

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica Especialidad en
Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Tesis

**Poder bactericida del aceite esencial de *Bixa
orellana* L. (achiote)**

Danilo Cairampoma Pecho
Beatriz Evelyn Martinez Echevarria

Para optar el Título Profesional de
Licenciado en Tecnología Médica con Especialidad
en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Huancayo, 2024

Repositorio Institucional Continental
Tesis digital



Esta obra está bajo una Licencia "Creative Commons Atribución 4.0 Internacional" .

INFORME DE CONFORMIDAD DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

A : Decana de la Facultad de Ciencias de la Salud
DE : Milagritos Soledad Holgado Gonzales
Asesor de trabajo de investigación
ASUNTO : Remito resultado de evaluación de originalidad de trabajo de investigación
FECHA : 4 de Julio de 2024

Con sumo agrado me dirijo a vuestro despacho para informar que, en mi condición de asesor del trabajo de investigación:

Título:

PODER BACTERICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE BIXA ORELLANA L. (ACHIOTE)

Autores:

1. Danilo Cairampoma Pecho – EAP. Tecnología Médica - Especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica
2. Beatriz Evelyn Martinez Echevarria – EAP. Tecnología Médica - Especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Se procedió con la carga del documento a la plataforma "Turnitin" y se realizó la verificación completa de las coincidencias resaltadas por el software dando por resultado 16 % de similitud sin encontrarse hallazgos relacionados a plagio. Se utilizaron los siguientes filtros:

- Filtro de exclusión de bibliografía SI NO
- Filtro de exclusión de grupos de palabras menores
Nº de palabras excluidas (**en caso de elegir "SI"**): SI NO
- Exclusión de fuente por trabajo anterior del mismo estudiante SI NO

En consecuencia, se determina que el trabajo de investigación constituye un documento original al presentar similitud de otros autores (citas) por debajo del porcentaje establecido por la Universidad Continental.

Recae toda responsabilidad del contenido del trabajo de investigación sobre el autor y asesor, en concordancia a los principios expresados en el Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos – RENATI y en la normativa de la Universidad Continental.

Atentamente,

Dedicatoria

A mi divino creador, por darme el don de la vida.

A mis progenitores, por el respaldo inquebrantable que me dieron en mi periodo de estudio.

A mi esposa e hijos, por ser mi principal fuente de inspiración y estímulo en este viaje académico.

Danilo

A mi amado Dios, fuente de luz y guía en mi vida.

A mi querida madre, por su apoyo y amor ilimitado.

A mis adorados abuelitos, cuyos valores y sabiduría han guiado cada paso de mi camino académico.

A mis queridas tías, por su cariño inquebrantable y su constante ánimo.

A mi amado novio, por su paciencia, comprensión y sustento.

Beatriz Evelyn

Agradecimientos

A Dios por guiarnos y bendecirnos en cada paso del camino. Su amor incondicional y su gracia han sido la fuerza que nos ha sostenido en los momentos difíciles y la luz que ha iluminado nuestro camino hacia el éxito; reconocemos que cada logro que hemos alcanzado es un regalo de su bondad y misericordia.

A nuestras familias, quienes han sido nuestro pilar, nuestra fuente de inspiración y nuestro refugio en los momentos de adversidad, su amor incondicional, tolerancia y respaldo continuo, que han sido esenciales para nuestro crecimiento y éxito.

A nuestra querida asesora, Milagritos, por su guía, tolerancia y respaldo permanente. Su compromiso con nuestro desarrollo académico ha sido fundamental, y apreciamos profundamente la dedicación demostrada en cada etapa.

A la Universidad Continental, que ha sido un faro de conocimientos, proporcionándonos las herramientas y la inspiración necesarias para crecer y aprender.

Al equipo del Policlínico EsSalud, por su servicio excepcional. Su profesionalismo y atención médica han sido una parte esencial de nuestro bienestar, y estamos agradecidos por el compromiso continuo con la salud de la comunidad.

Los autores.

Índice

Dedicatoria	i
Agradecimientos.....	ii
Índice.....	iii
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Introducción	ix
Capítulo I Planteamiento del estudio.....	10
1.1 Delimitación de la investigación.....	10
1.1.1. Delimitación territorial.....	10
1.1.2. Delimitación temporal.....	10
1.1.3. Delimitación conceptual.....	10
1.2 Planteamiento del problema.....	10
1.3 Formulación del problema	12
1.3.1. Problema general.....	12
1.3.2. Problemas específicos	13
1.4 Objetivos	13
1.4.1. Objetivo general.....	13
1.4.2. Objetivos específicos	13
1.5 Justificación.....	14
1.5.1. Justificación teórica.....	14
1.5.2. Justificación práctica.....	14
1.5.3. Justificación metodológica.....	14
Capítulo II Marco teórico.....	15
2.1. Antecedentes del problema	15
2.1.1. Antecedentes internacionales	15
2.1.2. Antecedentes nacionales	16
2.1.3. Antecedentes locales	17
2.2. Bases teóricas.....	18
2.2.1. Bixa orellana L. (achiote).....	18
2.2.2. Aceites esenciales.....	25
2.2.3. Bacilos.....	26
2.2.4. Unidades formadoras de colonias	28
2.3. Definición de términos básicos	28
Capítulo III Hipótesis y variables.....	29

3.1.	Hipótesis.....	29
3.1.1.	Hipótesis general.....	29
3.2.	Identificación de variables	29
3.3.	Operacionalización de Variables:.....	30
Capítulo IV Metodología		31
4.1.	Métodos, tipo y nivel de la investigación.....	31
4.1.1.	Método de la investigación	31
4.1.2.	Tipo de la investigación	31
4.1.3.	Alcance de la investigación.....	31
4.2.	Diseño de la investigación	32
4.3.	Población y muestra.....	32
4.3.1.	Población.....	32
4.3.2.	Muestra.....	32
4.4.	Técnicas e instrumentos de recolección y análisis de datos	33
4.4.1.	Técnica	33
4.4.2.	Instrumento	33
4.5.	Técnicas de análisis de datos.....	34
4.5.1.	Procedimiento de la investigación.....	34
4.6.	Consideraciones éticas	36
Capítulo V Resultados y discusión.....		37
5.1.	Presentación de resultados	37
5.1.1.	Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 50 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana</i> L. (achiote).....	37
5.1.2.	Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 100 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana</i> L. (achiote).....	40
5.1.3.	Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 200 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana</i> L. (achiote).....	43
5.1.4.	Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 500 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana</i> L. (achiote).....	46
5.1.5.	Resultado global del poder bactericida del aceite esencial de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote) 49	
5.1.6.	Gráficos de medias marginales	51
5.2.	Discusión de resultados.....	52
Conclusiones		56
Recomendaciones.....		57
Referencias bibliográficas		58
Anexos.....		63

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química.....	21
Tabla 2. Clasificación taxonómica	22
Tabla 3. Operacionalización de las variables	30
Tabla 4. Resultados con 50 µl de aceite para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	37
Tabla 5. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 50 µl de aceite.....	37
Tabla 6. Resultados con 50 µl de aceite para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	38
Tabla 7. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 50 µl de aceite	39
Tabla 8. Resultados con 100 µl de aceite para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	40
Tabla 9. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 100 µl de aceite.....	40
Tabla 10. Resultados con 100 µl de aceite para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	41
Tabla 11. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 100 µl de aceite	42
Tabla 12. Resultados con 200 µl de aceite para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	43
Tabla 13. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 200 µl de aceite.....	43
Tabla 14. Resultados con 200 µl de aceite para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	44
Tabla 15. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 200 µl de aceite	45
Tabla 16. Resultados con 500 µl de aceite para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	46
Tabla 17. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 500 µl de aceite.....	46
Tabla 18. Resultados con 500 µl de aceite para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	47
Tabla 19. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 500 µl de aceite	48
Tabla 20. Resultado para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	49
Tabla 21. Resultado para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	50

Índice de figuras

Figura 1. Hoja de <i>Bixa orellana L.</i> (achiote).....	19
Figura 2. Flores de <i>Bixa orellana L.</i> (achiote)	19
Figura 3. Frutos de <i>Bixa orellana L.</i> (achiote)	20
Figura 4. Semillas de <i>Bixa orellana L.</i> (achiote).....	20
Figura 5. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 50 µl de aceite	38
Figura 6. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 50 µl de aceite.....	39
Figura 7. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 100 µl de aceite	41
Figura 8. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 100 µl de aceite.....	42
Figura 9. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 200 µl de aceite	44
Figura 10. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 200 µl de aceite.....	45
Figura 11. UFC de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 inhibidas con 500 µl de aceite	47
Figura 12. UFC de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inhibidas con 500 µl de aceite.....	48
Figura 13. Resultado para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	49
Figura 14. Resultado para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	50
Figura 15. Gráfico de medias marginales por bacteria.....	51
Figura 16. Gráfico de medias marginales por dosis	51
Figura 17. Comparación de las medias marginales.....	52

Resumen

En la tesis realizada, el objetivo consistió en determinar el poder bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote). Para alcanzar dicho propósito, se empleó una metodología cuantitativa, básica, descriptiva y no experimental transversal. La capacidad bactericida del aceite se evaluó utilizando la técnica de observación mediante una dilución al 0.5, conforme a la escala de McFarland. Este proceso implicó la aplicación directa del aceite en cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Los resultados revelaron una inhibición de 1022, 1022, 1411 y 1587 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 en las concentraciones de aceite de 50, 100, 200 y 500 µl respectivamente. Por otro lado, en el caso de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, se observó una inhibición de 2493 y 2500 UFC para las dosis de 50 y 100 µl de aceite respectivamente, mientras que se logró una inhibición completa con las dosis de 100 µl y 200 µl de aceite. En conclusión, el aceite de *Bixa orellana L.* (achiote) demostró un notable poder bactericida, logrando inhibir el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en dosis variables. La efectividad fue más pronunciada en *Bacillus subtilis* ATCC 6633, evidenciando un impacto diferenciado en distintas cepas bacterianas. En este sentido, los resultados respaldan la viabilidad del aceite como un agente antimicrobiano potencial.

Palabras clave: aceite esencial, *Bixa orellana L.*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, cepa bacteriana y poder bactericida.

Abstract

In the conducted thesis, the objective was to determine the bactericidal power of the essential oil of *Bixa orellana L.* (achiote). To achieve this purpose, a quantitative, basic, descriptive, and non-experimental cross-sectional methodology was employed. The bactericidal capacity of the oil was evaluated using the observation technique through a 0.5 dilution, according to the McFarland scale. This process involved the direct application of the oil on cultures of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The results revealed that the colony-forming units (CFU) in *Escherichia coli* ATCC 25922 decreased from 1601 to 14 as the oil concentration increased from 50 μ l to 500 μ l. In the case of *Bacillus subtilis* ATCC 6633, CFUs decreased from 2511 to 0, exhibiting total growth inhibition with doses of 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, and 500 μ l. In conclusion, the oil of *Bixa orellana L.* (achiote) demonstrated a notable bactericidal power, managing to inhibit the growth of colonies of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 at varying doses. The effectiveness was more pronounced in *Bacillus subtilis* ATCC 6633, showing a differentiated impact on different bacterial strains. In this sense, the results support the viability of the oil as a potential antimicrobial agent.

Keywords: essential oil, *Bixa orellana L.*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, bacterial strain, and bactericidal power.

Introducción

El aceite esencial de *Bixa orellana L.*, generalmente reconocido como aceite de achiote, ha suscitado un progresivo interés en la investigación científica debido a sus propiedades antimicrobianas (1). El achiote, planta originaria de América tropical, ha sido tradicionalmente utilizada con propósitos medicinales y culinarios. Su aceite esencial, rico en compuestos bioactivos, ha captado el interés del grupo investigador a causa de sus potenciales aplicaciones en el ámbito de la salud (2). Los estudios previos han evidenciado el potencial antimicrobiano de diversos extractos vegetales, incluyendo el aceite esencial de *Bixa orellana L.* Sin embargo, aún persisten brechas en el conocimiento sobre su eficacia y mecanismos de acción específicos. Por ello, la demanda perpetua de hallar alternativas antimicrobianas efectivas para la desinfección de manos resalta la importancia de explorar fuentes naturales como el aceite esencial de achiote. (3)

Este estudio se propuso abordar la pregunta fundamental: ¿cuál es el poder bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote)? Para responder a esta interrogante, se diseñó un procedimiento compuesto por siete pasos fundamentales, que van desde la recolección de hojas Achiote hasta la interpretación detallada de los resultados obtenidos. Para ello, se emplea una metodología cuantitativa, aplicada, descriptiva y no experimental transversal, considerando como muestra a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y aplicando a la ficha de registro como instrumento. Es así como, el informe se organiza de la siguiente forma: Capítulo I, describe la realidad de la problemática identificada y justifica la razón del análisis; Capítulo II, expone el marco teórico; Capítulo III, sustenta la operacionalización de variable; Capítulo IV, justifica la metodología seleccionada y Capítulo V, muestra los resultados y discusión. Finalmente, se ubican las conclusiones, recomendaciones, referencias bibliográficas y anexos.

En esta investigación, se busca no solo contribuir a la comprensión sobre las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de achiote, sino también explorar su potencial como una fuente valiosa de compuestos con actividad bactericida. Sin embargo, se reconocen ciertas limitaciones, como la necesidad de mayores estudios adicionales. Debido a lo anteriormente expuesto, el estudio no solo aporta en la exploración de tratamientos innovadores, sino que subraya la importancia de investigar recursos de origen natural para abordar futuros desafíos en microbiología y salud pública.

Los autores.

Capítulo I

Planteamiento del estudio

1.1 Delimitación de la investigación

1.1.1. Delimitación territorial

La investigación fue realizada en el área de microbiología del “Policlínico Metropolitano Huancayo de EsSalud”, un centro de atención médica vinculado a EsSalud que brinda servicios ambulatorios a los asegurados en la región, localizado en Independencia 266, Huancayo 12007.

1.1.2. Delimitación temporal

La investigación se efectuó durante el año 2023 y 2024, comprendiendo los meses de octubre del 2023 a enero del 2024.

