscuro	+++	+++	+++	+++	1.000
Taninos	Cloruro de Sodio 5%	Precipitado crema	++	++	++	++	1.000

Fuente: Elaboración propia

Nota: += leve, +=abundante, +++=muy abundante, Mo, Moda, r₁...r₃= repeticiones; Valor p=Es la probabilidad correspondiente al valor de chi cuadrado calculado (χ²) que con grados de libertad (gl) igual a 2 y un nivel de significancia (α) de 0.05 permite rechazar la hipótesis nula si es menor a 0.05, el cual indica que hay diferencias estadísticas con respecto a los valores esperados

En la Tabla 6 se observa el análisis fitoquímico del aceite esencial de las hojas de achiote, que para el caso de la determinación de alcaloides, se aprecia presencia con el reactivo de Dragendorff de manera abundante en las repeticiones realizadas ($p > 0,05$) indicando que si hay alcaloides con aminas terciarias o secundarias, sin embargo, en la reacción de Mayer si se aprecia que en la mayoría de repeticiones ($p > 0,05$) hay una leve presencia indicando que hay alcaloides de aminas primarias, confirmado por la reacción de Wagner ($p > 0,05$) que para las 3 repeticiones realizadas en dos hay una presencia leve de estos metabolitos y en uno hay presencia de manera abundante, probablemente debido a la reacción más sensible del potasio con el nitrógeno del alcaloide y al precipitado complejo que se forma. Asimismo, según la reacción de cloruro férrico al 5% se aprecia una concentración muy abundante de fenoles ($p > 0,05$), y según la reacción con cloruro de sodio al 5% hay presencia abundante de taninos ($p > 0,05$).

Al respecto, resultados parcialmente similares fueron presentados por Mora et al. (2021), al evaluar la actividad antimicrobiana de extracto de semillas



Leucaena esculenta y *Leucaena leucocephala* donde se asegura que a través de pruebas colorimétricas hay presencia de alcaloides (reacción de Dragendorff y Mayer), taninos (reacción con gelatina), triterpenos, esteroides (prueba de Lieberman-Buchard), monoterpenos (prueba de la vainilina), saponinas (prueba de espuma) y compuestos fenólicos (cloruro férrico), los cuales tienen potencial antimicrobiano.

Al respecto, Troncoso (2014), también encontró que los metabolitos secundarios que intervienen en la actividad antibacteriana son los flavonoides (reacción de Shinoda) y taninos (reacción con gelatina). Asimismo, Gadisa y Tadesse (2021) hallaron una proporción similar de metabolitos (determinado por reacciones cualitativas tradicionales modificadas), como alcaloides (+++), fenoles (+++) y taninos (++) para extracto metanólico de hojas de *C. englerianum* además de flavonoides (+++), glicósidos cardíacos (++) , saponinas (+), terpenoides (+) y antraquinonas (+), algo parecido se determinó para el extracto metanólico de hojas de *L. adoensis* que también tiene alcaloides (+++), fenoles (+) y taninos (+), mientras que para el extracto metanólico de hojas de *D. penninervium* si se tendría alcaloides (+++) y taninos (+) mas no fenoles.

A nivel local, Mamani (2023) encontró en extracto etanólico de hojas y tallos de *Cybastax antisiphilitica* para *E. coli* uropatógena de gestantes la presencia de alcaloides (++) [reacción de Wagner], taninos (++) [reacción de cloruro de sodio] y fenoles (+++) [reacción de cloruro férrico] similar a lo reportado aquí, aunque en una menor cantidad los alcaloides.

Y lo encontrado coincide con la naturaleza de los alcaloides de los que se indican están presentes en casi 300 familias de plantas y de las cuales habrían más



de 18000 tipos, con alta actividad antibacteriana frente a Gram positivos (*S. aureus* MRSA) y Gram negativos (*E. coli*, *H. pylori*) entre los cuales estarían la aptamina, indol, indolizidina, isoquinolina, piperazina, quinolina, quinolona, agelasina y las poliaminas; presentando diferentes mecanismos de acción entre los cuales están la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (pergularinina y tiloforinidina) al inhibir a la dihidrofolato reductasa o la topoisomerasa I (ungeremina isoquinolina phenantridina), también pueden alterar el ciclo celular (isoquinolinas de protoberberina), actuar como inhibidores respiratorios, en la despolarización de la membrana citoplasmática (esqualamina) y por la sobreproducción de la bomba de eflujo (Cushnie et al., 2014).

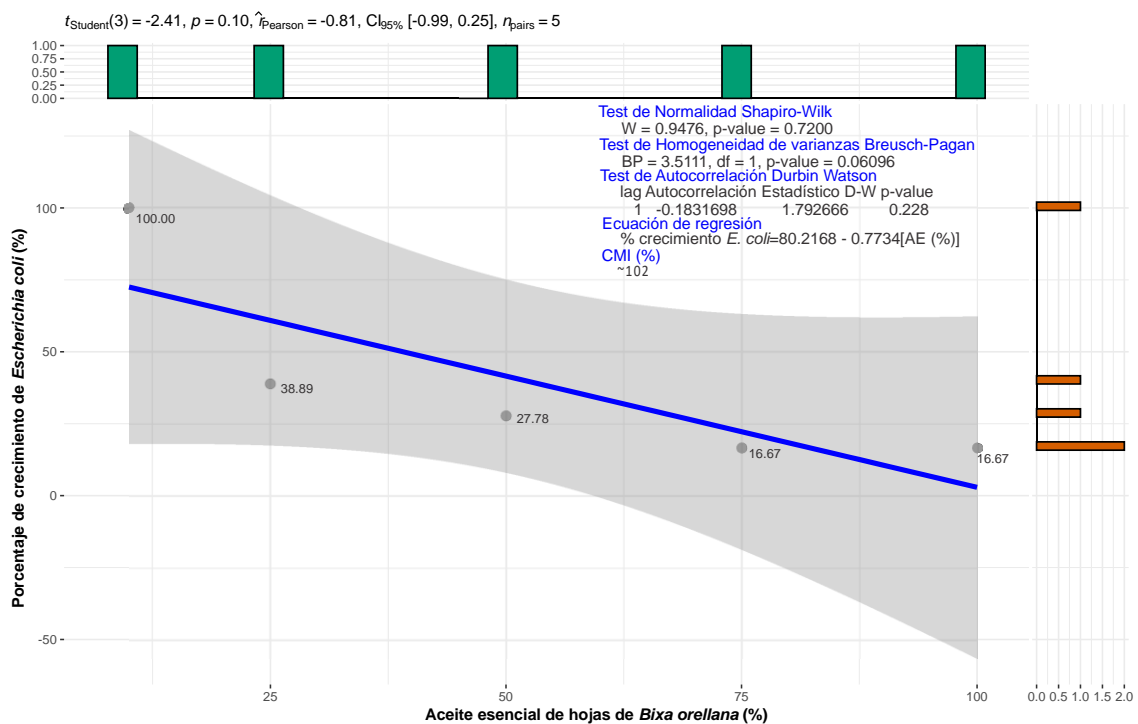
De igual modo, aquí se encontró una buena presencia de fenoles, grupo de metabolitos que comprende a los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y taninos, que pueden inhibir el crecimiento y la actividad de muchos microorganismos mediante la permeabilización y desestabilización de la membrana plasmática o la inhibición de enzimas extracelulares difiriendo de los mecanismos de acción de los antibióticos tradicionales, haciendo que sean eficaces contra los patógenos resistentes a los medicamentos; al parecer pueden suprimir varios factores de virulencia microbiana (por ejemplo, mediante la inhibición de la formación de biopelículas, la reducción de la adhesión del ligando del huésped y la neutralización de toxinas bacterianas), reducen la fluidez de la membrana, inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y la pared celular o el metabolismo energético. Además, mostrarían sinergia con los antibióticos, mejorando su eficacia, reduciendo la dosis de uso en la que la presencia y el número de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos es también responsable de sus propiedades antioxidantes, y los cambios en la posición del grupo hidroxilo

podrían desempeñar un papel importante en la actividad antimicrobiana y las interacciones con las estructuras de la membrana celular (Takó et al., 2020).

4.2 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA, CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA Y SUSCEPTIBILIDAD DE *Escherichia coli* FRENTE AL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Bixa orellana L.*

Figura 5

Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria para el aceite esencial de hojas de *Bixa orellana L.* frente a *Escherichia coli*



Fuente: Programa R Versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) -- "Angel Food Cake" Copyright (C) 2024 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Nota: $\rho_{Pearson}$ = estimador de la correlación, n_{pairs} = número par de elementos, p = probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), $\mu\text{l/ml}$ = microlitros por ml, $CI_{95\%}$ = Intervalo de Confianza al 95%, df = grados de libertad, CMI = Concentración Mínima Inhibitoria



En la Figura 5 y Anexo 1, se observa que a 10% de AE de hojas de achiote el porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli* es del 100% (18 cepas), el cual va disminuyendo con 25% de AE siendo de 38,89% (7 cepas), al 50% de AE de 27,78% (5 cepas) y al 75% y 100% de AE de 16,67% (3 cepas).

Asimismo, se presenta mediante un análisis de correlación lineal, que existe una buena correlación inversa ($r=-0,81$) siendo el valor de CMI igual a 102 % (1020 $\mu\text{l/ml}$), lo que demuestra que a mayor concentración de aceite esencial hubo mayor actividad antibacteriana.

Al respecto estudios en aceite esencial de hojas y tallos de achiwa (*Cybistax antisiphilitica*) señalan un CMI al 100% con inhibición del 40% del crecimiento de *E. coli* uropatógena (Mamani, 2023), lo que resulta ser menor a lo encontrado aquí.

A diferencia de lo reportado, hay estudios como el de Zakaria et al. (2020) que indican que el aceite esencial de *Origanum glandulosun* es muy complejo (37 compuestos), que incluye principalmente terpenos, el cual tiene un CMI de 1 mg/ml, valor que es similar a lo hallado aquí.

En otro estudio, Argote et al. (2017) encontraron para aceite esencial de *Citrus limon* (limoneno, 58.17%), *Citrus reticulata* (limoneno, 70.88%) y de *Eucaliptus spp.* (eucaliptol, 58%) un CMI de 13.2, 13.2 y 14.6 $\mu\text{l/ml}$ respectivamente, lo que demuestra una alta actividad antibacteriana frente a *E. coli*, superior a lo encontrado aquí para *B. orellana*.