1.1.3. Delimitación conceptual

En el contexto de esta investigación, el poder bactericida se refiere a la capacidad del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) para inhibir y controlar el crecimiento de bacterias. Por tal, la investigación se centró en analizar específicamente las propiedades antibacterianas del aceite esencial extraído, abordando su eficacia contra cepas bacterianas como la *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

1.2 Planteamiento del problema

Los desinfectantes son un conjunto de sustancias que son utilizados sobre diversas superficies donde ejercen su acción para la inhibición o eliminación de microorganismos. No obstante, muchos de los desinfectantes son fabricadas a altas concentraciones lo que consecuentemente podría traer efectos irritantes o nocivos sobre la piel y mucosas (4). En muchos casos, los antisépticos disponibles en el mercado incluyen ingredientes como benceno y acetaldehído, los cuales, según la Administración de Alimentos y Medicamentos FDA, han sido asociados con la posibilidad de desarrollar ciertos tipos de cáncer en seres humanos. La literatura científica respalda esta afirmación, mostrando evidencia de que el acetaldehído ha sido identificado como un factor causal en varios casos de cáncer. (5)

La piel que recubre las manos frecuentemente se expone a todo el medio ambiente, lo cual genera deshidratación, desgaste de la elasticidad y en ciertos casos hiperpigmentaciones (6). Según la FMD, El excesivo uso de gel antibacteriano ocasiona deshidratación, leves o moderadas alteraciones dentro de la flora de la piel y altera el pH lo que ocasiona que un individuo tenga mayor riesgo a padecer una sobreinfección bacteriana (7). Por el contrario, los aceites esenciales poseen niveles elevados de vitaminas, minerales y ácidos grasos, desempeñando una función humectante al retener la humedad, brindando así a la piel una serie de propiedades beneficiosas. (8)

A nivel mundial, en la actualidad, los aceites esenciales han ganado reconocimiento a como una alternativa natural. Estos constituyen mezclas naturales que contienen diversos metabolitos con propiedades destacadas, tales como actividad antiviral, antibacteriana e incluso antifúngica. Esta amplia gama de componentes bioactivos ha impulsado el interés en los aceites esenciales como agentes terapéuticos, contribuyendo a su reputación como recursos naturales valiosos para la salud y el bienestar (9). Por este motivo, se encuentran desde hace muchas décadas dentro de múltiples estudios que tienen como fin la experimentación de los diversos productos de origen natural. Surgiendo de manera gradual gran parte de investigaciones enfocadas en las propiedades y características de los aceites esenciales para realizar tratamientos basados en productos naturales. (10)

En el Perú, el vasto tesoro de plantas con propiedades medicinales ha sido objeto de investigación tanto empírica como científica. Entre estas valiosas plantas, se destaca el *Bixa orellana L.*, conocido popularmente como achiote, cuyas propiedades antimicrobianas han sido evidenciadas de manera concluyente tanto en estudios empíricos como científicos. La riqueza de este recurso natural ha revelado su eficacia frente a diversas bacterias, consolidando así su posición como un agente valioso en la búsqueda de soluciones antimicrobianas. (11)

El *Bixa orellana L.*, conocido como achiote, corresponde a un tipo de especie botánica que responde a diversos nombres, entre ellos achiote, ocoto, bixa, bija, entre otros. Esta planta prospera en zonas tropicales de Centroamérica y Sudamérica, donde se encuentra tanto en estado silvestre como cultivada. Su presencia en la región ha sido históricamente significativa, y en la actualidad, diversos componentes de esta planta se utilizan por sus notables propiedades medicinales, entre las que se destacan su capacidad antiinflamatoria, cicatrizante, hepatoprotectora, antidiarreica y antihipertensiva (12). Además, el reconocimiento de las particularidades no tóxicas del aceite de las hojas de achiote añade un componente importante a la utilidad potencial de esta planta en la medicina moderna. La capacidad de combatir bacterias de manera efectiva, sin causar efectos adversos significativos en el organismo humano, resalta la

importancia del achiote como recurso valioso para la investigación y desarrollo de nuevas terapias antibacterianas. (13)

El aceite de *Bixa orellana L.*, que contiene aproximadamente entre 0.5 % y 3.5 %, se caracteriza por su tonalidad amarillo claro, que con el tiempo tiende a adquirir tonos rojizos. El aceite de achiote, extraído de las semillas de achiote, se caracteriza por su composición química abundante en compuestos como la norbixina y la bixina, ácidos grasos (oleico, linoleico, palmítico y esteárico), tocoferoles y otros compuestos como esquiterpenos y pigmentos fenólicos. Utilizado en la industria alimentaria como colorante natural en quesos, mantequillas, condimentos y salsas, también posee propiedades medicinales antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes, siendo empleado para tratar quemaduras y afecciones cutáneas. En la industria cosmética, es valorado por sus propiedades protectoras y antioxidantes para la protección de la dermis y el pelo. Históricamente, el achiote ha sido utilizado por pueblos originarios de Centroamérica y Sudamérica tanto en la alimentación como en ceremonias rituales y para fines medicinales. (14)

Dada la amplia gama de propiedades que exhibe el aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote), diversos estudios han demostrado su potente capacidad bactericida. Por ejemplo, una investigación global llevada a cabo por Valarezo et al. (15) reveló que el aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) exhibió una destacada actividad antibacteriana frente a una cepa específica sometida a estudio. En una línea similar, Nascimento et al., (16) encontró que el aceite esencial de *Bixa orellana L.* presentó un leve poder bactericida frente a *Escherichia coli*. Estos hallazgos respaldan la consideración actual del aceite esencial de *Bixa orellana L.* como un componente valioso para futuras formulaciones bioquímicas destinadas a productos antibacterianos.

A pesar del conocimiento extenso sobre los beneficios de las plantas medicinales, se observa una limitada cantidad de estudios que documenten de manera exhaustiva las propiedades antimicrobianas del *Bixa orellana L.* (achiote) en la actualidad. Por esta razón, esta investigación se propuso abordar esta brecha de conocimiento y demostrar el potencial bactericida de esta planta mediante un estudio in vitro. Con la intención de ampliar el entendimiento de sus propiedades antimicrobianas, se formuló la siguiente pregunta central:

1.3 Formulación del problema

1.3.1. Problema general

¿Cuál es el poder bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633?

1.3.2. Problemas específicos

1. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 50 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote)?
2. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 100 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote)?
3. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 200 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote)?
4. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 500 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote)?

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar el poder bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana* L. (achiote) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar cuántas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 50 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote).
2. Evaluar cuantas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 100 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote).
3. Evaluar cuántas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 200 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote).
4. Evaluar cuántas unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son inhibidas con 500 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote).

1.5 Justificación

1.5.1. Justificación teórica

El estudio abordó la necesidad de innovación en geles desinfectantes de manos, centrándose en el aceite esencial de achiote debido a sus propiedades antimicrobianas teóricas. Compuestos como tocotrienoles, betacaroteno y flavonoides presentes en el aceite demostraron propiedades antibacterianas. Se justificó teóricamente que un gel formulado con este aceite podría ser una barrera efectiva contra la proliferación de bacterias en las manos, ofreciendo protección residual. La investigación también se enfocó en comprender los mecanismos específicos por los cuales el aceite de achiote ejercía su efecto bactericida, contribuyendo así al campo de la microbiología y respaldando científicamente la innovación en la formulación de geles desinfectantes de manos con aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) para mejorar la higiene personal.

1.5.2. Justificación práctica

El estudio respaldó el uso del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) a modo de componente principal en geles desinfectantes de manos, buscando desarrollar productos innovadores que ofrezcan una protección efectiva contra patógenos bacterianos. Estudios previos destacaron las propiedades antimicrobianas de los compuestos del achiote, sugiriendo su potencial aplicación en desinfectantes. La formulación de geles con este aceite esencial se presentó como una alternativa prometedora a los desinfectantes convencionales, abordando la preocupación por la irritación cutánea. Además, la utilización del achiote en geles desinfectantes ofreció beneficios prácticos y medioambientales al ser un producto natural, reduciendo la dependencia de sustancias químicas sintéticas y contribuyendo a la creación de artículos sostenibles y seguros para el usuario.

1.5.3. Justificación metodológica

El estudio se centró en la eficacia del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) como desinfectante de manos. Se destacó la importancia de una metodología rigurosa, eligiendo cepas bacterianas relevantes y utilizando un diseño no experimental in vitro con controles positivos y negativos. Se aseguró la integridad de los compuestos activos durante el proceso de extracción del aceite esencial utilizando el método de destilación por arrastre a través del vapor. La evaluación se realizó mediante pruebas de difusión en agar y conteo de unidades formadoras de colonias, respaldado por análisis estadísticos sólidos. Esta metodología ética y completa buscó proporcionar resultados confiables y contribuir al avance del conocimiento en desinfectantes basados en productos naturales.

Capítulo II

Marco teórico

2.1. Antecedentes del problema

2.1.1. Antecedentes internacionales

Coronel (2020) en su investigación denominada El achiote (*Bixa orellana L.*) como antimicrobiano y antioxidante natural para la industria cárnica, se llegó al resultado de que el polvo de *Bixa orellana L.* exhibió una concentración baja de inhibición en relación con *Bacillus cereus* y *Streptococcus mutans* ATCC 25175. No obstante, los resultados revelaron que el extracto de metanol obtenido de las semillas de achiote demostró una destacada acción antimicrobiana frente a diversas cepas bacterianas. Entre ellas, se destacan su eficacia ante *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Mycobacterium abscessus* y *Staphylococcus aureus*. (17)

Aguilar (2019) en la tesis titulada Determinación de actividades biológicas y Tamiz Fitoquímico de *Bixa orellana L.* de la Península de Yucatán, señaló que los extractos de metanol de *Bixa orellana L.* exhibieron una acción antimicrobiana más pronunciada contra bacterias clasificadas como gramnegativas tales como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en comparación con *Staphylococcus aureus*, clasificada como grampositiva. Este patrón indica una selectividad de la actividad hacia las bacterias Gramnegativas. (18)

Murillo (2019) en su informe denominado Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de achiote (*Bixa orellana L.*) sobre cepas de *Streptococcus mutans*, concluyó que los extractos a base de metanol de *Bixa orellana L.* a una concentración del 50 %, mostró una zona de inhibición de 6,25 mm sobre *Streptococcus mutans*. Por otra parte, al 100 % obtuvo 9,4 mm que según la escala utilizada (≥ 8 mm) denota un elevado efecto inhibitorio sobre esta bacteria. (19)

Robalino (2019) en la tesis denominada Eficacia antimicrobiana de aceites esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*), reportó que los aceites utilizados en el estudio demostraron un promedio de inhibición notable.

Específicamente, se observó un promedio de 11.11 mm de inhibición para el Tomillo (*T. vulgaris*), 5.98 mm para la Canela (*C. verum*), 15.38 mm para el Romero (*R. officinalis*) y 22.35 mm para el Laurel (*L. nobilis*) en relación con cepas bacterianas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*. Estos resultados subrayan la actividad diferencial de los aceites evaluados, destacando el potencial antimicrobiano, con valores más altos de inhibición observados en el caso del romero y el laurel en comparación con el tomillo y la canela. (20)

Franklin et al. (2023) en su investigación denominada “Extracto acuoso de urucum (*Bixa orellana* L.): actividad antimicrobiana, antioxidante y cicatrizante”, reportaron que, el extracto en concentraciones de 150 mg, 75 mg y 37,5 mg de colorante de achiote no mostró crecimiento visible en los medios inoculados con *S. aureus*, mientras que en los tubos inoculados con *Escherichia coli*, las concentraciones del extracto que se observó crecimiento visible fueron de 150 mg y 75 mg. Los datos demostraron que el extracto acuoso de achiote tiene acción antimicrobiana en concentraciones de 150 y 75 mg de colorante de achiote contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (21)

2.1.2. Antecedentes nacionales

Granados (2022) en su tesis titulada “Evaluación Antibacteriana in vitro de *Bixa orellana* L. en comparación de *Camellia Sinensis* frente al *Streptococcus Mautans* ATCC 25175”, llegó a la conclusión que a 100% de concentración, el extracto metanólico de *Bixa orellana* L. demostró un halo de 20.84 mm a las 48 horas siendo esta su mayor actividad antibacteriana, catalogándose como muy sensible de acuerdo con la escala de Duraffourd. (22)

Galván (2019), en su tesis denominada Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. sobre *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina, mencionó que, a 100 % de concentración se obtuvo una zona de inhibición de 18,1 mm considerándose según la CLSI que sí posee efectividad antibacteriana frente a *Salmonella typhi* ATCC 167. (23)

Montoya (2019) en su informe denominado Efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Bixa orellana* L. comparada con cefalexina, sobre *Proteus Mirabilis* ATCC 14028 estudio in vitro, demostró que, el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) a 100 % obtuvo un halo de 14.30 mm mostrando una ligera inhibición, no obstante no sobrepasa lo observado por la CLSI. (24)

Marcas (2021), en su investigación titulada Efecto antimicrobiano de extracto de hoja de *Bixa Orellana* L. frente a microorganismos causantes de infecciones vaginales demostró que, el extracto de *Bixa orellana* L. posee acción antibacteriana frente a bacterias anaerobias relacionadas

a la vaginosis bacteriana, lo que permitió realizar estudios para el uso terapéutico de esta maravillosa planta, la cual se podrá profundizar en estudios posteriores. (25)

Cervera (2022), en su tesis denominada Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de *Equisetum bogotense* Kunth "Cola de Caballo", *Piper aduncum* L. "Matico" y *Bixa Orellana* L. "Achiote" sobre *Staphylococcus aureus* se observó que, con concentraciones de 200 a 1000 mg/mL, *Bixa orellana* L. presentó zonas de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, variando entre 16.40 mm y 27.20 mm. (26)

Collantes (2019), en su informe titulado Efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* L. (Achiote) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, demostró que el *Streptococcus mutans* mostró susceptibilidad ante las concentraciones del 25 %, 50 % y 75 % de *Bixa orellana* L. Sus hallazgos indican que al aumentar la cantidad del extracto, igualmente se intensifica el tamaño de los halos de inhibición, evidenciando una relación directa entre la concentración utilizada y la capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. (27)

Márquez (2019), en su estudio Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* en diferentes concentraciones sobre cepa de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175, se observaron halos de inhibición a las 12 horas, variando según la concentración del aceite. A concentraciones del 25 %, 50 %, 75 %, y 100 %, se obtuvieron halos de 6.917 mm, 7.333 mm, 8.583 mm y 9.361 mm, respectivamente. Conforme a la escala de Duraffourd, se concluyó que *Minthostachys Mollis* exhibe un efecto positivo sobre *Streptococcus mutans*, aunque con sensibilidad baja. Por otra parte, se observa un aumento en el tamaño de los halos con concentraciones más altas, la magnitud de la inhibición sugiere una respuesta moderada, destacando la relevancia de tener en cuenta la cantidad del aceite para formular productos antimicrobianos efectivos contra esta bacteria. (28)

2.1.3. Antecedentes locales

Barón y Velásquez (2021), en su investigación titulada Eficacia antibacteriana del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, se empleó la técnica de difusión en pocillos para valorar su actividad. Asimismo, se realizaron pruebas con diferentes concentraciones del aceite, observándose halos de inhibición. A concentraciones del 50 %, 75 % y 100 %, se obtuvieron halos de 6,02 mm, 11,57 mm y 14,20 mm, respectivamente. Estos resultados sugieren una correlación directa entre la cantidad de aceite de muña y su habilidad para inhibir el crecimiento bacteriano, destacando así su potencial antimicrobiano. (29)

Chunga (2023) en su estudio Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre *Escherichia coli* realizado en el laboratorio de Blue Medical, Arequipa 2022, se evaluó

el efecto antibacteriano a través de un muestreo censal de 70 placas, utilizando cloranfenicol como control. Las concentraciones del 80 % y 100 % del aceite mostraron halos de inhibición más pronunciados ($17,780 \pm 0,4131$ mm y $19,050 \pm 0,6852$ mm, respectivamente). A concentraciones menores, los halos disminuyeron gradualmente. Por otro lado, el Tween 80 utilizado como control negativo, al 0 % de concentración no mostró efecto antibacteriano, mientras que el control positivo cloranfenicol demostró alta eficacia con un halo de $26,50 \pm 0,527$ mm. Estos resultados resaltan la relación concentración-dependiente del aceite de muña y su potencial antimicrobiano, sugiriendo implicaciones para el desarrollo de terapias y productos antimicrobianos. (30)

Aynaya et al. (2022), en su tesis denominado Efecto antimicrobiano del aceite esencial de jengibre sobre cepas de *Enterococcus faecalis* in vitro, Arequipa 2022, se evidenció una clara actividad antimicrobiana del aceite al 100 % contra *Enterococcus faecalis*, manteniendo una eficacia consistente con diámetros de inhibición de 12.00 mm a las 24 horas y 12.33 mm a las 48 horas. La clorhexidina al 0.12 % también mostró un efecto antimicrobiano confirmado sin diferencias significativas en el diámetro de inhibición a las 24 horas (14.53 mm) y a las 48 horas (14.87 mm). Sin embargo, al comparar ambos tratamientos, se concluyó que la clorhexidina supera al aceite esencial en la inhibición de cepas de *Enterococcus faecalis*. Estos hallazgos son importantes para la elección de agentes antimicrobianos en aplicaciones clínicas, destacando la eficacia superior de la clorhexidina en este contexto específico. (31)

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Bixa orellana L. (achiote)

2.2.1.1. Definición

Bixa orellana L. es un arbusto originario de las áreas tropicales de América. Forma parte de la familia Bixaceae y ha desempeñado un papel destacado en las prácticas culturales y tradicionales de diversas comunidades a lo largo de los siglos. (32)

2.2.1.2. Características generales

El *Bixa orellana* L. (achiote) posee una serie de características generales que definen esta planta y la hacen notable desde la perspectiva botánica y cultural. A continuación, se presentan algunas de sus características más destacadas: (32)

- Forma

Planta pequeña, con hojas perennes o caducas, que puede alcanzar entre 2 y 5 metros de altura, aunque en algunas ocasiones llega a los 10 metros. El diámetro del tronco oscila entre 20 y 30 centímetros a la altura del pecho. (32)

- ***Hojas copas***

Las copas de esta planta son redondas y densas, con hojas simples, grandes y brillantes. Las hojas tienen un extremo alargado en el ápice, tallos delgados y extendidos, con una base en forma de corazón. La longitud de las hojas oscila entre 9 y 19 cm, mientras que el ancho varía entre 8 y 11 cm. (32)

Figura 1. Hoja de *Bixa orellana* L. (achiote)



Nota. Tomado de “Diez años de adiciones a la flora del Perú”, por Ulloa y Zarucchi, 2004.

- ***Troncos ramas***

El tronco es redondeado, con ramas café claro, cuyas puntas tienen un matiz verdoso. (32)

- ***Corteza***

La capa exterior es de tono marrón suave y tiene grietas que permiten separarla en tiras largas. Al retirarla, se revela una superficie interna amarilla o amarillo anaranjada con una secreción naranja. (32)

- ***Flores***

Los capullos son grandes y coloridos, agrupados en racimos terminales. Cada racimo tiene de 2 a 4 capullos coloridos. Las flores tienen un diámetro de 4 a 5.5 centímetros. (32)

Figura 2. Flores de *Bixa orellana* L. (achiote)



Nota. Tomado de “Diez años de adiciones a la flora del Perú”, por Ulloa y Zarucchi, 2004.

– **Fruto**

Tiene una forma redondeada sea hemisférica, ovalada, elíptica o puntiaguda, de 3 a 5 cm de longitud, está cubierta de pequeñas espinas suaves así mismo se encuentra una capsula con apariencia suave o lisa. Cada fruto alberga de 10 a 40 semillas, las cuales tienen una forma puntiaguda o tridimensional, con una base de 3 a 4 milímetros y una altura de 3 a 4 milímetros. Sin embargo, se hallan envueltas en una película delgada y pálida, asimismo tiene una capa roja y cremosas se encuentra el colorante o tinte. A medida que el fruto madura, emergen en la parte externa de las semillas, pequeñas protuberancias rojizas que eventualmente las envuelven por totalidad. (32)

Figura 3. Frutos de *Bixa orellana* L. (achiote)



Nota. Tomado de “Diez años de adiciones a la flora del Perú”, por Ulloa y Zarucchi, 2004.

– **Semillas**

Triángulos de color rojo, compactos y diminutos, de 5 a 5.5 mm de longitud y de 4 a 5 mm de grosor, con una pulpa roja y un albumen carnososo. (32)

Figura 4. Semillas de *Bixa orellana* L. (achiote)



Nota. Tomado de “Diez años de adiciones a la flora del Perú”, por Ulloa y Zarucchi, 2004.

- ***Raíz***

Sistema de raíces principal largo y penetrante.

- ***Sexualidad***

Hermafrodita.

- ***Número cromosómico.***

2n = 14, 16.

- ***Nombres comunes.***

Bijo, Axuty, Attalo, Atase (v. Shipibo), Aroto, Apisiri (v. Chontaquiرو), Apo'E (v. Ese'je), Apijiri (v. Piro), Anotto, Anate, Annatto (Ingles), Anate, Aisiri (v. Chontaquiرو), Achiotillo, Achi-huiti, Acafrán, Aciote, Acosi (v. Andoki), Abujo-Majaricke, Abujo, Achote Amarillo, Achote, Achiote. (32)

- ***Usos tradicionales.***

Se empleaban las hojas como emplasto para mitigar molestias de cabeza. y se preparaba una decocción para realizar gárgaras en casos de afecciones de garganta. Históricamente, se empleaba la masa en abrasiones para evitar la generación de ampollas y llagas. (32)

2.2.1.3. Composición química de la hoja de achiote

La composición química de las hojas del aceite de achiote es extremadamente diversa, revelando una amplia gama de compuestos bioactivos que contribuyen a sus propiedades particulares. Este aceite destaca por diversos elementos, los cuales se detallan en la **Tabla 1**: (32)

Tabla 1. Composición química

Elementos	Cantidad en %
Humedad	11.92
Proteína	12.82
Extracto etéreo	5.22
Fibra cruda	13.85
Pentosanos	11.35
Pectina	0.35

Azucres totales	9.76
Almidón	13.17
Carbohidratos totales	47.9
Taninos	0.34
Ceniza	6.92
Carotenoides totales	1.48

Nota: adaptado del “Manual técnico ecología del cultivo de achiote (*Bixa Orellana L.*)” por Amaya, 2014.

2.2.1.4. Clasificación taxonómica

La clasificación a nivel taxonómico de *Bixa orellana L.* (achiote), según la nomenclatura botánica propuesta por Linneo, se detalla en distintos niveles jerárquicos que nos brindan una comprensión sistemática de su posición en el reino vegetal. Esta proporciona una estructura sistemática que sitúa a esta planta en el contexto evolutivo de otras especies vegetales, facilitando su identificación y comprensión en el vasto panorama de la biodiversidad. (32)

En ese sentido, la **Tabla 2** presenta de manera organizada y jerárquica la clasificación taxonómica de *Bixa orellana L.* (achiote), desde niveles generales como el reino y la división, hasta niveles más específicos como el género, la especie.

Tabla 2. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliofita
Superdivisión	Espermatofita
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledonea)
Subclase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Familia	Bixaceae
Género	<i>Bixa</i>
Especie	<i>Bixa orellana L.</i>

Nota: adaptado del “Manual técnico ecología del cultivo de achiote (*Bixa Orellana L.*)” por Amaya, 2014.

2.2.1.5. *Constituyente químico de Bixa orellana L. (achiote)*

En el análisis del achiote, se han reconocido hasta treinta y cinco elementos diversos, lo que destaca la complejidad química de esta planta. Entre los componentes mencionados, se destacan algunos porcentajes significativos, como el acetato de (ZE)-farnesilo con un 11,6 %, el acetato de occidentalol con un 9,7 %, el espatulenol con un 9,6 %, el ishwarane con un 9,1 %. Sin embargo, los constituyentes más prominentes son la bixina y la norbixina. Estas dos sustancias, presentes en las semillas, son los mayores contribuyentes a las propiedades colorantes del achiote. La proporción total de bixina y norbixina puede variar considerablemente, con valores comunes oscilando entre el 2 % y el 5 % del peso seco de las semillas, aunque se han registrado niveles superiores, alcanzando hasta el 7 %. (32)

Es importante señalar que la bixina, se concentra especialmente en la pulpa que rodea las semillas. Este componente puede representar hasta un 3% del peso de la pulpa, aportando a esta parte del achiote su característico color rojo a anaranjado. Estas complejas combinaciones químicas en el achiote no solo son responsables de sus propiedades colorantes, sino que también sugieren la presencia de diversos compuestos que podrían tener potenciales beneficios medicinales y funcionar como elementos bioactivos. La variabilidad en la concentración de estos componentes destaca la importancia de entender la estructura química precisa del achiote para aprovechar sus usos en varios sectores, desde la industria alimenticia hasta la investigación médica. (32)

Además de los componentes previamente mencionados, el achiote exhibe una rica composición química que abarca una diversidad de sustancias. Entre estos constituyentes adicionales se encuentran la acetona, la achiotina, orelina, apocarotenoides, trans-bixina, un metil éster, carotenoides y ácido tomentósico, según lo informado por estudios como los de Morrison y colaboradores en 1991, así como el trabajo de Schneider en 1965. Estos compuestos contribuyen a la complejidad química de la planta, revelando una variedad de propiedades y potenciales aplicaciones. Adicionalmente, en el análisis químico del Achiote se ha informado la presencia de un cuerpo de terebintinos, lo que sugiere la existencia de compuestos resinosos que podrían tener implicaciones en términos de propiedades físicas y químicas únicas. Además, se ha identificado un ácido graso en su contenido, ampliando aún más la diversidad de componentes presentes en esta planta. (33)

A. *Constituyente químico en las hojas.*

Las hojas de *Bixa orellana L.* exhiben una compleja y rica composición química, ofreciendo una gama diversa de compuestos que contribuyen a sus propiedades particulares. Algunos de los componentes notables encontrados en las hojas incluyen: (33)

– **Terpenos**

- Bixaganeno e Ishwarano: estos son aceites esenciales pertenecientes a la categoría de mono y sesquiterpenos, que no solo otorgan a las hojas su aroma característico, sino que también pueden tener propiedades terapéuticas. (33)

– **Flavonoides**

- Estos flavonoides contribuyen a las propiedades antioxidantes y potencialmente antiinflamatorias de las hojas. Además, la presencia de flavonas, antocianidinas y sesquiterpenlactonas amplía la diversidad de compuestos con posibles beneficios para la salud. (33)

– **Carotenoides**

- Estos pigmentos carotenoides no solo son responsables del color característico de las hojas, sino que también poseen propiedades antioxidantes y beneficios para la salud, especialmente las vitaminas A y provitamina A. (33)

– **Otros componentes**

- Ácido tomentósico: un diterpeno con propiedades biológicas que podrían contribuir a la actividad farmacológica de las hojas.

- Vitaminas (A, B, y C): Importantes para el funcionamiento adecuado del organismo y su salud general.

2.2.1.6. Propiedades medicinales.

A. Propiedades antimicrobianas.

Las propiedades antimicrobianas de *Bixa orellana L.*, han sido objeto de diversos estudios. Se ha evidenciado que extractos de diferentes componentes poseen actividad antimicrobiana in vitro. Estudios han demostrado que el extracto alcohólico de la corteza inhibe microorganismos como *Neisseria gonorrhoea*.

Asimismo, los extractos de achiote también han mostrado efectos inhibitorios sobre varias bacterias, incluyendo *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, así como en el crecimiento de diferentes cepas bacterianas. Además, la medicina tradicional colombiana ha empleado extractos etanólicos, hexánicos y acuosos para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos, confirmando su actividad antimicrobiana in vitro. Estos hallazgos sugieren que *Bixa orellana L.* podría ser una valiosa fuente de compuestos con propiedades

antimicrobianas, destacando su potencial en la búsqueda de nuevos agentes contra microorganismos patógenos. (33)

B. Propiedades antioxidantes.

Se ha observado que la norbixina experimenta un aumento significativo en la viabilidad celular, incrementándola al menos diez veces. También se ha confirmado que la norbixina muestra propiedades antimutagénicas, reduciendo la actividad mutagénica inducida por H₂O₂ hasta en un 87 %. (33)

C. Propiedades antileishmánica y antifúngica.

El achiote ha mostrado propiedades antileishmánicas y antifúngicas, según estudios los extractos de achiote (*Bixa orellana L.*) demostró actividad significativa. Específicamente, se observó que el achiote tiene un CMI de 0,078 mg/mL, destacando su eficacia contra formas promastigotas de *Leishmania* y hongos como *Cryptococcus neoformans*. Estos hallazgos sugieren el potencial del achiote como agente antileishmánico y antifúngico, respaldando así su uso en la medicina tradicional para abordar diversas infecciones y desórdenes inflamatorios. (33)

2.2.2. Aceites esenciales

2.2.2.1. Definición

Los aceites esenciales son compuestos de origen natural y con aromas característicos, se obtienen de partes de las plantas como hojas, raíces, frutos, semillas y otros componentes botánicos. Estos aceites son altamente concentrados y contienen los aromas característicos de las plantas de las que se derivan. Además de su fragancia, los aceites esenciales también pueden tener propiedades terapéuticas y se emplean en una diversidad de usos, como aromaterapia, cuidado de la piel, masajes y más. (34)

Cuando se somete a vapor de agua un material vegetal, como una planta aromática, se libera una concentrada mezcla de sustancias volátiles con aroma, que se conoce como aceite esencial. Estos aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en el ámbito vegetal. Alrededor de 60 a 80 de los 295 grupos de plantas producen esencias naturales con propiedades únicas: textura oleosa, alta volatilidad, solubles en aceites y solventes orgánicos, pero no en agua. Estos líquidos son inflamables y son clave en la generación de los distintivos olores, colores y sabores de las plantas, siendo generalmente menos densos que el agua. (34)

2.2.2.2. Composición química de los aceites

Los aceites esenciales están principalmente compuestos por hidrocarburos terpénicos, que pueden tener una distribución limitada de aroma. Sin embargo, los componentes menos abundantes son responsables del distintivo aroma del aceite esencial y se agrupan en diversas

familias químicas, como terpenos, aldehídos, ácidos, alcoholes, fenoles, ésteres, cetonas, y otros compuestos. Estas familias químicas desempeñan un papel crucial en la compleja composición y las propiedades sensoriales de los aceites esenciales. (34)

2.2.2.3. Extracción de los aceites

A. Destilación por arrastre a vapor.

La destilación es un proceso meticuloso que requiere habilidad y atención constante. Para conseguir aceites esenciales de excelente calidad, el destilador sigue estrictas normativas y utiliza conocimientos especializados para extraer la esencia pura de la planta sin ninguna alteración. Durante la destilación, el vapor pasa a través de un recipiente que contiene flores, hojas, semillas o madera. Luego, el vapor que contiene el aceite esencial se condensa en un serpentín bajo control preciso de la presión. El esenciero, antes conocido como jarrón florentino, recolecta tanto el agua como el aceite esencial, aprovechando la diferencia de densidad entre ambos líquidos. Este proceso garantiza la captura y preservación de las propiedades naturales y aromáticas de la planta original. (35)

2.2.3. Bacilos

Los bacilos son un tipo de forma bacteriana que se caracteriza por ser alargada y cilíndrica, con forma de bastón o tubo. Estos pueden variar en tamaño y pueden ser cortos o largos. Esta forma bacteriana es una de las varias formas morfológicas que pueden tomar las bacterias (36).

2.2.3.1. Bacilos gramnegativos

Estos microorganismos tienen una estructura celular más compleja con una delgada capa de peptidoglicano envuelta por una membrana externa constituida principalmente de lípidos. Debido a esta configuración única, estas bacterias no retienen el colorante cristal violeta durante el proceso de tinción de Gram, lo que ocasiona que se observen teñidas de tonos rojos o rosados. (36)

A. *Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 25922 es una cepa proveniente de *Escherichia coli*, que se utiliza comúnmente en laboratorios de microbiología y en la investigación científica. La designación "ATCC 25922" se refiere al número de catálogo utilizado por el American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que mantiene y distribuye cultivos microbianos de referencia para fines de investigación y diagnóstico. (37)

Escherichia coli es una bacteria gramnegativa que se encuentra en el intestino de las personas y otros seres vivos. (37) La cepa ATCC 25922 en particular ha sido ampliamente

estudiada y se utiliza como un estándar de referencia en diversas aplicaciones microbiológicas, incluyendo:

- Control de calidad: se utiliza para verificar la exactitud y la consistencia de los métodos de ensayo microbiológico en laboratorios clínicos y de investigación. (38)

- Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos: es utilizada como una cepa de referencia para evaluar la susceptibilidad de las bacterias a los tratamientos antibióticos. Esto es significativo para determinar qué antibióticos son efectivos contra diferentes cepas bacterianas y ayudar en la elección del tratamiento adecuado. (39)

- Investigación: Los científicos pueden usar esta cepa en investigaciones relacionadas con la biología, la genética y la patogenicidad de *E. coli*. Además, es una de las cepas utilizadas como control en estudios epidemiológicos y de vigilancia de enfermedades infecciosas. (40)

2.2.3.2. *Bacilos grampositivos.*

Estas bacterias se caracterizan por tener una pared celular con una gruesa capa de peptidoglicano, lo cual les permite retener el tinte cristal violeta durante la tinción de Gram. Como resultado, las bacterias Gram positivas aparecen de color púrpura o azul oscuro después de este proceso. (36)

A. *Bacillus subtilis.*

Se trata de una bacteria con características Gram positivas que puede subsistir en condiciones tanto con oxígeno como sin él. Su forma es la de un bacilo unicelular que ocasionalmente se agrupa en cadenas y tiene la habilidad de desarrollar una estructura protectora llamada endospora, que le brinda resguardo contra colorantes y otros elementos químicos y físicos. La mayor parte de su pared celular está compuesta por aproximadamente un 75% de fosfolípidos. Además, esta bacteria tiene la capacidad de prosperar en un entorno mínimo sin necesidad de diversos factores de crecimiento. (41)

Bacillus subtilis ATCC 6633 es una cepa específica de la bacteria *Bacillus subtilis*, que es ampliamente estudiada y utilizada en la investigación científica y en aplicaciones industriales debido a sus propiedades y características útiles. (41)

- Control de calidad: se utiliza el *Bacillus Subtilis* ATCC 6633 en laboratorios de microbiología para los controles de calidad, validaciones y/o verificaciones de los ensayos, medios de cultivo y todo procedimiento o proceso dentro del área de microbiología u otras áreas como la ambiental o industrial. (42)

- Modelo de estudio: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 es un organismo modelo ampliamente utilizado en microbiología y biología molecular. Su simplicidad genética y su capacidad para formar esporas hacen que sea una excelente opción para estudiar procesos biológicos fundamentales, como la replicación del ADN, la transcripción y la regulación génicas. (43)

- Estándar bien caracterizado: el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 es una cepa bien caracterizada y ampliamente reconocida. Su uso como control proporciona una referencia estandarizada que los investigadores pueden utilizar para comparar resultados y verificar la precisión de sus experimentos. (44)

- Esperanza de vida de las esporas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 es capaz de formar esporas resistentes al calor y a otros factores adversos. Esto lo hace adecuado para pruebas de esterilización y validación de procesos que requieren la resistencia de las esporas. (45)

- Evaluación de la eficacia de agentes antimicrobianos: En la industria farmacéutica y de productos químicos, se utiliza como control para probar la eficacia de agentes antimicrobianos, como desinfectantes y conservantes. Si el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 se inactiva correctamente en presencia de estos agentes, se considera que son efectivos. (46)

2.2.4. Unidades formadoras de colonias

La unidad formadora de colonias (UFC) es estimada como una medición utilizada para cuantificar bacterias. Asimismo, refiere al número mínimo de células individuales que pueden ser separadas en la superficie o dentro de un agar semifluido y que resultan en la formación de una colonia visible, que puede estar compuesta por decenas de millones de células. (47)

2.3. Definición de términos básicos

2.3.1. Actividad antimicrobiana

Capacidad que posee una sustancia para eliminar o inhibir a un microorganismo. (36)

2.3.2. Etnobotánica

Ciencia encargada del estudio de la relación de los grupos locales y plantas. (33)

2.3.3. Enteropatógenos

Microorganismos causantes de enfermedades dentro del tracto intestinal. (33)

2.3.4. Enterobacterias

Familia de bacilos gramnegativos que tienen como hábitat natural al tubo gastrointestinal. (33)

Capítulo III

Hipótesis y variables

3.1. Hipótesis

3.1.1. Hipótesis general.

No aplica, de acuerdo con lo expresado por Hernández et al., la formulación de hipótesis se reserva para situaciones en las que se realiza una predicción concreta de un hecho o dato. (48)

3.2. Identificación de variables

Variable única: poder bactericida.