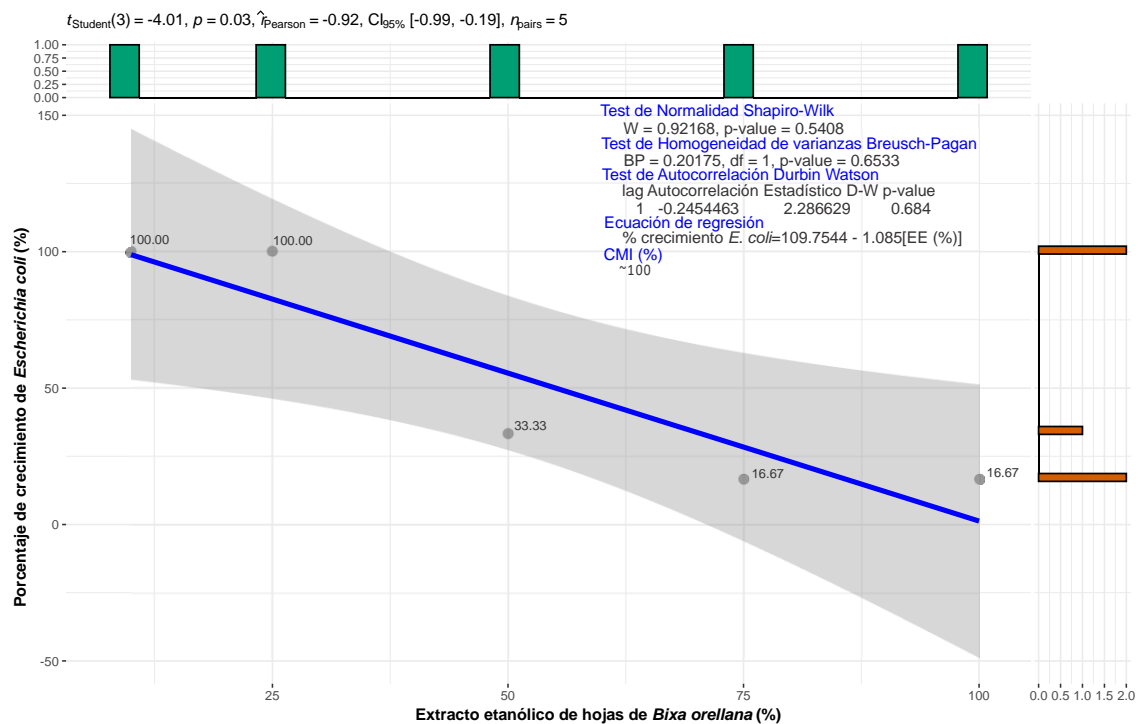
Recientemente, en una investigación ecuatoriana sobre el AE de *Bixa orellana* L. Valarezo et al. (2023) determinaron la presencia de germacreno ($17,87 \pm 1,20\%$), biciclogermacreno ($14,27 \pm 0,97\%$), cariofileno ($8,56 \pm 1,24\%$) y α -pineno ($6,34 \pm 0,13\%$) en la que el CMI $>4000 \mu\text{g/ml}$ señala actividad antibacteriana inferior a lo hallado

aquí, lo que indica que la composición fitoquímica puede variar por factores intrínsecos (zona anatómica, edad, estado fenológico) y extrínsecos (tipo de suelo, sombra, precipitación) de la planta además de la presencia de quiralidad que estaría involucrado en las propiedades bioactivas.

Asimismo, algunos metabolitos antibacterianos en las hojas de achiote incluirían al geranilgeraniol que regula negativamente la implicancia de la caspasa 1 en la respuesta Th1, además de la procianidina B2, procianidina B3 y el ácido elágico desoxihexosa (Moraes et al., 2020).

Figura 6

Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria para el extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. frente a *Escherichia coli*



Fuente: Programa R Versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) -- "Angel Food Cake" Copyright (C) 2024 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Nota: $r_{Pearson}$ = estimador de la correlación, n_{pairs} = número promedio par de elementos, p =probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), μ l/ml=microlitros por ml, CI95%=Intervalo de Confianza al 95%, df = grados de libertad, CMI=Concentración Mínima Inhibitoria



En la Figura 6 y Anexo 1, se observa que a 10% y 25% de EE de hojas de achiote el porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli* es del 100% (18 cepas), el cual va disminuyendo con 50% de AE siendo de 33,33% (6 cepas) y al 75% y 100% de AE de 16,67% (3 cepas).

También, se presenta a través de un análisis de correlación lineal, que existe una buena correlación inversa ($r=-0,92$) siendo el valor de CMI igual a 100 % (1000 μ l/ml), lo que demuestra que a mayor concentración de extracto etanólico hubo mayor actividad antibacteriana.

Al respecto, Gadisa y Tadesse (2021) encontraron un CMI frente a *E. coli* ATCC 25922 muy buenos, siendo para extracto metanólico de hoja de *C. englerianum* igual a 64 μ g/ml, corteza de *E. depauperata* 128 μ g/ml, hojas de *L. adoensis* 64 μ g/ml, hoja de *D. penninervium* 16 μ g/ml, raíz de *R. abyssinicus* 128 μ g/ml y raíz de *C. pustulatus* 128 μ g/ml.

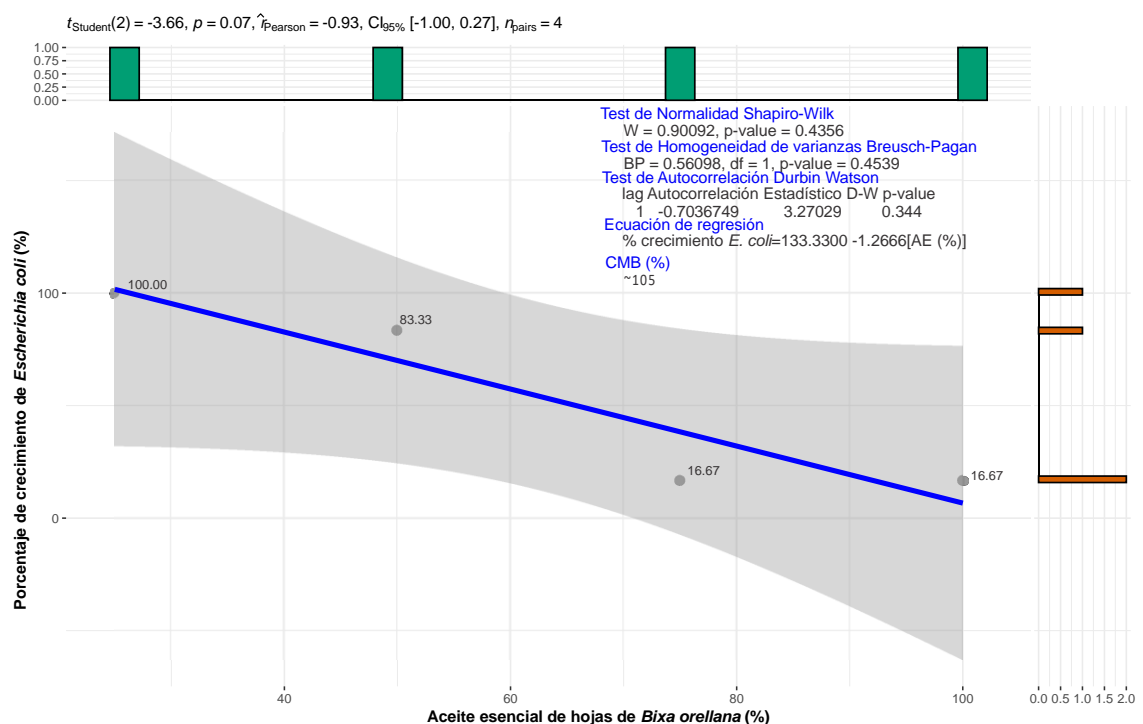
Asimismo, en un estudio local desarrollado por Mamani (2023) se reportó para el extracto etanólico de hojas y tallos de achiwa (*Cybistax antisyphilitica*) un CMI al 100% con 85% de inhibición del crecimiento de *E. coli* uropatógena, lo que representa una inhibición menor a lo estimado aquí.

Al parecer, Fleischer et al. (2003) trabajando con *Bixa orellana* de la zona de Ghana encontraron presencia de fenoles (+), pero a diferencia del presente trabajo no reportaron alcaloides, no obstante encontraron que el extracto etanólico de las hojas tiene actividad antibacteriana (10000 μ g/ml) frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, es decir que ejerce un efecto inferior a lo indicado aquí.

De igual modo, Gómez et al. (2012) encontraron actividad antibacteriana del EE de *B. orellana* recolectada en Colombia, frente a *Escherichia coli* a 512 ppm ($\mu\text{g/ml}$), lo que representa un resultado mejor a lo mostrado aquí y sugiere que los flavonoides, sesquiterpenos, taninos, alcaloides y esteroides presentes pueden estar involucrados, así los flavonoides pueden formar un complejo entre las proteínas extracelulares y la pared celular bacteriana, además del hecho que los metabolitos vegetales mencionados pueden sinergizar para desarrollar un mayor efecto antibacteriano.

Figura 7

Análisis de la Concentración Mínima Bactericida para el aceite esencial de hojas de Bixa orellana L. frente a Escherichia coli.



Fuente: Programa R Versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) -- "Angel Food Cake" Copyright (C) 2024 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Nota: r_{Pearson} = estimador de la correlación, n_{pairs} = número promedio par de elementos, p =probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), $\mu\text{l/ml}$ =microlitros por ml, $\text{CI}_{95\%}$ =Intervalo de Confianza al 95%, df = grados de libertad, CMB=Concentración Mínima Bactericida



En la Figura 7 y Anexo 1, se observa que a 25% de AE de hojas de achioté el porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli* es del 100% (18 cepas), el cual va disminuyendo con 50% de AE siendo de 83,33% (15 cepas) y al 75% y 100% de AE de 16,67% (3 cepas).

Del mismo modo, se encontró a través del análisis de correlación lineal, que existe una buena correlación inversa ($r=-0,93$) siendo el valor de CMB igual a 105 % (1050 $\mu\text{l/ml}$), lo que demuestra que a mayor concentración de aceite esencial hubo mayor actividad antibacteriana.

Al respecto, Zakaria et al. (2020) indican que el aceite esencial de *O. glandulosun* es muy complejo (37 compuestos), siendo los terpenos, los principales compuestos, presentando un CMB de 1 mg/ml, lo que representa una actividad antibacteriana casi similar a lo aquí encontrado.