Dimensiones.

- Dosis del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote).
- Reencuentro de colonias *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Reencuentro de colonias *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

3.3. Operacionalización de Variables:

Tabla 3. Operacionalización de las variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Operacionalización		
					Tipo de variables		Escala de Medición
					Según su naturaleza	Según su función	
Poder bactericida	Sustancias que tienen efecto inhibitorio sobre las enzimas de las bacterias.	La capacidad bactericida del aceite se evaluó utilizando la técnica de observación mediante una dilución al 0,5, conforme a la escala de McFarland. Este proceso implicó la aplicación directa del aceite en cultivos de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.	Dosis del aceite esencial de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	Control	Cuantitativa	Independiente	Numérica de Razón
				50 µl			
				100 µl			
				200 µl			
				500 µl			
			Reencuentro de colonias <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Número de unidades formadoras de colonia (UFC)	Cuantitativa	Independiente	Numérica de Razón
			Reencuentro de colonias <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Número de unidades formadoras de colonias (UFC)	Cuantitativa	Independiente	Numérica de Razón

Capítulo IV

Metodología

4.1. Métodos, tipo y nivel de la investigación

4.1.1. Método de la investigación

El método empleado fue el método científico. Reyes et al., define al método científico como un instrumento utilizado en las investigaciones para determinar la falsedad o veracidad de diversos postulados a través de un conjunto de pasos o etapas (49). Por tal razón, se optó por la aplicación del método científico, ya que dicho enfoque posibilitó el abordaje de preguntas específicas, la realización de experimentos controlados para evaluar la eficacia del aceite y la presentación de hallazgos respaldados por evidencia científica. Asimismo, este procedimiento aseguró la credibilidad y confiabilidad de los resultados, aspectos fundamentales en la investigación científica.

4.1.2. Tipo de la investigación

El tipo de investigación fue básica; puesto que, según Baena los estudios de tipo básica son empleados en todo ámbito de la ciencia para comprender y amplificar conocimientos acerca del comportamiento de diversos fenómenos, con el objetivo de colaborar a futuras investigaciones (50). A raíz de lo anterior, se empleó un enfoque de investigación básica en este proyecto, ya que esta indagación desempeña un papel preliminar en la investigación de las características bactericidas del aceite de achiote, para proporcionar datos descriptivos que servirán como base para estudios futuros.

4.1.3. Alcance de la investigación

La presente investigación fue de nivel descriptivo simple; Hernández et al., clasifica al nivel descriptivo simple como un enfoque o una etapa en la investigación científica y estadística en la que se recopilan, organizan y presentan datos de manera objetiva y detallada sin realizar inferencias o generalizaciones más allá de los datos observados (48). En ese sentido, la investigación fue descriptiva porque se enfocó en describir las propiedades del aceite esencial de achiote relacionadas con su capacidad bactericida, como la cantidad requerida para inhibir el

crecimiento bacteriano, los tipos de bacterias contra los que es efectivo y las condiciones óptimas para su uso.

4.2. Diseño de la investigación

El diseño de la tesis fue no experimental, transversal, prospectivo; ya que, según Hernández et al., (48) las investigaciones transversales se fundamentan en recopilar datos únicamente en un momento determinado. Respecto al diseño no experimental, Arias et al. (51), sustentan que el diseño no experimental acontece cuando el investigador no asume el control de las variables; por ende, cada participante del estudio se evalúa dentro de su entorno natural sin ningún cambio. Con respecto a lo previamente indicado, se exhibe la siguiente ilustración que describe el diseño de investigación implementado.

M: _____ Ox

Dónde:

- M: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.
- Ox: Observación.

4.3. Población y muestra

4.3.1. Población

La población o universo es definida como un conjunto conformado por individuos, animales o cosas que coinciden en sus características (52). En ese sentido, la población del presente estudio estuvo constituida por *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

4.3.2. Muestra

Una muestra es un subconjunto o parte de una población (53). En tal sentido, la muestra estuvo constituida por *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

El método de muestreo seleccionado para este estudio fue de tipo no probabilístico por conveniencia, fundamentado en los siguientes criterios específicos de inclusión y exclusión.

A. Criterios de inclusión

- Cepas certificadas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus Subtillis* 6633.

B. Criterios de exclusión

- Cepas que no estén debidamente certificadas.
- Cepas ATCC que no correspondan a los códigos utilizados.

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección y análisis de datos

4.4.1. Técnica

Se implementó la técnica de observación. Según Peña, la técnica de observación implica la adquisición de información mediante la atención y el detallado registro de los acontecimientos en un entorno particular (54). En este contexto, la técnica de observación permitió una evaluación directa y visual del poder bactericida del aceite esencial de achiote. Al observar las placas de cultivo bacteriano después de la exposición al aceite, se pudo identificar cambios en la viabilidad bacteriana, tales como la ausencia de crecimiento, proporcionando una indicación clara de la eficacia del aceite contra las bacterias estudiadas.

4.4.2. Instrumento

Un instrumento de acuerdo con Muñoz es el dispositivo que utilizan los investigadores para analizar detenidamente los fenómenos que estudian y recogen los datos pertinentes (55). En este estudio, para llevar a cabo el conteo de unidades formadoras de colonias, se empleó una ficha de recolección de datos diseñada específicamente para este propósito. Esta ficha se ha adjuntado en el **Anexo 3** y sirvió como una herramienta esencial para registrar y organizar los resultados obtenidos durante el proceso de cultivo y conteo de colonias bacterianas. La ficha de recolección de datos se diseñó de manera cuidadosa y detallada para garantizar que se registre cada aspecto relevante del proceso.

A. Diseño

El instrumento consta de ítems organizados según las dimensiones, dividido en dos secciones: Una de control, donde se llevó a cabo la verificación del aceite, agar Müller Hilton y la cepa, tanto de *Escherichia coli* ATCC 25922 como de *Bacillus Subtilis* ATCC 6633, con el fin de determinar su viabilidad. En la segunda parte, se documentó la actividad bactericida de *Bixa orellana* L. (achiote) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus Subtilis* ATCC 6633 en cuatro cantidades diferentes: 50 µl, 100 µl, 200 µl y 500 µl.

B. Confiabilidad

La confiabilidad, según menciona Hernández et al. (48), es el grado en que el instrumento produce un resultado consistente y coherente; no obstante, solo es calculada en instrumentos de medición ya sea con modelos dicótomos o de escala de Likert. Por lo que, en caso del estudio, al ser el instrumento una ficha de registro de datos, la confiabilidad no procedió.

C. Validez

No es necesario ya que se trata de una ficha de recolección de datos de los registros obtenidos.

4.5. Técnicas de análisis de datos

De acuerdo con Muñoz las técnicas de análisis de datos constituyen el conjunto de métodos y procedimientos empleados para explorar, interpretar y extraer información significativa de los datos recolectados en un estudio (55). En este contexto, el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS versión 26 como herramienta principal. Se implementaron diversas técnicas descriptivas con el propósito de explorar y comprender los datos recogidos. Para las variables categóricas nominales, se aplicaron estadísticos descriptivos como las frecuencias absolutas y relativas, proporcionando así una mirada minuciosa de la distribución de los datos en estas categorías. En cuanto a las variables numéricas, se emplearon medidas de tendencia central, incluyendo la mediana, media y moda. Estas medidas ofrecieron una representación central de los datos, permitiendo identificar valores típicos en la muestra. Además, se utilizaron las medidas de dispersión, como la desviación típica y la varianza, para evaluar la dispersión y la variabilidad de los datos numéricos, brindando una comprensión más completa de la distribución y la consistencia de los datos. En conjunto, este enfoque metodológico proporcionó una exploración exhaustiva de las características tanto cualitativas como cuantitativas de los datos, facilitando la interpretación y el análisis exhaustivo de los resultados alcanzados.

4.5.1. Procedimiento de la investigación

El procedimiento de la investigación señala Ñaupas et al., es el conjunto ordenado de pasos y acciones sistemáticas que se llevan a cabo para alcanzar un objetivo específico en un estudio científico (56). En este sentido, el procedimiento de esta investigación comprendió siete pasos fundamentales, cada uno diseñados para avalar la robustez y la validez de los resultados alcanzados.

1. Recolección de hojas de achiote

Martínez et al., mencionan que la recolección debe realizarse de manera que se obtenga una muestra adecuada y que no esté contaminada ni alterada (57). Por ello, se realizó la recopilación de 80 kilogramos de hojas de achiote, un proceso crucial que garantizó la obtención de un material vegetal representativo y de calidad para las fases subsiguientes del estudio.

2. Extracción del aceite por arrastre a vapor

La extracción del aceite por arrastre es un método utilizado para obtener aceites esenciales de plantas mediante la aplicación de vapor. En este proceso, el vapor pasa a través del material vegetal, liberando los compuestos volátiles, que luego se condensan para formar el aceite esencial (58). Par este estudio, en un entorno controlado, se implementó la técnica de extracción del aceite de las hojas de achiote mediante el método de arrastre a vapor. Este proceso, reconocido por su eficiencia en la adquisición de aceites esenciales, aseguró la preservación de los compuestos volátiles presentes en el achiote.

3. Selección de cepas y medio de cultivo

De acuerdo con Ardiles et al., la selección de cepas y medio de cultivo implica elegir cepas bacterianas específicas y el medio nutritivo adecuado para su crecimiento. Las cepas deben ser representativas de los microorganismos que se desean estudiar (58). En este contexto, se procedió con la selección de las cepas bacterianas, identificando con precisión las cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para garantizar la representatividad de los microorganismos en estudio. Asimismo, se optó por el medio de cultivo Agar Müller Hinton, reconocido por su consistencia y confiabilidad en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

4. Control de calidad

Martínez et al., mencionan que las pruebas de calidad tienen como propósito asegurar que los productos y procedimientos cumplan con los requisitos establecidos y sean adecuados para su uso previsto (57). En ese sentido, para asegurar la idoneidad de los componentes utilizados, se llevaron a cabo controles de calidad. El Agar Müller Hinton se sometió a incubación a una temperatura de 37 °C durante 24 horas, verificándose la ausencia de colonias para confirmar su viabilidad. Asimismo, de manera análoga, el aceite de *Bixa orellana* L. se sembró en medio Müller Hilton, observándose la no presencia de colonias posterior al tiempo, asegurando la integridad del aceite. Por otra parte, las cepas bacterianas se evaluaron en Agar Müller Hilton, confirmando su viabilidad a través de la observación de los atributos de crecimiento.

5. Evaluación de la turbidez según la escala de McFarland

La evaluación de la turbidez según la escala de McFarland es un método utilizado para ajustar la concentración de una suspensión bacteriana. Se compara la turbidez de la suspensión bacteriana con una serie de estándares conocidos de la escala de McFarland para asegurar que la concentración bacteriana sea uniforme y adecuada para pruebas posteriores (57). Para este estudio se tomaron colonias de las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando un asa bacteriológica, trasladándolas a un tubo de ensayo con 5 ml de NaCl. La turbidez de las bacterias se ajustó a la escala McFarland de 0.5, siguiendo los protocolos específicos.

6. Evaluación del poder bactericida

Ardiles et al., mencionan que la evaluación del poder bactericida es un proceso para determinar la capacidad de una sustancia, como un aceite esencial, para matar bacterias. En este método, las suspensiones bacterianas se distribuyen uniformemente sobre un medio de cultivo, y luego se aplican diferentes concentraciones de la sustancia a probar (58). En este estudio las suspensiones bacterianas se distribuyeron uniformemente sobre el Agar Mueller-Hinton utilizando un hisopo de algodón. Luego, se procedió a aplicar el aceite de *Bixa orellana* L. (achiote) directamente sobre el agar previamente inoculado con las cepas seleccionadas, utilizando concentraciones de 50 µl, 100 µl, 200 µl y 500 µl. Cada bacteria fue sometida a un

total de 5 pruebas para cada concentración. Después de un periodo de incubación de 24 horas a la temperatura óptima de 37 °C, se llevó a cabo el recuento de unidades formadoras de colonias, el cual se ejecutó meticulosamente, registrando con precisión la cantidad correspondiente para facilitar una interpretación precisa de los resultados.

7. Lectura

La lectura en un experimento microbiológico se refiere al análisis y cuantificación de los resultados obtenidos después del período de incubación (58). Para este proyecto, el resultado se midió en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), lo que proporcionó una cuantificación exacta del poder bactericida del aceite de *Bixa orellana L.*

4.6. Consideraciones éticas

La investigación se llevó a cabo en cumplimiento con el Código de Ética de la Universidad Continental, especialmente respetando los Principios Éticos detallados en el punto 6. Estos principios incluyen la honestidad (6.1), responsabilidad (6.2) y rigor (6.3) en la ejecución del estudio, así como la transparencia, justicia y verdad (6.4) en su desarrollo. Además, se siguieron las políticas que regulan el comportamiento en todas las etapas del trabajo, la divulgación de datos y el cumplimiento de las normativas de investigación, incluyendo medidas contra el plagio. Asimismo, los investigadores están dispuestos a aceptar cualquier medida que surja en caso de incumplimiento de estos preceptos éticos.

Capítulo V

Resultados y discusión

5.1. Presentación de resultados

5.1.1. Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 50 μ l de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote)

A. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 50 μ l de achiote

Tabla 4. Resultados con 50 μ l de aceite para *Escherichia coli* ATCC 25922

Bacteria	Observación	UFC (0 μ l)	UFC (50 μ l)	UFC inhibidas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	OBS 1	1663	1150	513
	OBS 2	1546	1032	514
	OBS 3	1591	1079	512
	OBS 4	1651	1140	511
	OBS 5	1554	1040	514

Nota. Fuente propia.

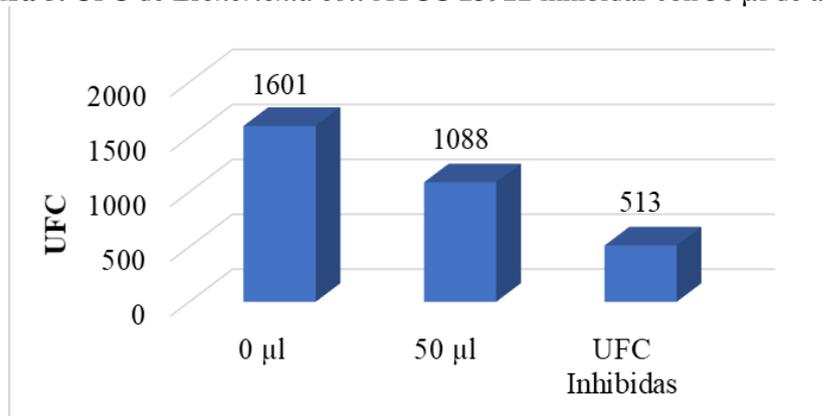
La **Tabla 4** presenta los resultados de cinco ensayos repetitivos utilizando 50 μ l de aceite esencial de achiote contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Se observó una disminución en las UFC inhibidas en cada ensayo: 513, 514, 512, 511 y 514 UFC, respectivamente. Cada observación (OBS 1 a OBS 5) muestra una disminución notable en las unidades formadoras de colonias (UFC) con respecto al grupo control (0 μ l). Los valores de UFC inhibidas oscilaron entre 511 y 514 en cada observación, lo que sugiere el poder bactericida del aceite de achiote, mostrando inhibición del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922 en diferentes condiciones experimentales.

Tabla 5. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 50 μ l de aceite

Descripción	0 μ l	50 μ l	UFC inhibidas
Promedio	1601	1088	513
Mínimo	1546	1032	511
Máximo	1663	1150	514
Desviación estándar	54	55	1
Total UFC inhibidas			513
% UFC inhibidas			32

Nota. Fuente propia.

Figura 5. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 50 µl de aceite



Nota. Fuente propia.

En la **Tabla 5** y **Figura 5** se observa que en el grupo control, que no recibió aceite (0 µl), el promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) fue de 1601, con un mínimo de 1546 y un máximo de 1663. Con la adición de 50 µl de aceite de achiote, el promedio de UFC disminuyó significativamente a 1088, con un rango más estrecho de valores, desde 1032 hasta 1150. La desviación estándar de 1 sugiere una consistencia en los datos en torno al promedio, lo que respalda la fiabilidad de los resultados obtenidos. Además, el total de UFC inhibidas fue de 513, lo que indica una supresión efectiva del crecimiento bacteriano en todas las muestras tratadas. Estos resultados indican una reducción del 32 % en la cantidad de bacterias inhibidas con la aplicación del aceite esencial de achiote. Por lo tanto, se evidencia una tendencia positiva hacia la capacidad bactericida del aceite de *Bixa orellana* L. contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

B. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 50 µl de achiote

Tabla 6. Resultados con 50 µl de aceite para *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacteria	Observación	UFC (0 µl)	UFC (50 µl)	UFC inhibidas
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	OBS 1	2500	21	2479
	OBS 2	2484	11	2473
	OBS 3	2519	19	2500
	OBS 4	2493	14	2479
	OBS 5	2557	25	2532

Nota. Fuente propia.

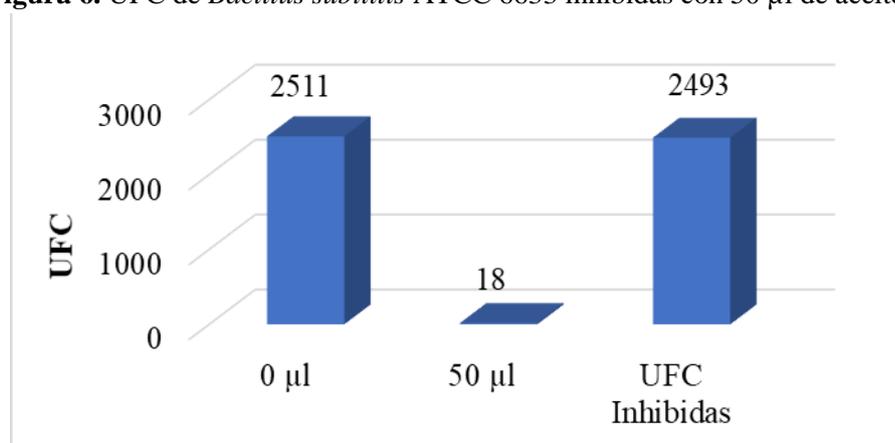
Las observaciones de la **Tabla 6** revelan una marcada tendencia hacia la inhibición del crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mediante la adición de 50 µl de aceite de achiote. En cada una de las cinco observaciones realizadas (OBS 1 a OBS 5), se observó una reducción en las UFC en comparación con el grupo control que no recibió aceite (0 µl). Los valores de UFC inhibidas variaron considerablemente, oscilando entre 2473 y 2532 en los diferentes ensayos. Este rango de valores demuestra una consistencia en la capacidad del aceite de achiote para suprimir el crecimiento bacteriano en múltiples condiciones experimentales.

Tabla 7. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 50 µl de aceite

Descripción	0 µl	50 µl	UFC inhibidas
Promedio	2511	18	2493
Mínimo	2484	11	2473
Máximo	2557	25	2532
Desviación estándar	29	6	24
Total UFC inhibidas			2493
% UFC inhibidas			99.3

Nota. Fuente propia.

Figura 6. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 50 µl de aceite



Nota. Fuente propia.

En la **Tabla 7** y

% UFC inhibidas	99.3
------------------------	-------------

Nota. Fuente propia.

Figura 6 se observa que, en comparación con el grupo control que no recibió aceite (0 µl), se observó una reducción notable en las UFC en todas las muestras tratadas. Los valores de UFC inhibidas variaron dentro de un rango estrecho, con un promedio de aproximadamente 2493 UFC. Esto representa una disminución significativa desde un promedio de 2511 UFC en el grupo control. Además, se observaron valores mínimos y máximos de UFC inhibidas de alrededor de 2473 y 2532 respectivamente. La desviación estándar de 24 indica una consistencia en los datos en torno al promedio. Al calcular el porcentaje de inhibición, se puede observar que el aceite de achiote logró inhibir aproximadamente el 99.3 % del crecimiento bacteriano en comparación con el grupo control. Estos resultados destacan la notable actividad bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana* L. (achiote) contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y sugieren su potencial aplicación como agente antimicrobiano.

Comparando los resultados de la **Tabla 5** y **Tabla 7** se observa una clara disparidad en la sensibilidad bacteriana entre las dos cepas estudiadas con la dosis de 50 µl de achiote, con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 siendo significativamente más susceptible al aceite esencial que *Escherichia*

coli ATCC 25922. En conclusión, el aceite esencial de achiote demostró ser más eficaz en la inhibición de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en comparación con *Escherichia coli* ATCC 25922, con reducciones del 32% y 99.3% en las UFC inhibidas, respectivamente. En respuesta al primer objetivo planteado, se determinó que en promedio 513 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 y 2593 UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 fueron inhibidas con 50 μ l de aceite esencial de *Bixa orellana* L.

5.1.2. Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 100 μ l de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote)

A. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 100 μ l de achiote

Tabla 8. Resultados con 100 μ l de aceite para *Escherichia coli* ATCC 25922

Bacteria	Observación	UFC (0 μ l)	UFC (100 μ l)	UFC inhibidas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	OBS 1	1663	642	1021
	OBS 2	1546	523	1023
	OBS 3	1591	571	1020
	OBS 4	1651	630	1021
	OBS 5	1554	528	1026

Nota. Fuente propia.

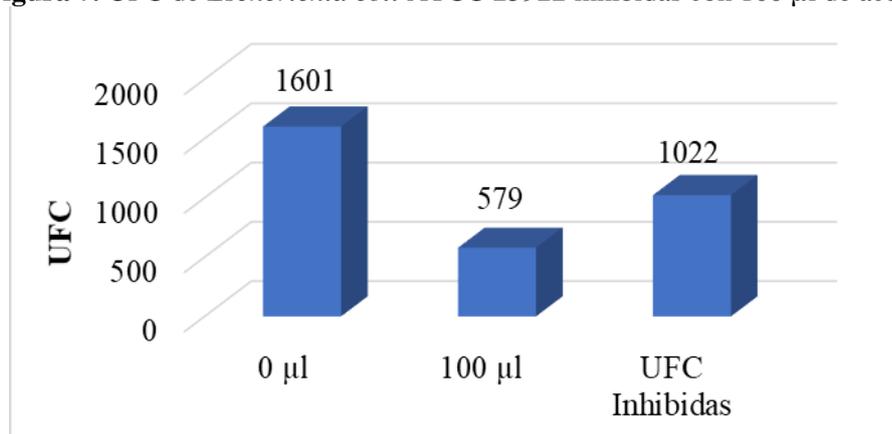
Los resultados de la **Tabla 8**, que examinó los efectos de 100 μ l de aceite en *Escherichia coli* ATCC 25922, se observa una reducción en las UFC en comparación con la ausencia de aceite. En cada una de las cinco observaciones realizadas (OBS 1 a OBS 5), se observó una disminución en las UFC en comparación con el grupo control que no recibió aceite (0 μ l). Los valores de UFC inhibidas oscilaron entre aproximadamente 1020 y 1026 en los diferentes ensayos. Estos resultados respaldan la idea de que el aceite esencial de *Bixa orellana* L. (achiote) tiene un potencial prometedor como agente antimicrobiano contra *Escherichia coli* ATCC 25922, indicando una clara tendencia hacia la acción bactericida de este compuesto.

Tabla 9. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 100 μ l de aceite

Descripción	0 μ l	100 μ l	UFC inhibidas
Promedio	1601	579	1022
Mínimo	1546	523	1020
Máximo	1663	642	1026
Desviación estándar	54	56	2
Total UFC inhibidas			1022
% UFC inhibidas			63.8

Nota. Fuente propia.

Figura 7. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 100 µl de aceite



Nota. Fuente propia.

En la **Tabla 9** y **Figura 7** se observa que con la aplicación de 100 µl de aceite, se logró inhibir en promedio 1022 UFC de *E. coli*, en contraste con las 1601 UFC registradas en ausencia de aceite. Esto indica una eficacia consistente del aceite de achiote en inhibir el crecimiento bacteriano en múltiples condiciones experimentales. Además, se observó una tendencia clara en los resultados, con una reducción notable en las UFC en todos los ensayos realizados. Al calcular el porcentaje de inhibición, se determinó que el aceite de achiote logró inhibir aproximadamente el 63.8 % del crecimiento bacteriano en comparación con el grupo control. La desviación estándar de 2 sugiere una consistencia en los datos en torno al promedio. En resumen, estos hallazgos subrayan la destacada actividad bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y sugieren su potencial aplicación como agente antimicrobiano.

B. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 100 µl de achiote

Tabla 10. Resultados con 100 µl de aceite para *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacteria	Observación	UFC (0 µl)	UFC (100 µl)	UFC inhibidas
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	OBS 1	2500	12	2488
	OBS 2	2484	6	2478
	OBS 3	2519	10	2509
	OBS 4	2493	8	2485
	OBS 5	2557	16	2541

Nota. Fuente propia.

Los resultados presentados en la **Tabla 10** indican una significativa disminución en las UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 al emplear 100 µl de aceite de achiote. En cada una de las cinco observaciones (OBS 1 a OBS 5), se observó una reducción sustancial en las UFC en comparación con el grupo control que no recibió aceite. Los valores de UFC inhibidas oscilaron estrechamente entre 2478 y 2541, lo que denota una consistente capacidad del aceite de achiote para inhibir el crecimiento bacteriano en diversas condiciones experimentales. Este patrón

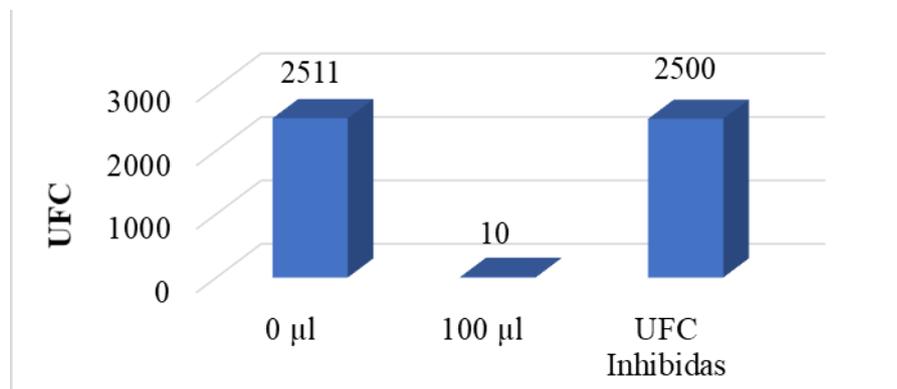
coherente de reducción en las UFC sugiere una tendencia clara hacia la acción bactericida del aceite de achiote contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Tabla 11. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 100 µl de aceite

Descripción	0 µl	100 µl	UFC inhibidas
Promedio	2511	10	2500
Mínimo	2484	6	2478
Máximo	2557	16	2541
Desviación estándar	29	4	26
Total UFC inhibidas			2500
% UFC inhibidas			99.6

Nota. Fuente propia.

Figura 8. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 100 µl de aceite



Nota. Fuente propia.

En la **Tabla 11** y

% UFC inhibidas	99.6
------------------------	-------------

Nota. Fuente propia.

Figura 8 se observa que la aplicación de 100 µl de aceite de achiote resultó en la inhibición de un promedio de 2500 UFC de *Bacillus subtilis*, en contraste con las 2511 UFC observadas en ausencia de aceite. Al calcular el porcentaje de inhibición, se determina que el aceite de achiote logró inhibir aproximadamente el 99.6 % del crecimiento bacteriano en comparación con el grupo control. La desviación estándar de 26 sugiere una consistencia en los datos en torno al promedio. Estos hallazgos subrayan la destacada actividad bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana* L. (achiote) contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y sugieren su potencial aplicación como agente antimicrobiano.

Comparando los resultados obtenidos de la **Tabla 9** y **Tabla 11** se evidencia una marcada diferencia en la susceptibilidad bacteriana entre las dos cepas estudiadas, con *Bacillus subtilis* mostrando una mayor sensibilidad al aceite esencial en comparación con *Escherichia coli*. En conclusión, el aceite de achiote demostró ser efectivo en la inhibición de ambas bacterias, con una

eficacia aún más pronunciada contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en comparación con *Escherichia coli* ATCC 25922, con reducciones del 63.8 % y 99.6 % en las UFC inhibidas, respectivamente, utilizando una dosis de 100 µl. En respuesta al segundo objetivo específico se puede mencionar que con 100 µl de aceite esencial de *Bixa orellana* L., se inhibieron en promedio 1022 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 y 2500 UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

5.1.3. Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 200 µl de aceite esencial *Bixa orellana* L. (achiote)

A. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 200 µl de achiote

Tabla 12. Resultados con 200 µl de aceite para *Escherichia coli* ATCC 25922

Bacteria	Observación	UFC (0 µl)	UFC (200µl)	UFC inhibidas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	OBS 1	1663	253	1410
	OBS 2	1546	134	1412
	OBS 3	1591	182	1409
	OBS 4	1651	241	1410
	OBS 5	1554	140	1414

Nota. Fuente propia.

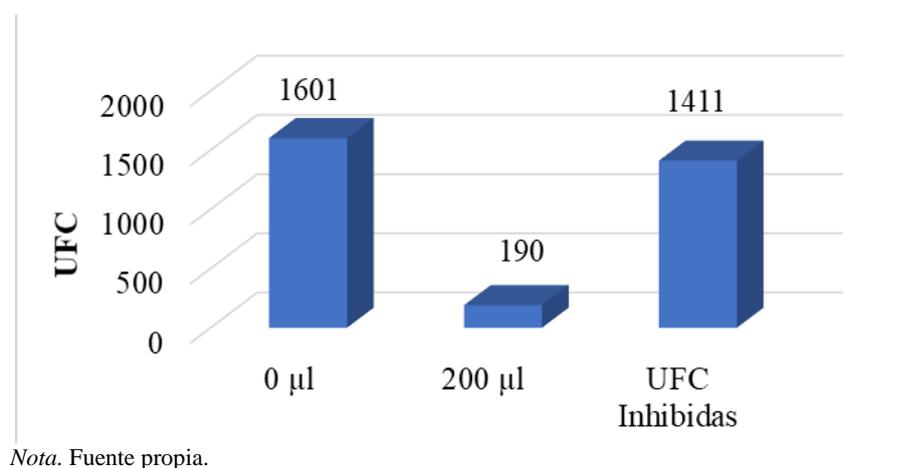
Los resultados de la **Tabla 12** revelan una marcada disminución en las UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras la aplicación de 200 µl de aceite de achiote. En cada una de las observaciones (OBS 1 a OBS 5), se observó una reducción considerable en las UFC en comparación con el grupo control que no recibió aceite. Los valores de UFC inhibidas varían entre 1410 y 1414, indicando una consistente capacidad del aceite de achiote para inhibir el crecimiento bacteriano en diferentes condiciones experimentales. Esta tendencia uniforme hacia una reducción en las UFC sugiere una clara eficacia del aceite de achiote contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Los resultados indican una notable actividad bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana* L. (achiote) contra esta cepa bacteriana en la concentración de 200 µl.