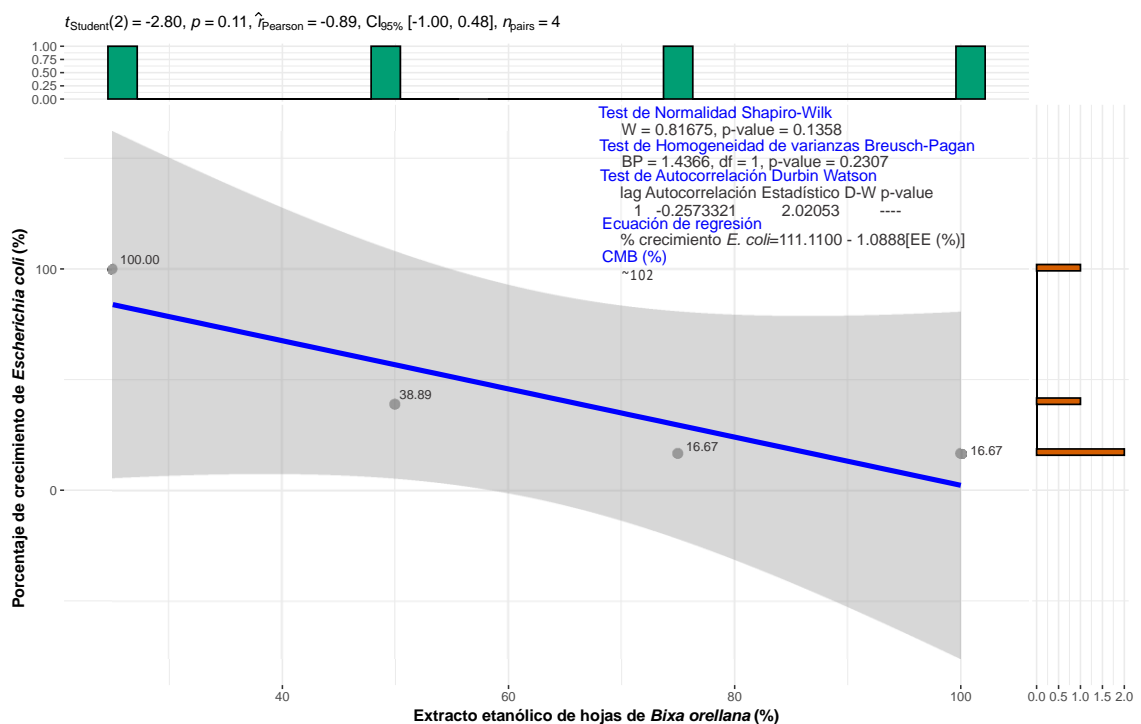
En otro estudio, Argote et al. (2017) encontraron para aceite esencial de *Citrus limon* (limoneno, 58.17%), *Citrus reticulata* (limoneno, 70.88%) y de *Eucaliptus spp.* (eucaliptol, 58%) un CMB de 13.2, 13.2 y 14.6 $\mu\text{l/ml}$ respectivamente, lo que demuestra que tiene una alta actividad bactericida frente a *E. coli*, superior a lo encontrado aquí para *B. orellana*. De otro lado, Oulkheir et al. (2017) determinaron para *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum cassia* un CMB de 10, 5 y 5 mg/ml, respectivamente, indicando ser plantas con menor actividad antibacteriana que la presente.

Asimismo, comparado con el estudio de Valarezo et al. (2023) que obtuvo un CMB > 4000 $\mu\text{l/ml}$ para aceite esencial de *Bixa orellana L.* frente a *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888), la actividad antibacteriana encontrada para la *Bixa orellana L.* en este estudio es ~4 veces mejor.

Como se aprecia es a 1050 $\mu\text{l/ml}$ de aceite esencial de *Bixa orellana* L. que existe actividad bactericida que según Valarezo et al. (2023) indican que el aceite esencial de esta especie tendría 56 compuestos correspondiente a hidrocarburos monoterpénicos, hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados los que participarían por ejemplo en la inhibición de la bomba de eflujo bacteriana (Dias et al., 2022).

Figura 8

*Análisis de la Concentración Mínima Bactericida para el extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. frente a *Escherichia coli**



Fuente: Programa R Versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) -- "Angel Food Cake" Copyright (C) 2024 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Nota: Pearson = estimador de la correlación, n_{pairs} = número par de elementos, p = probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0.05 (significativo), $\mu\text{l/ml}$ = microlitros por ml, $CI_{95\%}$ = Intervalo de Confianza al 95%, df = grados de libertad, CMB = Concentración Mínima Bactericida

En la Figura 8 y Anexo 1, se observa que a 25% de AE de hojas de achote el porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli* es del 100% (18 cepas), el cual va



disminuyendo con 50% de AE siendo de 38,89% (7 cepas) y al 75% y 100% de AE de 16,67% (3 cepas).

De igual manera, mediante análisis de correlación lineal, se aprecia que hay una buena correlación inversa ($r=-0,89$) siendo el valor de CMB igual a 102 % (1020 μ l/ml), lo que demuestra que a mayor concentración de extracto etanólico hubo mayor actividad antibacteriana.

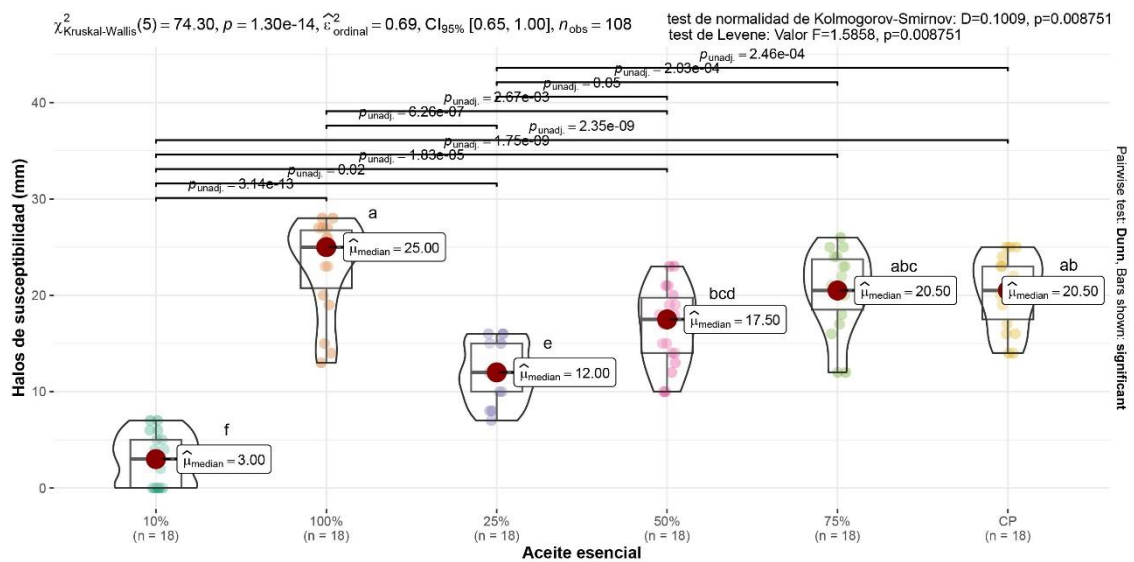
Al respecto, Gadisa y Tadesse (2021) encontraron un CMB frente a *E. coli* ATCC 25922 mucho mejores que el de este estudio, siendo para extracto metanólico de hoja de *C. englerianum* igual a 128 μ g/ml, corteza de *E. depauperata* 128 μ g/ml, hojas de *L. adoensis* 64 μ g/ml, hoja de *D. penninervium* 16 μ g/ml, raíz de *R. abyssinicus* 64 μ g/ml y raíz de *C. pustulatus* 64 μ g/ml.

Asimismo, Al-Qudah (2022) determinó que había mayor actividad bactericida en flores (CMB, 0.156 mg/ml) seguido de hojas (CMB 5.00 mg/ml) y tallos (10.00 mg/ml), lo que indica que la zona anatómica no presenta los mismos compuestos lo que influye en la actividad presentada frente a *E. coli*. Comparado con esto en el presente trabajo se obtuvo mejores resultados que el extracto de hojas y tallos, pero no frente al extracto de flores.

Al parecer debido a que la membrana plasmática bacteriana es lipofílica el extracto etanólico de hojas de achiote puede difundir y alterar la fisiología bacteriana, siendo la parte orgánica del extracto etanólico la que contiene alcaloides que promoverían la actividad antibacteriana que a mayor concentración de extracto etanólico existiría mayor efecto frente a *E. coli* (Moraes et al., 2020; Prathima et al., 2016; Shilpi et al., 2006).

Figura 9

Análisis de varianza de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn correspondiente a la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de Bixa orellana L. por el método de difusión Kirby Bauer



Fuente: Programa R Versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) -- "Angel Food Cake" Copyright (C) 2024 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Nota: CP=Control positivo (gentamicina), a...f=Letras de significancia en orden de importancia del tratamiento aplicado resultado de la prueba de comparaciones múltiples, median = estimador de la mediana, n = número de unidades experimentales, χ^2 =estadístico de Kruskal Wallis, ordinal =rango épsilon al cuadrado, p=probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), %=porcentaje, CI_{95%}=Intervalo de Confianza al 95%

En la Figura 9 y Anexo 2, previa verificación de supuestos, en la que no hubo normalidad ($p < 0,05$), ni homocedasticidad ($p < 0,05$) se encontró que el aceite esencial de hojas de *Bixa orellana L.* ejercía actividad antibacteriana significativa frente a *E. coli* (74.30; $p = 1.30 \times 10^{-14}$), y donde el 69% (ordinal =0.69, IC₉₅ 0.65-1.00) del efecto del tratamiento explica la inhibición microbiana. Asimismo, a través de la prueba de Dunn se halló que existe efecto significativo del 100% de AE de hojas de *Bixa orellana L.* (25 mm)^a, la gentamicina (20.50 mm)^{ab} y 75% de AE de *Bixa orellana L.* (20.50 mm)^{abc} en la inhibición del crecimiento de *E. coli*.



A nivel local, Balda (2024) encontró un halo de susceptibilidad para *E. coli* de 15.28 mm a 400 µl/ml de aceite esencial de *T. vulgare*, el que es inferior al halo encontrado (25.00 mm) para 100% (1000 µl/ml) de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, aunque para impregnar los discos utilizados aquí se empleó el doble de volumen.