Tabla 13. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 200 µl de aceite

Descripción	0 µl	200 µl	UFC inhibidas
Promedio	1601	190	1411
Mínimo	1546	134	1409
Máximo	1663	253	1414
Desviación estándar	54	55	2
Total UFC inhibidas			1411
% UFC inhibidas			88.1

Nota. Fuente propia.

Figura 9. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 200 μ l de aceite



En la **Tabla 13** y

Descripción	0 μ l	200 μ l	UFC inhibidas
Promedio	1601	190	1411
Mínimo	1546	134	1409
Máximo	1663	253	1414
Desviación estándar	54	55	2
Total UFC inhibidas			1411
% UFC inhibidas			88.1

Nota. Fuente propia.

Figura 9 se observa una actividad inhibitoria creciente del aceite de aceite sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 al incrementar la dosis a 200 μ l. Se observa que se logró inhibir un total de 1411 UFC con esta dosis de aceite. Los valores de UFC inhibidas oscilan entre 1409 y 1414, lo que lo que sugiere el poder bactericida del aceite de achiote para inhibir el crecimiento bacteriano. Además, la desviación estándar de 2 indica una consistencia en los datos en torno al promedio obtenido. Al calcular el porcentaje de inhibición, se determina que el aceite de achiote logró inhibir aproximadamente el 88.1 % del crecimiento bacteriano en comparación con el grupo control que no recibió aceite. Esta disminución en las UFC sugiere una eficacia significativa del aceite de achiote como agente bactericida contra *Escherichia coli* ATCC 25922 en la dosis de 200 μ l.

B. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 200 μ l de achiote

Tabla 14. Resultados con 200 μ l de aceite para *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacteria	Observación	UFC (0 μ l)	UFC (200 μ l)	UFC inhibidas
<i>Bacillus subtilis</i>	OBS 1	2500	0	2500
	OBS 2	2484	0	2484
ATCC	OBS 3	2519	0	2519
6633	OBS 4	2493	0	2493

Nota. Fuente propia.

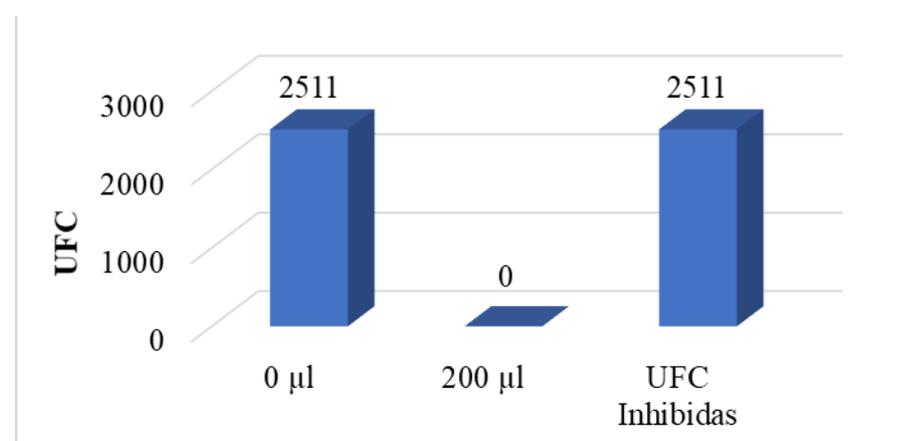
Los resultados de la **Tabla 14** muestran una tendencia clara hacia la inhibición completa del crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 con la aplicación de 200 µl de aceite esencial de *Bixa orellana* L. En cada una de las observaciones realizadas (OBS 1 a OBS 5), se observa que no se registró ninguna UFC en las muestras tratadas con aceite, en contraste con las muestras de control que no recibieron aceite. Esto indica una eficacia total del aceite de achiote en inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en las condiciones experimentales utilizadas. Los valores de UFC inhibidas se mantienen constantes en todos los casos, alcanzando las 2500 UFC inhibidas en cada observación.

Tabla 15. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 200 µl de aceite

Descripción	0 µl	200 µl	UFC inhibidas
Promedio	2511	0	2511
Mínimo	2484	0	2484
Máximo	2557	0	2557
Desviación estándar	29	0	29
Total UFC inhibidas			2511
% UFC inhibidas			100.0

Nota. Fuente propia.

Figura 10. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 200 µl de aceite



Nota. Fuente propia.

En la **Tabla 15** y **Figura 10** se observa una efectividad máxima del aceite esencial de *Bixa orellana* L. sobre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 al utilizar una dosis de 200 µl. Se logró inhibir un total de 2511 UFC con esta dosis de aceite. En cada observación, se registró la ausencia total de UFC en las muestras tratadas con aceite, lo que indica una eficacia completa del aceite de achiote en inhibir el crecimiento bacteriano en estas condiciones experimentales. Los valores de UFC inhibidas se mantuvieron constantes en todos los casos, alcanzando un máximo de 2557 y un mínimo de 2484 UFC inhibidas. Además, la desviación estándar de 29 indica una consistencia

en los datos en torno al promedio de aproximadamente 2511 UFC inhibidas. Al calcular el porcentaje de inhibición, se determina que el aceite de achiote logró inhibir el 100 % del crecimiento bacteriano en comparación con el grupo control que no recibió aceite. Esta tendencia uniforme hacia la inhibición completa del crecimiento bacteriano respalda la alta actividad bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana L.* contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en la dosis de 200 µl.

Al comparar los resultados de la **Tabla 13** y **Tabla 15** se concluye que el aceite esencial de *Bixa orellana L.* con una dosis de 200 µl. demostró ser altamente efectivo en la inhibición de ambas bacterias, siendo más eficaz contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 con una reducción del 100% en las UFC inhibidas, en comparación con *Escherichia coli* ATCC 25922 que presentó una reducción del 88.1 % en las UFC inhibidas, utilizando una dosis de 200 µl. En respuesta al tercer objetivo planteado, se concluye que con 200 µl de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, se inhibieron en promedio 1411 UFC en *Escherichia coli* ATCC 25922 y se logró una inhibición total en *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

5.1.4. Cantidad de UFC de bacterias inhibidas con 500 µl de aceite esencial *Bixa orellana L.* (achiote)

A. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 500 µl de achiote

Tabla 16. Resultados con 500 µl de aceite para *Escherichia coli* ATCC 25922

Bacteria	Observación	UFC (0 µl)	UFC (500µl)	UFC inhibidas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	OBS 1	1663	18	1645
	OBS 2	1546	11	1535
	OBS 3	1591	13	1578
	OBS 4	1651	16	1635
	OBS 5	1554	12	1542

Nota. Fuente propia.

Los resultados de la **Tabla 16**, que examinó la cantidad de UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 500 µl de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, muestran una reducción notable en las UFC en comparación con las condiciones sin aceite. Se observa una significativa disminución en las UFC en todas las observaciones realizadas (OBS 1 a OBS 5), en comparación con las muestras de control que no recibieron aceite. Los valores de UFC inhibidas varían entre 1535 y 1645, lo que denota una consistencia en la capacidad del aceite de achiote para inhibir el crecimiento bacteriano. Esta reducción notable en las UFC indica una alta eficacia del aceite de achiote como agente bactericida contra dicha bacteria en la dosis de 500 µl.

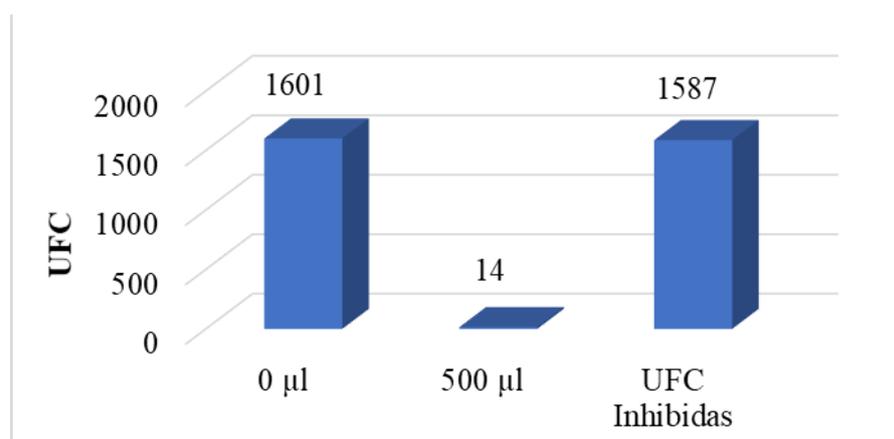
Tabla 17. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 500 µl de aceite

Descripción	0 µl	500 µl	UFC inhibidas
-------------	------	--------	---------------

Promedio	1601	14	1587
Mínimo	1546	11	1535
Máximo	1663	18	1645
Desviación estándar	54	3	51
Total UFC inhibidas			1587
% UFC inhibidas			99.1

Nota. Fuente propia.

Figura 11. UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 inhibidas con 500 µl de aceite



Nota. Fuente propia.

En la **Tabla 17** y

Descripción	0 µl	500 µl	UFC inhibidas
Promedio	1601	14	1587
Mínimo	1546	11	1535
Máximo	1663	18	1645
Desviación estándar	54	3	51
Total UFC inhibidas			1587
% UFC inhibidas			99.1

Nota. Fuente propia.

Figura 11 se evidencia una alta eficacia del aceite esencial de *Bixa orellana L.* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 al emplear una dosis de 500 µl. Se observa que se logró inhibir un total de 1587 UFC con esta dosis de aceite. Los valores de UFC inhibidas oscilan entre 1535 y 1645, lo que denota una variabilidad en la capacidad del aceite de achiote para inhibir el crecimiento bacteriano en diferentes observaciones. La desviación estándar de 51 indica cierta dispersión de los datos en torno al promedio de aproximadamente 1587 UFC inhibidas. Al calcular el porcentaje de inhibición, se determina que el aceite de achiote logró inhibir aproximadamente el 99.1 % del crecimiento bacteriano en comparación con el grupo control que no recibió aceite. Esta reducción notable en las UFC indica una alta eficacia del aceite de achiote como agente bactericida contra *Escherichia coli* ATCC 25922 en la dosis de 500 µl. La tendencia

general apunta hacia una inhibición significativa del crecimiento bacteriano, respaldando así el potencial del aceite esencial de *Bixa Orellana L.* como un agente antimicrobiano efectivo.

B. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 500 µl de Achiote

Tabla 18. Resultados con 500 µl de aceite para *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacteria	Observación	UFC (0 µl)	UFC (500 µl)	UFC inhibidas
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	OBS 1	2500	0	2500
	OBS 2	2484	0	2484
	OBS 3	2519	0	2519
	OBS 4	2493	0	2493
	OBS 5	2557	0	2557

Nota. Fuente propia.

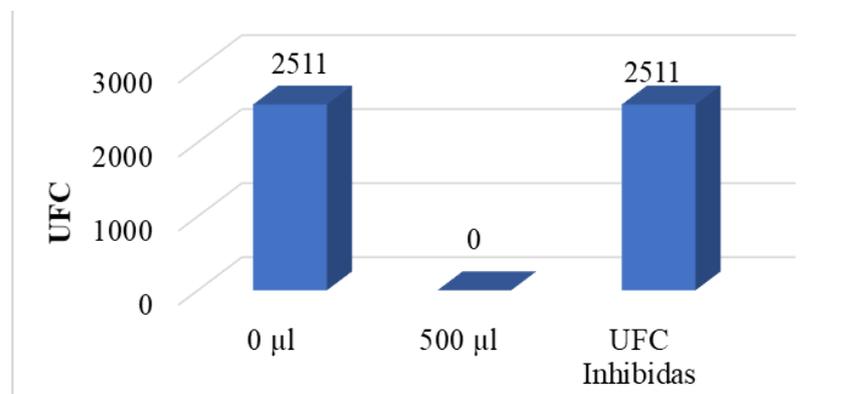
Los resultados de la **Tabla 18**, que evaluó la cantidad de UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 500 µl de aceite esencial de *Bixa orellana L.* En todas las observaciones realizadas (OBS 1 a OBS 5), se registró una ausencia total de unidades UFC en las muestras tratadas con aceite, en comparación con las muestras de control que no recibieron aceite. Los valores de UFC inhibidas fueron consistentes en todas las observaciones, alcanzando un máximo de 2557 y un mínimo de 2484 UFC inhibidas. Estos resultados indican una eficacia completa del aceite de achiote en inhibir el crecimiento bacteriano en las condiciones experimentales evaluadas.

Tabla 19. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 500 µl de aceite

Descripción	0 µl	500 µl	UFC inhibidas
Promedio	2511	0	2511
Mínimo	2484	0	2484
Máximo	2557	0	2557
Desviación estándar	29	0	29
Total UFC inhibidas			2511
% UFC inhibidas			100.0

Nota. Fuente propia.

Figura 12. UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibidas con 500 µl de aceite



Nota. Fuente propia.

En la **Tabla 19** y

% UFC inhibidas	100.0
------------------------	--------------

Nota. Fuente propia.

Figura 12 se observa una efectividad máxima del aceite esencial de *Bixa orellana L.* sobre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 al aplicar una dosis de 500 µl. Se observa que, en todas las observaciones realizadas, no se registró ninguna UFC en las muestras con aceite, lo que indica una inhibición total del crecimiento bacteriano. Tanto el valor mínimo como el máximo de UFC inhibidas fueron consistentes en todas las observaciones, alcanzando ambos un valor de 2484 y 2557 respectivamente. Además, la desviación estándar de 29 indica una consistencia en los datos en torno al promedio de aproximadamente 2511 UFC inhibidas. Al calcular el porcentaje de inhibición, se observa que el aceite de *Bixa orellana L.* logró inhibir el 100% del crecimiento bacteriano en comparación con el grupo control que no recibió aceite. Esta inhibición completa sugiere una alta eficacia del aceite de achiote como agente bactericida contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en la dosis de 500 µl. La tendencia general apunta hacia una inhibición total y uniforme del crecimiento bacteriano, respaldando así el potencial del aceite de achiote como un agente antimicrobiano altamente efectivo.

Al comparar los resultados de la **Tabla 17** y **Tabla 19** se concluye que la dosis de 500 µl de *Bixa orellana L.* demostró ser altamente efectivo en la inhibición de ambas bacterias, siendo completamente eficaz contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y muy eficaz contra *Escherichia coli* ATCC 25922, con reducciones del 100 % y 99.1 % en las UFC inhibidas, respectivamente. En respuesta al cuarto objetivo planteado, se concluye que con 500 µl de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, se inhibieron en promedio 1587 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922, y se logró una inhibición total en *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

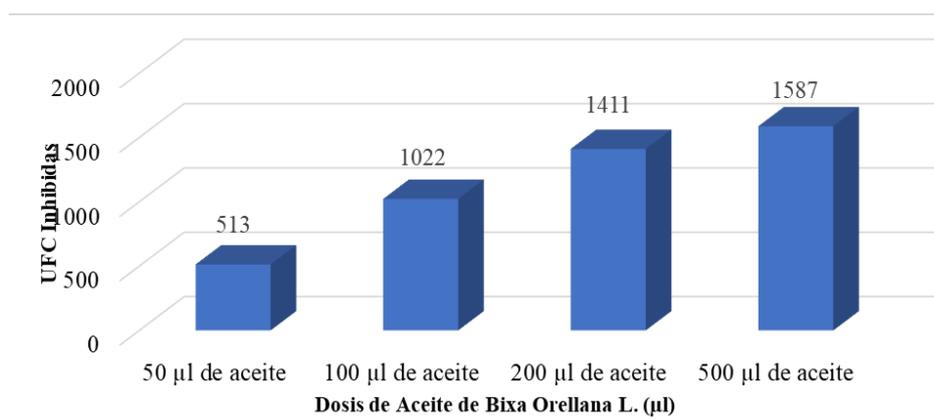
5.1.5. Resultado global del poder bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote)

Tabla 20. Resultado para *Escherichia coli* ATCC 25922

Bacteria	Dosis de Aceite de <i>Bixa orellana L.</i> (µl)	UFC inhibidas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50 µl de aceite	513
	100 µl de aceite	1022
	200 µl de aceite	1411
	500 µl de aceite	1587

Nota. Fuente propia.