Comparado con el halo de susceptibilidad de 30 mm al 100 % para aceite esencial de *Calendula officinalis* (Ruíz et al., 2023), la que se reporta aquí para la misma concentración es menor. Asimismo, Pajohi et al. (2022) hallaron un halo de hasta 36.5 mm para 100% de aceite esencial de *Zataria multiflora* lo que es mejor a lo reportado aquí, sin embargo los aceites esenciales de *Mentha longifolia* y de *Cuminum cyminum* al 100% presentaron halos de susceptibilidad de 14.7 y 13.5 mm respectivamente que fueron inferiores al nuestro.

Del mismo modo, Pîrliţeanu et al. (2020) han encontrado mejores halos de susceptibilidad como el de *Origanum vulgare* (34 mm), *Thymus serpyllum* (32 mm) y *Thymus vulgaris* (27 mm) frente a *E. coli* que lo reportado aquí, sin embargo *Melaleuca alternifolia* (22 mm), *Syzygium aromaticum* (21 mm), *Cinnamomum spp.* (17 mm), *Mentha x piperita* (15 mm), *Rosmarinus officinalis* (25 mm), *Ocimum basilicum* (15 mm), *Lavandula angustifolia* (10 mm), *Salvia officinalis* (9 mm), *Foeniculum vulgare* (9 mm), *Cuminum cyminum* (9 mm), *Anethum graveolens* (9 mm), *Nigella sativa* (7 mm), *Pogostemon cablin* (0 mm), *Citrus x paradisi* (8 mm), *Verbena officinalis L.* (8 mm) y *Pelargonium graveolens* (7 mm) tuvieron menor efecto que lo encontrado en este estudio.

Y según Babu et al. (2011) señala que de acuerdo a la clasificación de los aceites esenciales por el diámetro de la zona de inhibición, el halo de 25 mm para 100% de aceite esencial de *Bixa orellana L.* reportado aquí estaría considerado como un aceite que ejerce extrema sensibilidad antibacteriana (>20 mm). Y compuestos como el ácido elálgico que

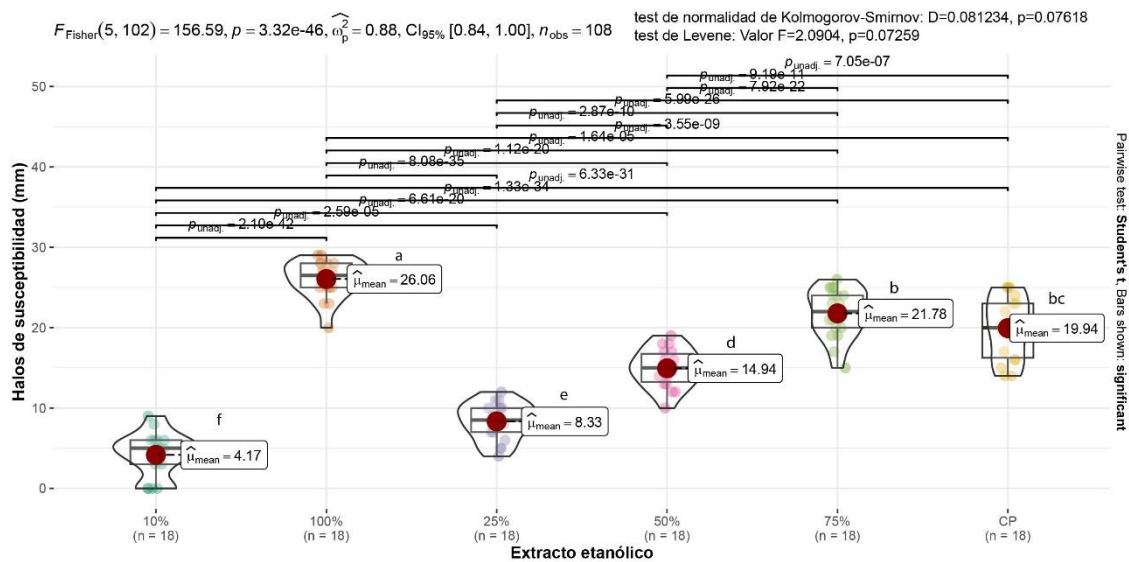


se obtiene en solventes más orgánicos tiene actividad antibacteriana ejerciendo su acción como inhibidor de la ADN ligasa, la ADN polimerasa 1 y de la síntesis de la pared celular (Moraes et al., 2020).

Queda demostrado que el AE de *Bixa orellana* L (100%, 75%) tiene igual o mejor actividad antibacteriana que la gentamicina ($p < 0,05$), lo que indica que el aceite esencial que tiene terpenos y sesquiterpenos, sobre todo monoterpenos oxigenados ejerce un mejor mecanismo antibacteriano que la gentamicina (inhibidor de la síntesis de proteínas en la subunidad ribosomal 30S), lo que podría atribuirse a que los terpenos tienen un núcleo aromático con un grupo funcional polar que ejercería tal actividad, así se ha propuesto que pueden romper la membrana celular bacteriana alterando la función de los canales iónicos (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^-) incrementando la permeabilidad celular y la pérdida de contenido celular, asimismo los grupos hidroxilo terpénicos serían altamente reactivos formando puentes de hidrógeno inactivando algunas enzimas blanco (Guimarães et al., 2019).

Figura 10

Análisis de varianza de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de T Student correspondiente a la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de B. orellana L por el método de difusión Kirby Bauer



Fuente: Programa R Versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) -- "Angel Food Cake" Copyright (C) 2024 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)
Nota: CP=Control positivo (gentamicina), a...f= Letras de significancia en orden de importancia del tratamiento aplicado resultado de la prueba de comparaciones múltiples, mean = estimador de la media, n = número de unidades experimentales, F_{Fisher} =estadístico de F de Fisher, omega parcial al cuadrado, p=probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), %=porcentaje, $CI_{95\%}$ =Intervalo de Confianza al 95%

En la Figura 10 y Anexo 2, una vez verificado los criterios de normalidad ($p > 0,05$) y homocedasticidad ($p > 0,05$) se encontró que existen diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos ($F_{Fisher}=156.59$; $p=3.32 \times 10^{-46}$) además que el 88% ($\omega_p^2=0.88$, $IC_{95} 0.84-1.00$) del efecto del tratamiento explica la susceptibilidad bacteriana. Y en la que mediante la prueba de T Student se halló actividad significativa del EE al 100% seguido del de 75% sobre la inhibición del crecimiento de *E. coli* comparado con el control positivo (gentamicina). Asimismo, a través de la prueba de Dunn se halló que existe efecto significativo del AE al 100% de hojas de *Bixa orellana*



L. (26.06 mm)^a, 75% de AE de *Bixa orellana* L. (21.78 mm)^b y la gentamicina (19.94 mm)^{bc} en la inhibición del crecimiento de *E. coli*.

Al respecto, Gadisa & Tadesse (2021) encontraron actividad antibacteriana a 100 mg/ml (30µl/disco) que es una concentración mayor a la utilizada en este estudio (100%, 1000 µl/ml), frente a *E. coli* ATCC 25922 donde los halos de inhibición para extracto metanólico de hoja de *C. englerianum* fue de 20±0.7 mm, para corteza de *E. depauperata* 13±0.1 mm, hojas de *L. adoensis* 21±2.1 mm, raíz de *R. abyssinicus* 10±0.8 mm, raíz de *C. pustulatus* 23±0.4 mm, sin embargo hubo un efecto parecido al de hojas de *D. penninervium* (25±0.8 mm).

Comparado con el estudio de Muchtaromah et al. (2020) que evaluaron el efecto del extracto etanólico de *Curcuma manga* frente a *E. coli* encontraron un efecto menor (8.06 mm) que lo informado aquí. De igual forma, el extracto etanólico de hojas de *Ocimum basilicum* a 500 mg/ml llegó a generar un halo de sensibilidad de 13.70 mm (Lubis et al., 2022), lo que indica que también tiene poco efecto en relación al extracto etanólico de achiote utilizado.

Queda demostrado que el EE de hojas de *Bixa orellana* L. tiene mejor actividad antibacteriana que la gentamicina ($p < 0.05$), lo que indicaría que los alcaloides, fenoles y taninos tienen mejor mecanismo de acción antibacteriano. La actividad de los alcaloides recaería probablemente en un mecanismo parecido a la inhibición de la síntesis proteica, y su interferencia con la replicación del ADN, la transcripción del ARN, la alteración de la membrana celular (fuga de electrolitos, la fuerza motriz de protones, la bomba proteica de eflujo de fármacos), la supresión del metabolismo glucosídico estimulando un exceso de producción de radicales libres y regula positivamente la expresión de caspasa-1p 10 e IL-1 β en macrófagos que fagocitan *E. coli*, lo que activa la vía MAP kinasa (Yan et al.,



2021). De igual modo los fenoles alterarían la membrana celular, actividad enzimática y la rigidez de la pared celular (Bouarab et al., 2019); mientras que los taninos inhibirían enzimas extracelulares y la fosforilación oxidativa (Scalbert, 1991)



V. CONCLUSIONES

- El análisis de la composición fitoquímica del aceite esencial (AE) de hojas de *Bixa Orellana L.* reveló la presencia leve de alcaloides (+) y fenoles (+); mientras que en el extracto etanólico (EE) se determinó especialmente la presencia de fenoles (+++), seguido de taninos (++) y alcaloides (+).
- Concerniente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el AE esta fue de 102 % y para el EE de 100 %, mientras que para la concentración mínima bactericida (CMB) del AE fue de 105% y para el EE de 102% sobre *E. coli*. Asimismo, en cuanto a los halos de susceptibilidad se determinó que el AE al 100%^a (25 mm) y el EE al 100%^a (26.06 mm) y 75%^b (21.78 mm) ejercen actividad antibacteriana significativa.
- La diferencia en la presencia de metabolitos como los taninos en el EE de hojas vs el AE de hojas de *Bixa Orellana L.* indicaría que estos compuestos mejoran la actividad antibacteriana en el EE frente a diferentes cepas de *E. coli*.



VI. RECOMENDACIONES

- Comparar diferentes solventes orgánicos en la extracción de metabolitos secundarios incluido el del extracto etanólico de hojas de *Bixa. Orellana L.*
- Caracterizar el aceite esencial de hojas de *Bixa. Orellana L.* mediante cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas, para determinar los principios activos involucrados en la actividad antibacteriana frente a *E. coli.*
- Comparar el efecto antibacteriano del extracto de hojas de *Bixa. Orellana L.* con la de otras zonas anatómicas de la misma planta para el ecotipo con el que se ha desarrollado la presente investigación.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Aguilar, D. I. (2019). *Determinación de actividades biológicas y tamiz fitoquímico de Bixa orellana L de la Península de Yucatán* [Universidad de Sonora]. <http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/2153/1/aguilargonzalezdoloresiselal.pdf>
- Al-Qudah, M. M. A. (2022). Antibacterial effect of *Asphodelus fistulosus* aqueous and ethanolic crude extracts on gram positive and gram negative bacteria. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e260029. <https://www.scielo.br/j/bjb/a/YyGFz6mpS5yWZfsXCxH8Vhx/?lang=en>
- Alí, S. Y., Acebey Aramayo, S. M., Alvarez Máceres, D. A., Condori Choquehuanca, A., Huari Ibarra, C., & Huaycho Parisaca, A. (2019). Inhibición de *Staphylococcus Aureus* mediante la Actividad Antibacteriana de Plantas Medicinales Bolivianas. *Scientífica*, 7(1), 29–32. https://web.archive.org/web/20180410153919id_/http://scientifica.umsa.bo/c/document_library/get_file?uuid=6b0724f1-e346-4068-8ff1-ca03a78db9e6&groupId=1619613813
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., & Lightfoot, D. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Alva, I. A. (2018). *Efecto antibacteriano del extracto etanólico de capsicum chinense (ají panca) sobre escherichia coli uropatógena*. Universidad Privada Antenor Orrego - UPAO. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2906562>
- Álvarez, F. J., Barrajón, E., Herranz, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>



- Argote, F. E., Suarez, Z. J., Tobar, M. E., Perez, J. Á., Hurtado, A., & Delgado, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(SPE2), 52–60.
- Arias, F. G. (2012). *El Proyecto de Investigación, Introducción a la metodología científica* (2nd ed.). Episteme. <https://ebevidencia.com/wp-content/uploads/2014/12/EL-PROYECTO-DE-INVESTIGACIÓN-6ta-Ed.-FIDIAS-G.-ARIAS.pdf>
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Ávalos, A., & Urría, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119–145. <https://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798/814>
- Babu, A., Sundari, A., Janagam, I., Srujan, R. V. N., & Mannem, S. (2011). Study on the antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of essential oils of spices. *Veterinary World*, 4, 311–316. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2011.311-316>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- BD. (2013). *BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar*. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
- Borboa, J., Rueda-Puente, E. O., Acedo-Félix, E., Ponce, J. F., Cruz-Villegas, M., García-Hernández, J. L., & Ortega-Nieblas, M. M. (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(3), 539–



547. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93915170014.pdf>

- Bouarab, L., Forquet, V., Lanteri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Bordes, C. (2019). Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>
- Britania. (2012). *Lisina Hierro Agar*. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e85d48c47.pdf
- Britania. (2019). *Caldo Urea*. <https://pagina-web-enfocada-en-la-realizacion-de-coprocultivo-e-identif.webnode.mx/l/caldo-urea/>
- Calderon, M. D., Armas, P. I., Brito, J. S., & Chamba, V. J. (2023). Eficacia de una intervención administrativa sobre los procesos de preparación del agar Mueller Hinton en dos hospitales públicos del Ecuador. In *Ciencia Digital* (Vol. 7, Issue 2). <https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v7i2.2539>
- Campos, F. D. (2004). *Efecto del fotoperíodo sobre la síntesis de alcaloides en cultivos de brotes de Catharanthus roseus* [Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C]. https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1320/1/PCBP_M_Tesis_2004_Freddy_Campos_Tamayo.pdf
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T., & Miller, S. (2016). Microbiología Médica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Casado, I. (2018). Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en Corriente de Vapor. In *Universidad Politécnica de Madrid* (Vol. 1).
- Cauna, P. Y., & Coronado, G. I. (2018). *Actividad antibacteriana in vitro de extractos hidroalcohólicos de Plantago major (Llanten) Y Rumex crispus (Lengua de vaca) sobre cepas ATCC de Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa–Puno 2017*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Cevallos, A., & Pinos, G. (2017). *Incidencia de infecciones de las vías urinarias en gestantes de un Centro de Salud Público de Guayaquil*.



- Cipra, I. M. (2018). *Eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de plantago mayor al 50% sobre escherichia coli enteropatógena*. Universidad Privada Antenor Orrego - UPAO. https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12759/4090/REP_MED.HUMA_INGRI.CIPRA_EFICACIA.ANTIBACTERIANA.INVITRO.EXTRAC TO.ETANÓLICO.PLANTAGO.MAJOR.50%25ESCHERICHIACOLI.ENTERO PATÓGENA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Condori, R. E. (2002). *Sistemática de fanerogámas*. Universidad Nacional del Aaltiplano.
- Corrales, L. C., & Caycedo, L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Principios físicoquímicos de los colorantes. *Nova*, 18(33). <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Corzo, D. C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(3), 81–86. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57928310009.pdf>
- Costa, D. A., Rodrigues, W., Humberto Silva, G., Santos Lopes, L., & Lizarazo Jaimes, E. H. (2019). Aplicación y efecto antioxidante del ácido gálico sobre la calidad de semillas de trigo. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(1), 22–29. <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/17015>
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>
- Decraene, L. P. R. (1989). Floral development of *Cochlospermum tinctorium* and *Bixa orellana* with special emphasis on the androecium. *American Journal of Botany*, 76(9), 1344–1359. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1989.tb15114.x>
- Dias, K. J. S. D. O., Miranda, G. M., Bessa, J. R., Araújo, A. C. J. De, Freitas, P. R., Almeida, R. S. De, Paulo, C. L. R., Neto, J. B. D. A., Coutinho, H. D. M., & Ribeiro-Filho, J. (2022). Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.953982>



- Fleischer, T. ., Ameade, E. P. ., Mensah, M. L. ., & Sawyer, I. . (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74(1–2), 136–138. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00289-7)
- Flores, F. M. (2024). *Aislamiento, caracterización fitoquímica de compuestos volátiles y actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tanacetum vulgare L frente a Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Candida albicans multidrogoresistentes* [Universidad Nacional del Altiplano]. http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/21420/Flores_Balda_Fanny_Magali.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Flores, L. A., Robledo, A., & Jimarez, M. J. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6), 1315–1328. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000601315
- Forero-Saldarriaga, S., Puerta Rojas, J. D., & Correa-Parra, L. (2020). Interpretación de las pruebas de función tiroidea. *Medicina y Laboratorio*, 24(2), 93–109. <https://doi.org/10.36384/01232576.209>
- Gadisa, E., & Tadesse, E. (2021). Antimicrobial activity of medicinal plants used for urinary tract infections in pastoralist community in Ethiopia. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03249-7>
- Gallegos, de J., & Gallegos, C. (2020). *Análisis de la variación somaclonal de plantas micropropagadas de achiote (Bixa orellana L.)*. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- García, P., & Mendoza, A. (2014). Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 48(2), 249–254. <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v48n2/v48n2a11.pdf>
- Gómez, G. C., Castillo, J. C. Q., Pérez, J. C. A., & Montoya, J. E. Z. (2012). Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: a potential natural food preservative. *Interciencia*, 37(7), 547–551. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33925376010.pdf>



- Gonzales, C. M., & Hoyos, L. G. (2019). *Actividad antioxidante y determinación de compuestos fenólicos de la corteza y cáscara de Tynanthus panurensis (clavo huasca)* [Universidad Nacional de la Amazonía Peruana]. https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/6222/Carla_Tesis_Titulo_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Gonzalez, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandregonzalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, 24(13), 2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Hamasalih, H. A. (2023). *Alkaloids: Total Synthesis & Extraction Techniques*. Salahuddin University Erbil. <https://academics.su.edu.krd/public/profiles/karzan.hameed/supervision/supervision-86-14513-1682669845-1.pdf>
- Hernández, E. (2010). *“Escherichia coli” productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria* [Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones]. <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/996458a6-08e5-4b37-962d-37d68913fc10/content>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. P. (2014). *Metodología de la investigación* (6°). McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V. https://periodicooficial.jalisco.gob.mx/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia_de_la_investigacion_-_roberto_hernandez_sampieri.pdf
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W., & Tamariz, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39. <https://doi.org/10.20453/rmh.v16i1.862>



- Infantes, M. Y. (2019). *Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Escherichia coli* comparado con norfloxacino* [Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote]. https://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/11319/ACEITE_EFEECTO_INFANTES_FIGUEROA_MELINA_YUDITH.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of Plant Secondary Metabolites. In S. of A. Sciences (Ed.), *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology* (pp. 341–366). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13
- Laboratoryinfo. (2022). *Mayer's Test for alkaloids – Procedure, Mechanism, Results, Uses*. <https://laboratoryinfo.com/mayers-test-for-alkaloids-procedure/>
- Lal, A., & Cheeptham, N. (2007). *Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol* (American Society for Microbiology (ed.)). <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Eosin-Methylene-Blue-Agar-Plates-Protocol.pdf?ext=.pdf>
- Lara, C., Oviedo, L. E., & Betancur, C. A. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 187–194. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-72692011000200005&script=sci_arttext
- Laura, J. (2019). *Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*); muña (*Minthostachys mollis*) frente a *Staphylococcus aureus* y *Coliformes fecales** [Universidad Peruana Unión]. https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/1711/Jhon_Tesis_Licenciatura_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Leal, F., & de Clavijo, C. M. (2010). Acerca de la historia, taxonomía, botánica y usos de *Bixa orellana* L. *Revista UNELLEZ de Ciencia y Tecnología*, 28, 78–86. <http://200.11.218.106/index.php/ruct/article/download/150/143>
- León, C. P., & Vásquez, G. G. (2013). *Prevalencia de cepas de *escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (blee) en muestras de orina de pacientes ambulatorios de los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca*