Figura 13. Resultado para *Escherichia coli* ATCC 25922



Nota. Fuente propia.

La **Tabla 20** y

Bacteria	Dosis de Aceite de Bixa orellana L. (µl)	UFC inhibidas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50 µl de aceite	513
	100 µl de aceite	1022
	200 µl de aceite	1411
	500 µl de aceite	1587

Nota. Fuente propia.

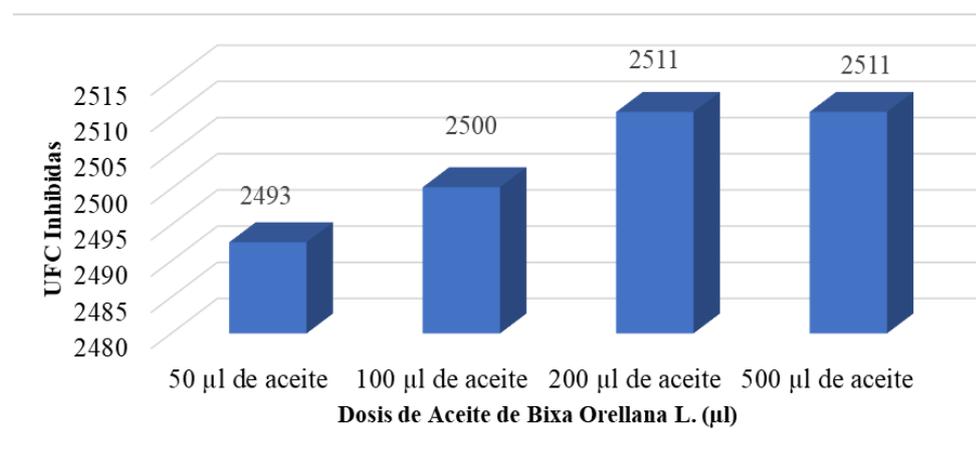
Figura 13 muestran en resumen los promedios de UFC inhibidos de *Escherichia coli* ATCC 25922 para cada dosis. Se observa una disminución considerable en la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Escherichia coli* ATCC 25922 a medida que se incrementa la dosis de aceite esencial de *Bixa Orellana L.* (achiote). Desde la ausencia de aceite hasta la dosis máxima de 500 µl, se observa una marcada incremento de bacterias inhibidas expresados en UFC. Específicamente, el promedio de UFC inhibidas pasó desde 1022 con la dosis de 50 µl hasta 1587 con la dosis de 500 µl.

Tabla 21. Resultado para *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacteria	Dosis de aceite de Bixa orellana L. (µl)	UFC inhibidas
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	50 µl de aceite	2493
	100 µl de aceite	2500
	200 µl de aceite	2511
	500 µl de aceite	2511

Nota. Fuente propia.

Figura 14. Resultado para *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Nota. Fuente propia.

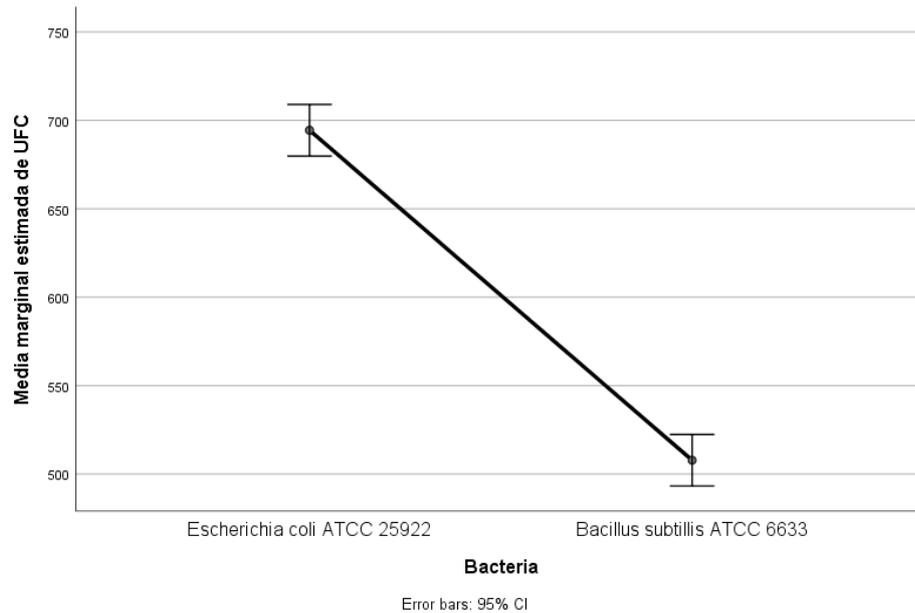
La **Tabla 21** y *Nota*. Fuente propia.

Figura 14 muestra en resumen los valores promedios de UFC inhibidos de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para cada dosis de aceite. Se observa un efecto notable del aceite esencial sobre la cantidad de UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633. A partir de una dosis mínima de 50 µl, se observa una disminución significativa en la cantidad de UFC, alcanzando un promedio de 2511 UFC con dosis de 200 µl y 500 µl, lo que significó una inhibición total de la bacteria. Específicamente, el promedio de UFC se redujo desde 2511 en la ausencia de aceite hasta 0 con las dosis de 200 µl y 500 µl.

Comparando los resultados de las **Tabla 20** y **Tabla 21**, se observa que las dosis más efectiva para inhibir el crecimiento bacteriano fue con 500ul para *Escherichia coli* ATCC 25922, consiguiendo 1587 UFC inhibidas; mientras que a partir de la dosis de 200ul se consiguió una inhibición completa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, es decir, se inhibieron 2511 UFC. En ambos casos se observó que a medida que se incrementó la dosis de aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) también se obtuvo mejor resultado en la inhibición de las bacterias. Estos resultados subrayan la eficacia del aceite esencial como agente bactericida y sugieren su potencial aplicación en el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas. La capacidad del aceite esencial para inhibir el crecimiento bacteriano, incluso en dosis bajas, destaca su relevancia como un posible agente antimicrobiano prometedor en el campo médico y de la salud pública.

5.1.6. Gráficos de medias marginales

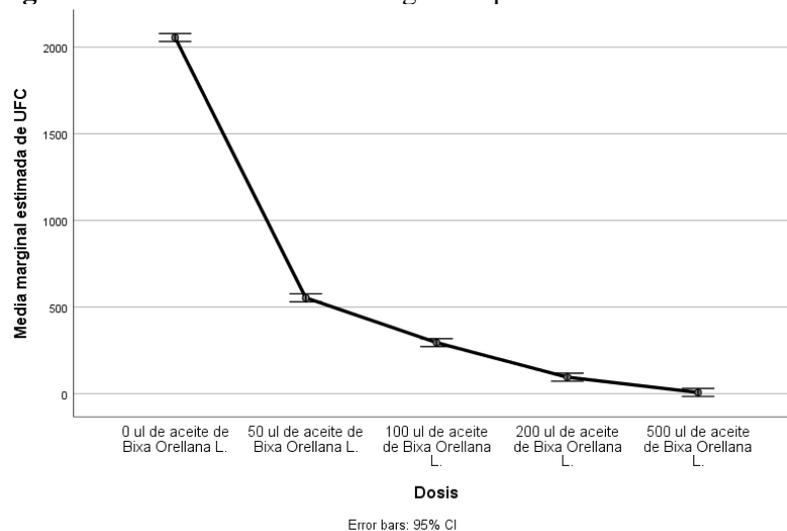
Figura 15. Gráfico de medias marginales por bacteria



Nota. Fuente propia.

En la **Figura 15**, el gráfico de medias marginales permite ver que existe una mayor reducción de UFC en la bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Mientras que la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922 presenta en promedio una mayor media estimada de UFC.

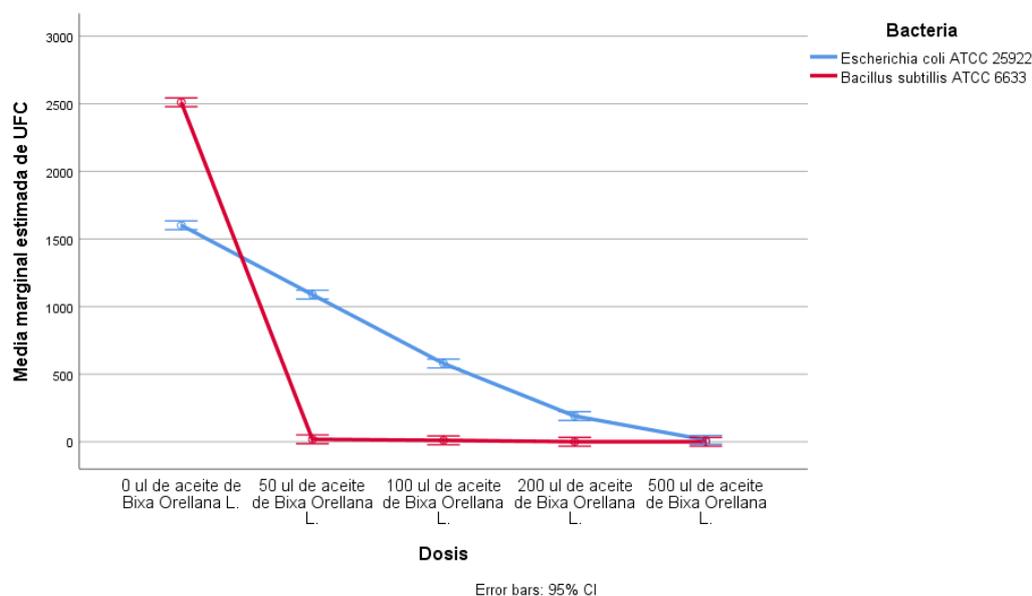
Figura 16. Gráfico de medias marginales por dosis



Nota. Fuente propia.

Por otra parte, en la **Figura 16**, se evidencia una marcada disminución en las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) promedio marginal al aumentar la dosis de aceite de *Bixa orellana* L. (achiote).

Figura 17. Comparación de las medias marginales



Nota. Fuente propia.

La **Figura 17** muestra que, al comparar las medias marginales de ambas bacterias según la dosis, se observa una tendencia distinta. Para la bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6633, el número estimado medio de (UFC) disminuye abruptamente a partir de la dosis de 50 μ l. Por otro lado, en el caso de *Escherichia coli* ATCC 25922, la cantidad estimada media de UFC disminuye de manera gradual con el aumento de la dosis de aceite de *Bixa orellana L.* (achiote).

5.2. Discusión de resultados

Respecto al resultado general donde las dosis más efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano fueron de 500 μ l para *Escherichia coli* ATCC 25922, inhibiendo 1587 UFC lo que significó una reducción del 99.1 % en las UFC, y a partir de 200 μ l para *Bacillus subtilis* ATCC 6633, obteniendo una inhibición completa. En cuanto a los estudios internacionales, el resultado se parece al de Aguilar (18), quien mencionó que el extracto metanólico de *Bixa orellana L.* demostró una mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, incluyendo *Escherichia coli*. Nuestros hallazgos respaldan esta afirmación al demostrar que las dosis más efectivas para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron de 500 μ l, logrando una reducción casi completa. Por otro lado, en el estudio de Coronel (17) se encontró una baja concentración de inhibición con respecto a *Bacillus cereus* y *Streptococcus mutans* ATCC 25175. A diferencia de este resultado, nuestro estudio mostró una inhibición completa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a partir de 200 μ l, lo que sugiere una mayor eficacia del aceite esencial de achiote contra esta cepa bacteriana en comparación con otras bacterias estudiadas por Coronel. Los resultados obtenidos en este estudio también son similares a los reportados por Franklin et al. (21), donde se observó una acción antimicrobiana del extracto acuoso de achiote en

concentraciones específicas contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Esta coincidencia refuerza la evidencia de las propiedades antimicrobianas del achiote. En relación con estudios nacionales, Granados (22), Galván (23), y Cervera (26) reportaron halos de inhibición significativos con concentraciones altas del extracto metanólico de *Bixa orellana L.*, lo cual concuerda con nuestros hallazgos de inhibición completa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a partir de 200 μ l. Estos resultados sugieren que el aceite esencial de achiote podría ser una alternativa eficaz para combatir diversas cepas bacterianas. Asimismo, Collantes (27) y Barón y Velásquez (29) destacaron una relación directa entre la concentración del extracto de achiote y la eficacia en la inhibición del crecimiento bacteriano. Nuestros resultados son coherentes con estos hallazgos, ya que se observó una reducción significativa en las UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922 con una concentración de 500 μ l y una inhibición completa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 con 200 μ l. Finalmente, en el contexto de otros aceites esenciales estudiados, como el aceite de muña y el aceite esencial de jengibre, se ha observado una relación directa entre la concentración del aceite y su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano, similar a los resultados obtenidos en este estudio con el aceite esencial de achiote.

Este resultado general también se alinea con la teoría sobre las propiedades antimicrobianas del achiote. Por ejemplo, estudios han evidenciado que extractos de diferentes partes de la planta, incluyendo la corteza y las hojas, poseen actividad antimicrobiana in vitro (33). Además, estos extractos han mostrado efectos inhibitorios sobre varias bacterias, incluyendo *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, lo cual respalda los hallazgos de la presente investigación (33). En cuanto a la composición química del achiote, la planta presenta una compleja combinación de compuestos bioactivos, entre los cuales destacan la bixina y la norbixina (32). Es relevante mencionar que la bixina ha mostrado poseer propiedades antimutagénicas y la norbixina ha demostrado proteger las células de *Escherichia coli* contra lesiones inducidas por radiación ultravioleta y peróxido de hidrógeno (33). Estos datos respaldan la eficacia observada del aceite esencial de achiote en la inhibición del crecimiento bacteriano. En relación con las propiedades medicinales del achiote, se ha documentado su actividad antimicrobiana in vitro contra agentes patógenos, incluyendo bacterias relacionadas con la diarrea y la disentería, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio. (33)

Con 50 μ l de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, se alcanzó una reducción del 32 % en *Escherichia coli* ATCC 25922 y del 99.3 % en *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Estos resultados se alinean con los hallazgos de Coronel (17) y Aguilar (18), quienes también encontraron actividad antimicrobiana significativa del extracto metanólico de achiote frente a *Escherichia coli* y otras bacterias Gram negativas. En contraste, Franklin et al. (21) reportaron una acción antimicrobiana del extracto acuoso de achiote en *Escherichia coli*, pero con diferencias en las concentraciones

utilizadas, lo que podría explicar las variaciones en la eficacia antimicrobiana. Robalino (20) mostró variabilidad en los promedios de inhibición con otros aceites esenciales, lo que sugiere que la composición química de los aceites podría influir en su actividad antimicrobiana. Además, Murillo (19) obtuvo resultados menores con el extracto metanólico en *Streptococcus mutans*, lo que podría indicar que la actividad antimicrobiana del achiote puede variar dependiendo de la bacteria evaluada.

Utilizando 100 µl de aceite esencial, se observó una reducción del 64.1 % en *Escherichia coli* ATCC 25922 y del 99.6 % en *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de Aguilar (18) y Franklin et al. (21), quienes encontraron una mayor actividad antimicrobiana del extracto metanólico de achiote frente a bacterias Gram negativas, especialmente *Escherichia coli*. Sin embargo, Robalino (20) mostró variabilidad en los promedios de inhibición con otros aceites esenciales, lo que podría deberse a diferencias en la composición química de los extractos. Murillo (19) observó un efecto inhibitorio del extracto metanólico sobre *Streptococcus mutans*, lo que sugiere que la actividad antimicrobiana del achiote puede ser específica para ciertas bacterias. Además, Coronel (17) destacó la actividad antimicrobiana de las semillas de achiote frente a diversas cepas bacterianas, incluida *Escherichia coli*, lo que respalda nuestros hallazgos.

Con 200 µl de aceite esencial, se registró una reducción del 88.1% en *Escherichia coli* ATCC 25922 y una inhibición total en *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Estos resultados se asemejan a los hallazgos de Murillo (19) y Collantes (27), quienes observaron un efecto inhibitorio del extracto metanólico en diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans* y una relación directa entre la concentración del extracto y la eficacia en la inhibición del crecimiento bacteriano, respectivamente. Sin embargo, Montoya (24) reportó un halo de inhibición menor con el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* L., lo que podría indicar diferencias en la actividad antimicrobiana entre los diferentes extractos de la planta. Cervera (26) mostró variabilidad en los halos de inhibición con diferentes concentraciones de extracto de *Bixa orellana* L. frente a *Staphylococcus aureus*, lo que sugiere que la actividad antimicrobiana puede variar dependiendo de la bacteria y la concentración del extracto. Asimismo, Galván (23) indicó la efectividad antibacteriana del extracto metanólico de *Bixa orellana* L. frente a *Salmonella typhi* ATCC 167, lo que sugiere un amplio espectro de actividad antimicrobiana del achiote.