- [Universidad de Cuenca].
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4631/1/TESIS.pdf>
- López, M., Triana, J., Pérez, F. J., & Torres, M. E. (2005). *Métodos físicos de separación y purificación de de sustancias orgánicas*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. <https://acedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>
- López, S. E., Caicedo, M., Gil, A., López, A., & Pazos, A. E. (2018). Morphometry of fruit and seed of *Bixa orellana* L. “achiote.” *SCIÉND*O, 21(2), 213–216. <https://doi.org/10.17268/sciendo.2018.022>
- Lorenzi, H., Matos, F. J. de A., Cavalleiro, A. de S., Brochini, V. F. G., & Souza, V. C. P. P.-N. O. (2021). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Jardim Botânico Plantarum.
- Lubis, M. F., Syahputra, H., & Astyka, R. (2022). Antibacterial Activity Ethanolic Extract of *Ocimum basilicum* L. Leaves in Inhibiting the Growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *NSMRJ: Nusantara Scientific Medical Research Journal*, 1(1), 1–8.
- Mamani, B. M. (2023). *Caracterización preliminar de metabolitos secundarios de *Cyristax antisiphilitica* y efecto antimicrobiano en *Escherichia coli* aisladas de orinas de gestantes del Centro de Salud Vallecito, Puno* [Universidad Nacional del Altiplano]. http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/20586/Mamani_Huaman_Betsabe_Melissa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Mamani, Y. (2022). *Efecto antibacteriano “In vitro” del extracto etanolico de *Tropaeolum tuberosum* “Isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Staphylococcus aureus* de gestantes con infeccion del tracto urinario* [Universidad Nacional del Altiplano]. https://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/17512/Mamani_Ccarita_Yon.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Marrelli, M. (2021). Medicinal Plants. *Plants*, 10(7), 1355. <https://doi.org/10.3390/plants10071355>
- MCD. (2023). *Agar Eosina y Azul de Metileno*. mcd.com.mx/medios-de-cultivo/24-72-



agar-eosina-y-azul-de-metileno.html

- MDMC. (2020). *Series de identificación Bioquímicas (Urea, Citrato, Lisina, SIM Y TSI). MDM Científica*. <https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/03/IS-24-SERIES-DE-IDENTIFICACION-BIOQUIMICA.pdf>
- Medina, D. A. (2015). *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)* [Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC)]. repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/584214/original.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Medina, M. E. (1997). *Estudio fitoquímico de Ephedra americana H. & B.* Universidad Nacional de San Agustín.
- Mendo, M. (2014). *Medios de cultivo en microbiología* (6° edición). Ebisa.
- Mesones Ramírez, G., & Donayre Linares, L. (2007). *Efecto antimicrobiano de Bixa orellana" achiote", Genipa americana" huiton" y Pistia stratiotes" huama" sobre agentes que producen infecciones dérmicas y vaginales* [Universidad Nacional de la Amazonía Peruana]. repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/4980
- Mora-Villa, A., Serrano-Parrales, R., Lira-Saade, R., Jiménez-Estrada, M., & Hernández-Delgado, T. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica*, 52. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.12>
- Moraes, R. N., Guedes Coutinho, G., De Oliveira Rezende, A., De Brito Pontes, D., Pinheiro Soares Ferreira, R. L., de Araújo Moraes, D., Pontes Albuquerque, R., Lima-Neto, L. G., Nascimento da Silva, L. C., Quintino da Rocha, C., Machado Gonçalves, L., Macedo Santiago, L. Â., Mondego-Oliveira, R., Cardoso Carvalho, R., & Martins de Sousa, E. (2020). Compounds isolated from *Bixa orellana*: evidence-based advances to treat infectious diseases. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 49(3). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n3.91247>
- Mostacero, J., Mejía, F., & Gamarra, O. (2009). *Fanerógamas del Perú: Taxonomía,*



- utilidad y ecogeografía. In *CONCYTEC. Trujillo-Perú*.
- Muchtaromah, B., Safitri, E. S., Fitriyari, P. D., & Istiwandhani, J. (2020). Antibacterial activities of *Curcuma mangga* Val. extract in some solvents to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *AIP Conference Proceedings*, 2231(1).
- Navarrete, N. A., Pita-Ospina, E. F., Sánchez Mora., R. M., Giraldo Quintero, S. E., & Bernal Lizarazú, M. C. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas. *Nova*, 18(33). <https://doi.org/10.22490/24629448.3700>
- Nortjie, E., Basitere, M., Moyo, D., & Nyamukamba, P. (2022). Extraction Methods, Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Textiles: A Review. *Plants*, 11(15), 2011. <https://doi.org/10.3390/plants11152011>
- Ochoa, K., Paredes Quiroz, L. R., Bejarano Luján, D. L., & Silva Paz, R. J. (2012). Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*, 3(4), 291–302. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2012.04.03>
- Ongsakul, M., Jindarat, A., & Rojanaworarit, C. (2009). Antibacterial effect of crude alcoholic and aqueous extracts of six medicinal plants against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Health Research*, 23(3), 153–156. <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/JHRE/10893401.pdf>
- Oulkheir, S., Aghrouch, M., El Mourabit, F., Dalha, F., Graich, H., Amouch, F., Ouzaid, K., Moukale, A., & Chadli, S. (2017). Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. *J. Dis. Med. Plants*, 3, 1–5. https://www.researchgate.net/profile/Smail-Chadli-2/publication/312497854_Antibacterial_Activity_of_Essential_Oils_Extracts_from_Cinnamon_Thyme_Clove_and_Geranium_Against_a_Gram_Negative_and_Gram_Positive_Pathogenic_Bacteria/links/58c667cba6fdcce648ebd8d1
- Pajohi, M., Bazargani, B., Mahmoudi, R., Reale, A., Pakbin, B., Di Renzo, T., & Kaboudari, A. (2022). Essential Oils from Indigenous Iranian Plants: A Natural



- Weapon vs. Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 10(1), 109.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10010109>
- Pérez, E., & Rivas, A. (2021). *Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos*. Universidad Politécnica de Valencia.
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/167611/Pérez?sequence=1>
- Perez, G. E. (2019). *Sensibilidad de Escherichia coli obtenida de urocultivos en pacientes de 11 a 40 años de edad* [Universidad Técnica de Machala].
http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/14687/1/E-11264_PEREZ CEDILLO GLENDA ESTEFANIA.pdf
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076>
- Picazo, J. J. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Pimentel, E., Castillo Andamayo, D., Del Solar, Q., Maurtua Torres, D., Villegas Vílchez, L., & Díaz Santisteban, C. (2015). Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatológica Herediana*, 25(4), 268–277.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1019-43552015000400004&script=sci_abstract
- Pîrlîţeanu, M., Miron, R.-M., Bosioc, F., Bosioc, P., Tulcan, C., & Nicolin, A. L. (2020). Inhibitory activity of essential oils on *Escherichia coli*. *Research Journal of Agricultural Science*, 52(3).
https://rjas.ro/download/paper_version.paper_file.93f33b517e079c99.5049524c495445414e552e706466.pdf
- Prathima, D., Sujitha, A., & Usha, R. (2016). Phytochemical screening and antimicrobial



- activity of *Bixa orellana* Linn. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(7), 1078–1082.
https://www.researchgate.net/profile/Sujitha-Asadhi/publication/306214575_Phytochemical_screening_and_antimicrobial_activity_of_bixa_Orellana_linn/links/58ca5bd1458515fa53c57516/Phytochemical-screening-and-antimicrobial-activity-of-bixa-Orellana-linn.pdf
- Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., Heinämäki, J., Romane, E., Gudienė, V., Tas, V. J., Koshovi, O. M., Kovaleva, A., Fursenco, C., Chiru, T., & Nguyen, H. T. (2020). Dragendorff's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Die Pharmazie*, 75(7), 299–306.
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:220405097>
- Raddatz, D., Pérez, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Godoy-Hernández, G., & Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263–268. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Rodríguez, R., & Muñoz, E. (2017). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo de Trujillo, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(4), 994–1001.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172017000400025&script=sci_arttext&tlng=pt
- Ruíz, L. del M., Rodríguez-López, V. A., Cadena-Iñíguez, J., Delgadillo-Martínez, J., San Miguel-Chávez, R., Salazar-Aguilar, S., & Valdez-Carrasco, J. (2023). Antibacterial activity of the *Calendula officinalis* L. essential oil on *Escherichia coli*. *Agro Productividad*.
- Sacsquispe, R. (2001). *Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias*. Instituto Nacional de Salud. file:///C:/Users/hp



- jk/Downloads/Manual de procedimientos bacteriologicos en infecciones intrahospitalarias (1).pdf
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- SEM. (2023). *Post: Mediante diluciones de antibiótico se calcula la CMI (cocentración mínima inhibitoria)*. <https://twitter.com/SEM microbiologia/status/850078913275584518>
- Shilpi, J. A., Taufiq-Ur-Rahman, M., Uddin, S. J., Alam, M. S., Sadhu, S. K., & Seidel, V. (2006). Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.008>
- Silva, H., Alvarado, R., Hidalgo, J., Cerruti, T., Davila, W., & Mestanza, M. (2022). *Achiote*. Instituto Nacional de Salud. https://www.academia.edu/7303530/Achiote_Vademecum
- Solis, L., Solis, J., Aragon, L., Fernández, M., Hernández, I., Rodeiro, I., & Pino, J. (2017). Composición química y actividad antioxidante de aceites esenciales de *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita* L. var. *vulgaris* cultivados en Cusco, Perú. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 48(1), 41–47.
- SU. (2024). *Crude drugs containing tannins*. Semmelweis University. <https://semmelweis.hu/farmakognozia/files/2014/03/tannins.pdf>
- Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., & Vágvölgyi, C. (2020). Plant Phenolics and Phenolic-Enriched Extracts as Antimicrobial Agents against Food-Contaminating Microorganisms. *Antioxidants*, 9(2), 165. <https://doi.org/10.3390/antiox9020165>
- Tripathi, N., & Sapra, A. . (2023). *Gram staining*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Troncoso, H. A. (2014). *Valoracion del cultivo de Bixa orellana (Achiote), evaluando su actividad antibacteriana, Concentracion Minima Inhibitoria y Concentracion Bactericida Minima in vitro de los extractos acuoso y etanolico de hojas y corteza*



- frente al crecimiento de Escheric* [Universidad Católica de Santa María].
<https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/0a249338-7562-4398-9f83-902778f498ae>
- Usquiano, M. I. (2022). *Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de Melissa officinalis L. (toronjil) sobre Escherichia coli ATCC 25922*. Universidad María Auxiliadora.
https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/1330/TESIS_CUEVA-USQUIANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Valarezo, E., Torres-Torres, S., Pineda-Guarnizo, N., Jaramillo-Fierro, X., Cartuche, L., Morocho, V., & Meneses, M. A. (2023). Study of Essential Oil Isolated from Achote (Bixa orellana) Leaves: Chemical Composition, Enantiomeric Distribution and Antimicrobial, Antioxidant and Anticholinesterase Activities. *Antibiotics*, 12(4), 710. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040710>
- Valenzuela, P. D. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de Ugni molinae Turcz* [Universidad de Chile].
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134044/Evaluacion-de-la-actividad-antioxidante-y-determinacion-del-contenido-de-fenoles-totales-y-flavonoides.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vellingiri, B., Jayaramayya, K., Iyer, M., Narayanasamy, A., Govindasamy, V., Giridharan, B., Ganesan, S., Venugopal, A., Venkatesan, D., Ganesan, H., Rajagopalan, K., Rahman, P. K. S. M., Cho, S.-G., Kumar, N. S., & Subramaniam, M. D. (2020). COVID-19: A promising cure for the global panic. *Science of The Total Environment*, 725, 138277. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138277>
- Ventura, G., & Sacsquispe, R. (2005). *Manual de procedimientos de obtención de muestras para el diagnóstico bacteriológico en infecciones intrahospitalarias*.
<https://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1775.pdf>
- Villafan, S. (2014). *Guia de Prácticas de Farmacognosia*. universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca.
- WHO. (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. World Health Organization Geneva. <https://www.gmp->



compliance.org/files/guidemgr/WHO_9241545100.pdf

- Xiao, S., Cui, P., Shi, W., & Zhang, Y. (2019). Identification of essential oils with strong activity against stationary phase uropathogenic *Escherichia coli*. *Discovery Medicine*, 28(154), 179–188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31926578>
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., & Li, M. (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*, 10(3), 318. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030318>
- Zaidi, S., & Dahiya, P. (2015). In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*. *International Food Research Journal*, 22(6), 2440. [http://www.ifrj.upm.edu.my/22\(06\)2015/\(37\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/22(06)2015/(37).pdf)
- Zakaria, L., Sahli, F., Laouar, H., Olowo-okere, A., Nkuimi Wandjou, J. G., & Maggi, F. (2020). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Antibiotics*, 9(1), 29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010029>



ANEXOS

ANEXO 1. *Porcentaje de crecimiento de Escherichia coli frente al aceite esencial y extracto etanólico de hojas de Bixa orellana L. para determinación de Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida*

Cepa	CMI										CMB							
	Aceite esencial (%)					Extracto etanólico (%)					Aceite esencial (%)				Extracto etanólico (%)			
	10	25	50	75	100	10	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
m1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
m2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m3	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
m4	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
m5	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
m6	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
m7	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
m8	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
m9	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
m10	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
m11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m12	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
m13	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
m14	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
m15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m16	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
m17	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
m18	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	18	7	5	3	3	18	18	6	3	3	18	15	3	3	18	7	3	3
% crecimiento bacteriano	100.00	38.89	27.78	16.67	16.67	100.00	100.00	33.33	16.67	16.67	100.00	83.33	16.67	16.67	100.00	38.89	16.67	16.67

Nota: + = con crecimiento, - = sin crecimiento, %=Porcentaje, CMI=Concentración Mínima Inhibitoria, CMB = Concentración Mínima Bactericida, m1...m18= Número de aislamiento bacteriano (cepa)



ANEXO 2. Halos de susceptibilidad correspondientes para la actividad antibacteriana

del extracto etanólico de hojas de *Bixa orellana* L. frente a *E. coli*

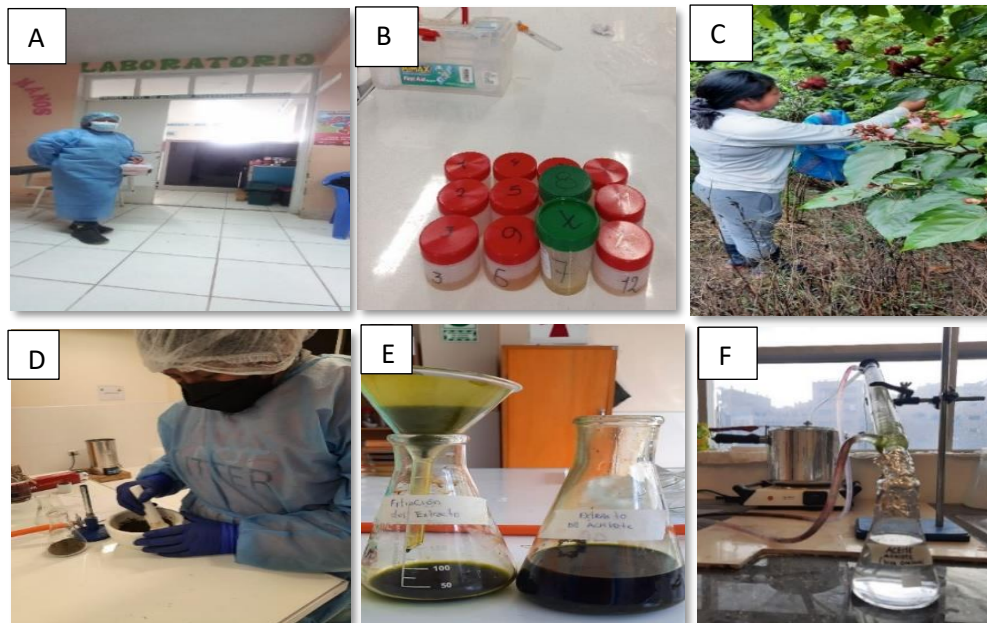
Aislamiento	[Aceite esencial]					Control
	10%	25%	50%	75%	100%	GEN
	Halos de susceptibilidad (mm)					
<i>m1</i>	3	12	19	23	25	23
<i>m2</i>	4	8	10	12	15	20
<i>m3</i>	5	12	23	25	27	22
<i>m4</i>	0	8	14	16	19	14
<i>m5</i>	5	7	20	25	27	25
<i>m6</i>	7	10	23	26	27	19
<i>m7</i>	6	16	19	20	23	25
<i>m8</i>	0	10	12	17	20	23
<i>m9</i>	7	15	17	23	28	20
<i>m10</i>	4	16	21	22	26	23
<i>m11</i>	0	8	10	12	13	16
<i>m12</i>	3	12	15	20	25	20
<i>m13</i>	2	15	21	24	26	24
<i>m14</i>	6	12	13	20	23	17
<i>m15</i>	0	15	18	24	28	16
<i>m16</i>	3	16	18	20	25	25
<i>m17</i>	0	10	15	21	25	14
<i>m18</i>	0	12	14	18	14	21

Aislamiento bacteriano	[Extracto etanólico]					Control
	10%	25%	50%	75%	100%	GEN
	Halos de susceptibilidad (mm)					
<i>m1</i>	0	5	15	17	25	23
<i>m2</i>	6	8	13	19	23	20
<i>m3</i>	9	11	18	21	26	22
<i>m4</i>	5	7	15	25	27	14
<i>m5</i>	4	10	12	24	28	25
<i>m6</i>	3	12	16	21	28	19
<i>m7</i>	5	9	18	20	25	25
<i>m8</i>	0	5	14	24	29	15
<i>m9</i>	6	10	17	23	25	20
<i>m10</i>	8	11	15	19	27	23
<i>m11</i>	0	4	10	25	28	16
<i>m12</i>	6	8	15	15	20	20
<i>m13</i>	5	10	19	23	26	24
<i>m14</i>	6	10	13	20	23	17
<i>m15</i>	5	9	12	24	29	16
<i>m16</i>	0	6	16	26	27	25
<i>m17</i>	4	8	14	21	25	14
<i>m18</i>	3	7	17	25	28	21

Nota: %=Porcentaje, GEN=Gentamicina, mm=milímetros, m1...m18= Número de aislamiento bacteriano (cepa)

Fuente: Elaboración propia

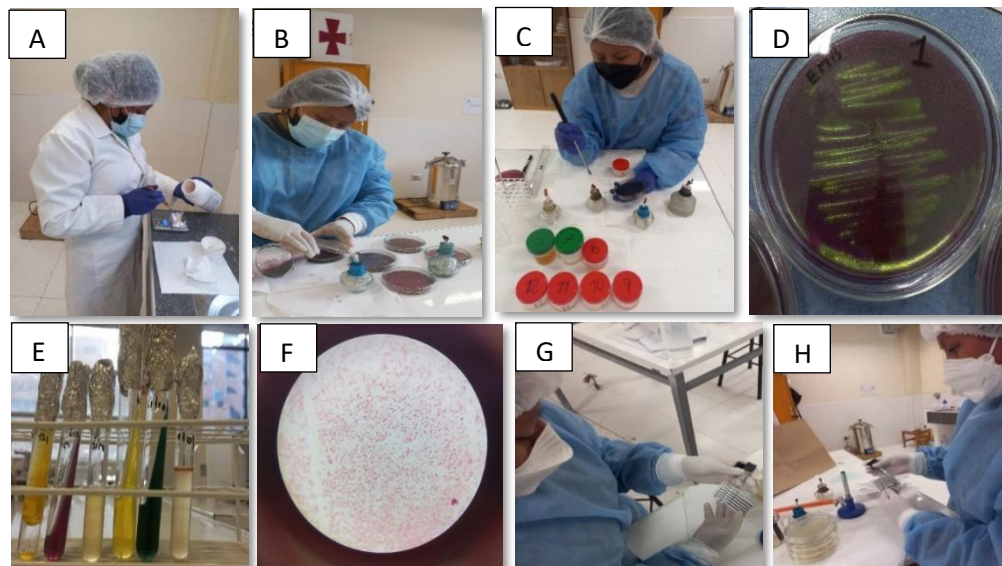
ANEXO 3. *Recolección de muestras de orina y obtención de extracto etanólico y de aceite esencial de hojas de achiote.*



A. Laboratorio del Centro de Maternidad en la localidad de Juli, B. Muestras de orina de gestantes, C. Recolección de hojas de achiote, D. Trituración de las hojas, E. preparación del extracto, F Obtención de aceite esencial por arrastre de vapor.

Fuente: Banco de imágenes

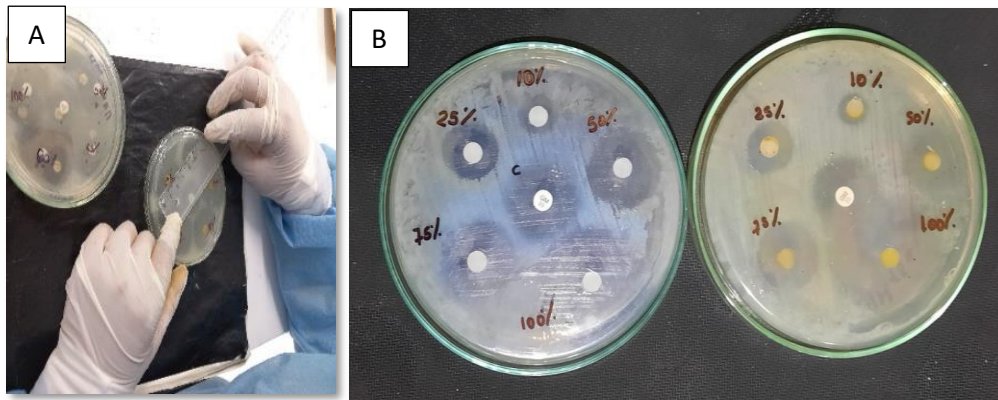
ANEXO 4. *Aislamiento y determinación de microorganismos uropatógenos*



A. Preparación de medio de cultivo, B. Plaqueado del medio de cultivo, C. Sembrado de la muestra de orina, D. Crecimiento de la bacteria, E. Pruebas bioquímicas diferenciales, F. Tinción Gram, G. Medición de presencia de turbidez de la suspensión bacteriana con una escala de 0.5 de McFarland, H. Sembrado en Müller Hinton.

Fuente: Banco de imágenes

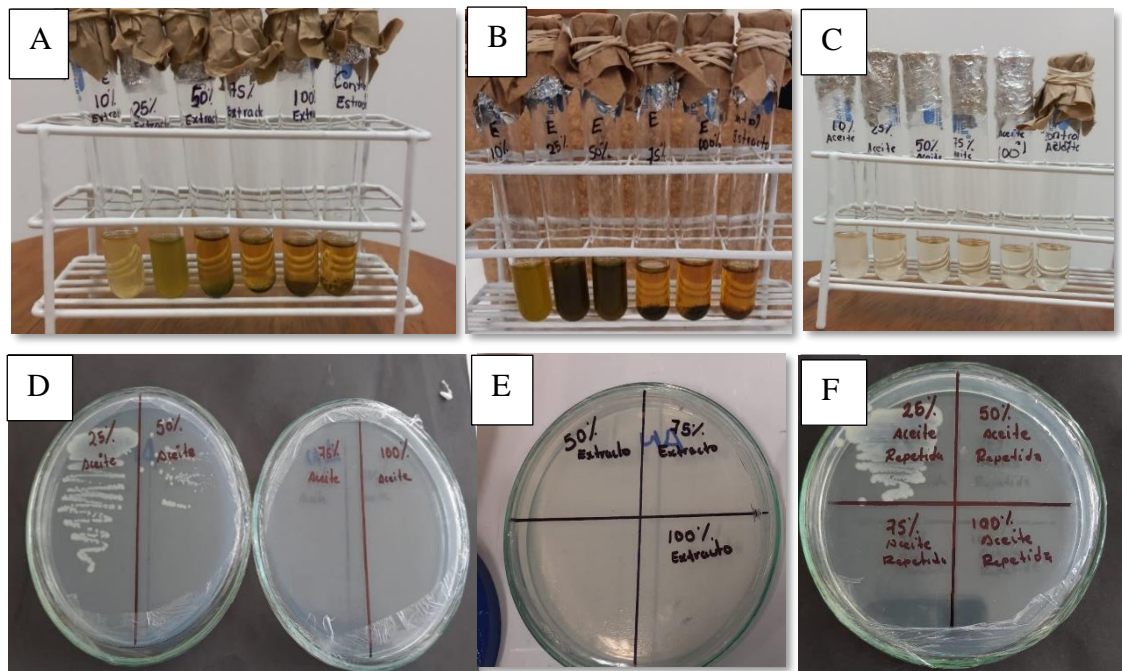
ANEXO 5. *Resultados del antibiograma con los discos de susceptibilidad en base a aceite esencial y extracto etanólico de hojas de Bixa orellana L.*



A. Medición de los halos de susceptibilidad B. Comparación de los halos de susceptibilidad para AE (izquierda) y EE (derecha) de hojas de achiote a concentraciones de 10%, 25%, 50%, 75% y 100%

Fuente: Banco de imágenes

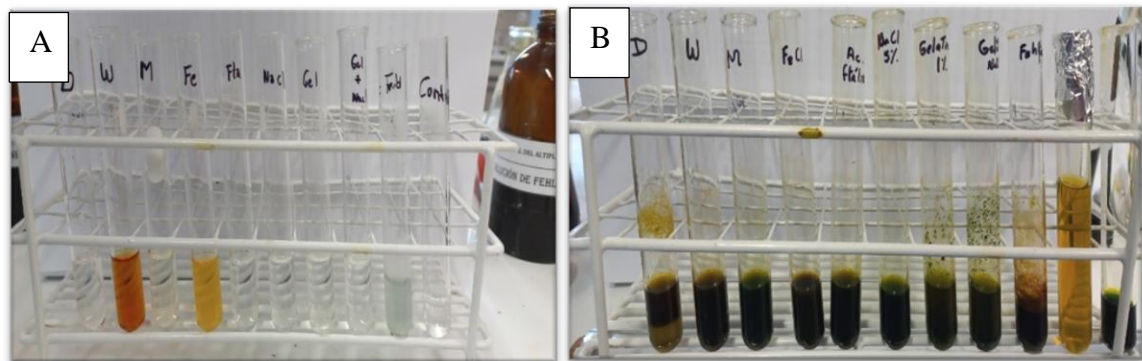
ANEXO 6. *Evaluación de la actividad antibacteriana*



A. Resultados de CMI del extracto etanólico de hojas de achiote, B. Resultados de CMI del aceite esencial de hojas de achiote, C. Resultados de CMB del aceite esencial de hojas de achiote, D. Resultados de CMB del aceite esencial de hojas de achiote, E y F. Determinación en placa del CMB correspondiente al EE de hojas de achiote

Fuente: Banco de imágenes

ANEXO 7. Caracterización fitoquímica cualitativa de hojas de *Bixa orellana* L.



A. Análisis fitoquímico correspondiente a alcaloides, fenoles y taninos del AE de hojas de achiote. B. Análisis fitoquímico correspondiente a alcaloides, fenoles y taninos del EE de hojas de achiote

Fuente: Banco de imágenes



ANEXO 8. *Constancia de obtención de muestras de orina a partir de gestantes que acudieron al Complejo Materno Laboratorio Preventivo Promocional – primer nivel de atención de la localidad de Juli para el aislamiento de uropatógenos*



RED DE SALUD CHUCUITO
HOSPITAL II-1 "RAFAEL ORTIZ RAVINES" JULI



CONSTANCIA

Por medio de la presente dejamos constancia que la Srta. MILENE CELINA FLORES MENDIZABAL Con DNI:73252455, egresado de la **FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA** con mención en **MICROBIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO** de la **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO**, realizó procedimientos de la ejecución de su proyecto de investigación titulado "FITOQUÍMICA CUALITATIVA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE E. COLI DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANÓLICOS DE BIXA ORELLANA L. (ACHIOTE) COLECTADOS EN EL DISTRITO DE SAN PEDRO DE PUTINA PUNCO, PUNO – 2022", obteniendo muestras de orina de gestantes para urocultivo, del área de **LABORATORIO PREVENTIVO PROMOCIONAL PRIMER NIVEL DE ATENCIÓN DEL COMPLEJO MATERNO DE HOSPITAL RAFAEL ORTIZ RAVINES DE JULI DE RED DE SALUD CHUCUITO**, con la finalidad de obtener sus resultados, durante los meses de febrero a abril del 2022.

El presente se expide a petición del interesado.



Jhon Albert Flores Cutipa
C.B.P. 16355
PATOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

Blgo. JHON ALBERT FLORES CUTIPA
LABORATORIO CLINICO



Dr. GREG CHIRINOS COAGUILA
DIRECTOR DEL HOSPITAL RAFAEL ORTIZ RAVINES

Juli, 22 de julio del 2022



ANEXO 9. *Constancia de determinación taxonómica del achiote (Bixa orellana L.)
por el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de
San Agustín*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N°33-2022-HUSA

El director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra biológica presentada por Milene Celina Flores Mendizabal, Bachiller de la Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, para la realización de su tesis: "FITOQUÍMICA CUALITATIVA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE E. COLI DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANOLICOS DE BIXA ORELLANA L. (ACHIOTE) COLECTADOS EN EL DISTRITO DE SAN PEDRO DE PUTINA PUNCO, PUNO-2022". La muestra fue enviada al laboratorio de Botánica al estado fenológico seco, para su determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la siguiente especie.

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Subclase	Rosidae
Orden	Malvales
Familia	Bixaceae
Genero	Bixa
Especie	<i>Bixa orellana</i> L

Se le expide la presente a solicitud del interesado

Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR

Herbarium Arequipense (HUSA) Avenida
Daniel Alcides Carrión s/n mercado-Teléfono: (054) 237755 / 993659045

Arequipa, 29 de noviembre del 2022



ANEXO 10. *Constancia de ejecución de tesis realizado en el Laboratorio de Botánica
y Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología*



Universidad Nacional del Altiplano de Puno

Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Biología
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico
Laboratorio de Botánica y Biotecnología



Registro: 011-2022

CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, **DOCENTE RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE BOTÁNICA Y BIOTECNOLOGÍA** DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO – PERÚ.

HACE CONSTAR:

Que el (la) Bachiller **MILENE CELINA FLORES MENDIZABAL**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado la parte experimental de su trabajo de investigación (Tesis) titulado: **FITOQUÍMICA CUALITATIVA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE *E. coli* DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Bixa orellana* L. (ACHIOTE) COLECTADOS EN EL DISTRITO DE SAN PEDRO DE PUTINA PUNCO, PUNO - 2022**, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de febrero a mayo del año 2022.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del (a) interesado (a) para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 16 de mayo del 2022.

JUAN JOSÉ FAURO ROQUE, Dr. Sc.
Responsable del Laboratorio de Botánica y Biotecnología
FCCBB – UNA Puno



AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo _____ MILENE CELINA FLORES MENDIZABAL _____, identificado con DNI _____ 73252455 _____ en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

De Biología

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“FITOQUÍMICA CUALITATIVA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE *Escherichia coli* DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Bixa orellana* L. (ACHIOTE) COLECTADOS EN EL DISTRITO DE SAN PEDRO DE PUTINA PUNCO, PUNO – 2022”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.


En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno _____ 20 _____ de _____ Mayo _____ del 2024 _____



FIRMA (obligatoria)



Huella



DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo MILENE CELINA FLORES MENDIZABAL,
identificado con DNI 73252455 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
de Biología

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“FITOQUÍMICA CUALITATIVA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE *Escherichia coli* DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Bixa orellana* L. (ACHIOTE) COLECTADOS EN EL DISTRITO DE SAN PEDRO DE PUTINA PUNCO, PUNO – 2022”

Es un tema original.

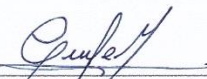
Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 20 de mayo del 2024


FIRMA (obligatoria)



Huella