Con 500 µl de aceite esencial, se logró una reducción del 99.1 % en *Escherichia coli* ATCC 25922 y una inhibición total en *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Este resultado es similar al de Cervera (26), quien demostró halos de inhibición de tamaño variable frente a *Staphylococcus aureus* con diferentes concentraciones de extracto de *Bixa orellana* L., lo que sugiere una relación concentración-dependiente en la actividad antimicrobiana del achiote. Además, Barón y

Velásquez (29), Chunga et al. (30), Collantes (27) y Márquez (28) también evidenciaron una relación directa entre la concentración del extracto y la capacidad inhibitoria, lo que refuerza la consistencia de nuestro hallazgo con los resultados previos.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el poder bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana* L. (achiote) están respaldados por la composición química diversa y compleja del achiote, así como por las propiedades antimicrobianas y antioxidantes previamente documentadas para esta planta. Estos hallazgos se alinean con estudios previos donde se destaca la eficacia del achiote contra diversas cepas bacterianas. Además, estudios nacionales, como los de Granados (22), Galván (23) y Montoya (24) respaldan la actividad antibacteriana del achiote en diferentes concentraciones y contra diferentes bacterias. Estos antecedentes, junto con los hallazgos de este estudio, aportan evidencia adicional sobre el potencial terapéutico del achiote y sugieren su utilidad como una fuente prometedora de compuestos con propiedades antimicrobianas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Los hallazgos de este estudio son de gran relevancia y apuntan a su potencial aplicación en el desarrollo de alternativas terapéuticas ante la creciente resistencia bacteriana.

Conclusiones

- Se determinó que el aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote) posee un notable poder bactericida. Se halló que las dosis más efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano fueron de 500 μ l para *Escherichia coli* ATCC 25922, logrando una inhibición de 1587 UFC y una reducción del 99.1% en las UFC, y de 200 μ l para *Bacillus subtilis* ATCC 6633, donde se observó una inhibición completa del crecimiento bacteriano. Estos resultados destacan la eficacia del aceite esencial de achiote como agente bactericida, sugiriendo su aplicación en el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas, lo cual es de gran relevancia para la medicina y la salud pública.
- Se determinó que con 50 μ l de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, se inhibieron 513 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922, representando una reducción del 32 %, y 2493 UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, lo que significa una reducción del 99.3 %. Esto evidencia una mayor eficacia del aceite de achiote contra *Bacillus subtilis* en comparación con *Escherichia coli*.
- Se halló que con 100 μ l de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, se inhibieron 10.22 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922, lo que representa una reducción del 64.1 %, y 2500 UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, con una reducción del 99.6 %. Estos resultados subrayan la efectividad del aceite esencial contra ambas bacterias, siendo más pronunciada contra *Bacillus subtilis*.
- Se concluyó que con 200 μ l de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, se inhibieron 1411 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922, lo que implica una reducción del 88.1%, y se logró una inhibición total en *Bacillus subtilis* ATCC 6633, representando el 100 % de inhibición. Esto refuerza la eficacia del aceite esencial de achiote, siendo más efectivo contra *Bacillus subtilis*.
- Finalmente, se determinó que con 500 μ l de aceite esencial de *Bixa orellana L.*, se inhibieron 1587 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922, representando una reducción del 99.1 %, y se logró una inhibición total en *Bacillus subtilis* ATCC 6633, representando el 100 % de inhibición. Estos hallazgos confirman la alta efectividad del aceite esencial de achiote como agente antimicrobiano, lo que lo posiciona como un recurso prometedor en el ámbito médico.

Recomendaciones

- Realizar investigaciones adicionales con el fin de explorar diversos aspectos de las propiedades bactericidas, para de esta manera abordar efectos a largo plazo, posibles sinergias con otras sustancias y las interacciones que podrían tener con diversas cepas bacterianas.
- Realizar una comparación entre la eficacia bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana* L. (achiote) y otros agentes antimicrobianos reconocidos, a fin de contextualizar el aceite en relación con tratamientos existentes, resaltando así sus posibles ventajas.
- Plantear la exploración de nuevas aplicaciones para el aceite esencial, considerando su inclusión en productos de cuidado personal, desinfectantes y la formulación de productos de limpieza para expandir el alcance y la utilidad potencial del aceite.
- Ampliar la investigación incorporando aceites esenciales provenientes de diversas plantas reconocidas por sus propiedades antimicrobianas para realizar comparaciones detalladas de los efectos bactericidas entre distintos aceites, facilitando la evaluación de posibles sinergias entre ellos.
- Aplicar la técnica de difusión directa en la evaluación de múltiples cepas bacterianas y compuestos para obtener una comparación más extensa de la eficacia de los diferentes elementos, proporcionando información valiosa sobre su potencial antimicrobiano.

Referencias bibliográficas

1. Ríos SdC, Ascencio MS, Ruiz LdM, Aguirre X, Pinzón LL, Santiago E, et al. Aprovechamientos del achiote (*Bixa orellana* L.) en una comunidad indígena de Oaxaca, México. *Agro-Divulgación*. 2022 diciembre; 2(6): p. 90-96.
2. Lourido HdIC, Martínez G. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Cubana de farmacia*. 2011 julio; 44(2): p. 231-244.
3. Chacaltana JJ, Larios MF, Soto MV, Rodríguez MÁ, Sarabia JO. Geles desinfectantes y antibacteriales con aceites esenciales. Tesis de bachiller. Lima: Universidad San Ignacio de Loyola, Facultad de ciencias de la empresa; 2020.
4. González L. Antisépticos y desinfectantes. Elsevier. 2003 marzo; 22(3): p. 64-70.
5. Food and Drug Administration. Food and Drug Administration. [Online].; 2021 [cited 2023 agosto 04].
6. Azcona L. Manos y uñas. Elsevier. 2003 marzo; 17(3): p. 72-77.
7. Fundación mexicana para la dermatología. Fundación mexicana para la dermatología. [Online].; 2020 [cited 2023 agosto 04].
8. Geles desinfectantes y antibacteriales con aceites esenciales. Tesis de pregrado. Lima: Universidad San Ignacio de Loyola, Facultad de ingeniería; 2020.
9. Ortuño MF. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. primera ed. Aiyana, editor. Madrid: Aiyana; 2006.
10. Llorens JA. Los aceites esenciales y su actividad biológica. *Anales de química*. 2021 mayo; 117(2): p. 165-170.
11. Douglas S, Rainer B. Plantas medicinales de los Andes y Amazonia. Primera ed. Trujillo: Biblioteca nacional del Perú; 2015.
12. Gallegos CDJ. Análisis de la variación somaclonal de plantas micropropagadas de achiote (*Bixa Orellana* L.). Título profesional. Mérida;; 2020.
13. Motta LE, Paucar SA. Toxicidad oral a 30 días del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) en ratas. Tesis profesional. Chimbote;; 2019.

14. Naranjo J, Dueñas Y, Calcedo O, Castrillón A. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de aceite de girasol (*Helianthus annuus*) adicionado con extracto de achiote (*Bixa orellana*) durante calentamiento en horno microondas. *Perspectivas en nutrición humana*. 2015 diciembre; 17(2).
15. Valarezo E, Torres S, Pineda N, Jaramillo X, Cartuche L, Morocho V, et al. Study of essential oil isolated from achiote (*Bixa orellana*). *Antibiotics*. 2023 marzo; 12(4).
16. Nascimento Y, Matos AP, Serra PV. Antimicrobial activity of the essential oil from *Bixa orellana* L. *Society and development*. 2020 octubre; 9(10).
17. Coronel SP. El achiote (*Bixa orellana* L.) como antimicrobiano y antioxidante natural para la industria cárnica. Tesis Profesional. Riobamba; 2020.
18. Aguilar DI. Determinación de actividades Biológicas y tamiz fitoquímico de *Bixa orellana* L. de la península de Yucatán. Título profesional. Caborca; 2019.
19. Murillo MdR. Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de achiote (*bixa orellana*) sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Título profesional. Quito; 2019.
20. Robalino AJ. Eficacia antimicrobiana de aceites esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*). Tesis de pregrado. Cevallos: Universidad técnica de Ambato, Facultad de ciencias agropecuarias; 2019.
21. Franklin V, M E, Wadt N, E E. Aqueous extract from urucum (*Bixa orellana* L.): antimicrobial, antioxidant, and healing activity. *Porto biomedical journal*. 2023 enero; 8(1): p. 186.
22. Granados LS. Evaluación antibacteriana in vitro de *Bixa orellana* en comparación de *Camellia Sinensis* frente al *Streptococcus Mautans* ATCC 25175. Título profesional. Lima; 2022.
23. Galván CA. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la hoja de *Bixa Orellana* L. sobre *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina. tesis profesional. Lima; 2019.
24. Montoya J. Efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Bixa Orellana* L. comparada con cefalexina, sobre *Proteus Mirabilis* ATCC 14028 estudio in vitro. Título profesional. Trujillo; 2019.

25. Marcas Gutiérrez. Efecto antimicrobiano de extracto de hoja de Bixa Orellana frente a microorganismos causantes de infecciones vaginales. Título profesional. Lima: Universidad nacional Federico Villareal, Lima; 2021.
26. Cervera YE. Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de Equisetum bogotense Kunth "Cola de Caballo", Piper aduncum L. "Matico" y Bixa Orellana L. "Achiote" sobre Staphylococcus aureus. Lambayeque; Cajamarca; 2022.
27. Collantes M. Efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de Bixa Orellana L. (Achiote) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175. Tesis de pregrado. Trujillo; 2019.
28. Márquez M. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del aceite esencial de Minthostachys Mollis en diferentes concentraciones sobre cepa de Streptococcus Mutans ATCC 25175. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Alas Peruanas, Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud; 2019.
29. Barón E, Velásquez A. Eficacia antibacteriana del aceite esencial de muña ((Minthostachys mollis) sobre cepas de Staphylococcus aureus. Tesis de pregrado. Huancayo: Universidad Roosevelt, Facultad de Ciencias de la Salud; 2021.
30. Chunga, Guzman, Luque. Efecto antibacteriano del aceite esencial de Mentha spicata L. sobre Escherichia coli realizado en el laboratorio de Blue Medical, Arequipa 2022. Tesis de pregrado. Huancayo: Universidad Continental, Facultad de Ciencias de la Salud; 2023.
31. Aynaya EG, Machicao JM, Nina RM. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de jengibre sobre cepas de Enterococcus faecalis in vitro, Arequipa 2022. Tesis de pregrado. Huancayo: Universidad Continental, Facultad de Ciencias de la Salud; 2022.
32. Amaya C. Manual técnico ecología del cultivo de achiote (Bixa Orellana L.). Primera ed. Amaya C, editor. El Salvador: Centa mag; 2015.
33. Instituto Nacional de la Salud. Achiote_Vademecum. Instituto Nacional de Salud. 2010 agosto; 1(18).
34. Dufort J. Aceites esenciales: una guía práctica para conocer las propiedades de los aceites esenciales y sus aplicaciones. Primera ed. Robinbook , editor. Barcelona: Robinbook; 2017.

35. Stichlmair J, Fair J. Distillation: principles and practices. Primera ed. Wiley , editor. Michigan: Wiley; 1998.
36. Forbes B. Diagnostico microbiológico. doceava ed. Madrid: Médica panamericana; 2009.
37. Minogue TD, Daligault HA, Davenport KW, Bishop KA, Broomall SM, Bruce DC, et al. Complete genome assembly of Escherichia coli ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. American society for microbiology. 2014 octubre; 2(5).
38. Pérez DC, Domínguez I, Olano E, Sosa AE. Estrategia de verificación de calidad de las cepas de Escherichia coli conservadas en la colección del centro de ingeniería genética y biotecnología. Vaccimonitor. 2010 abril; 19(1).
39. Sacsquispe RE, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto nacional de salud. 2002 febrero; 2(1).
40. Picazo J, Aviar I, Culebras E, Gómez M, López F. Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: estudio VIRA 2006. Elsevier. 2006 diciembre; 24(10): p. 617-628.
41. Klein C, Kalleta C, Entian K. La biosíntesis del antibiótico subtilina. artículo de investigación. Frankfurt: Johann Wolfgang Goeth; 1993. Report No.: DOI: [https://doi.org/10,1128/aem.59.1.296-303.1993](https://doi.org/10.1128/aem.59.1.296-303.1993).
42. Labcare. Labcare de Colombia. [Online].; 2023 [cited 2023 setiembre 27].
43. Traub W. Detection of antimicrobial drugs with Bacillus subtilis strain ATCC 6633. Chemotherapy. 1992 setiembre; 38(3).
44. Duitman E, Wyczawski D, Boven L, Venema G, Kuipers O, Hamoen. Novel methods for genetic transformation of natural bacillus subtilis isolates used to study the regulation of the Mycosubtilin and surfactin synthetases. Applied and environmental microbiology. 2007 junio; 73(11): p. 3490-3496.
45. Spicher P. Suitability of Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus spores as test organism bioindicators for detecting superheating of steam. Zentralbl hyg umweltmed. 1997 febrero; 199(5): p. 462-475.
46. Burguet N, Brito L, Cánovas I. Evaluación de la efectividad de un desinfectante mediante el método de placas de contacto. Revista cubana de farmacia. 2013 junio; 47(2).

47. Galarza Alonso JA. Cuantificación de unidades formadoras de colonias. México: universidad del valle México, microbiología industrial; 2020.
48. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. sexta ed. México: Mc Graw Hill; 2014.
49. Reyes E. Metodología de la investigación científica. Primera ed. México: Page publishing incorporated; 2022.
50. Baena G. Metodología de la investigación México: Patria; 2017.
51. Arias JL, Holgado J, Tafur TL, Vasquez MJ. Metodología de la investigación. primera ed. Sucari W, editor. Puno: Instituto Universitario de Innovación Ciencia y Tecnología Inudi Perú; 2022.
52. Rodríguez Y. Metodología de la investigación. Primera ed. Pereyra , editor. México: Klik Soluciones Educativas S.A.; 2020.
53. Niño VM. Metodología de la investigación. segunda ed. Bogotá: Ediciones de la U; 2021.
54. Peña B. Métodos científicos de observación en educación. primera ed. Madrid: Editorial vision libros; 2011.
55. Muñoz C. Metodología de la investigación. primera ed. México D.F.: Progreso S.A.; 2015.
56. Muñoz C. Metodología de la investigación. primera ed. México D.F.: Progreso S.A.; 2018.
57. Martínez MdLC, Briones R, Cortés JGR. Salud, metodología de la investigación para el área de la salud. segunda ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2018.
58. Ardiles L, Otero J, Barrios I. Metodología de la investigación para las ciencias de la salud. segunda ed. La Habana: Ciencias médicas; 2008.

Anexos

Anexo 1. Matriz de Consistencia

Título: Poder bactericida del aceite esencial de *Bixa orellana L.* (achiote).

Problema	Objetivos	Hipótesis	VARIABLES e indicadores	Metodología	Población y muestra	Técnicas e instrumentos
<p>Problema General:</p> <p>¿Cuál es el poder bactericida del aceite esencial de <i>Bixa orellana L.</i> (achiote) sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633?</p> <p>Problemas Específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 50 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote)? 2. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 100 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote)? 3. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 200 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote)? 4. ¿Cuántas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 500 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote)? 	<p>Objetivo General:</p> <p>Determinar el poder bactericida del aceite esencial de <i>Bixa orellana L.</i> (achiote) sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Evaluar cuántas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 50 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote). 2. Demostrar cuantas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 100 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote). 3. Evidenciar cuántas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 200 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote). 4. Demostrar cuántas unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 son inhibidas con 500 µl de aceite esencial <i>Bixa orellana L.</i> (achiote). 	<p>No aplica, de acuerdo con lo expresado por Hernández et al., la formulación de hipótesis se reserva para situaciones en las que se realiza una predicción concreta de un hecho o dato (48).</p>	<p>Variable única:</p> <p>1. Poder Bactericida</p> <p>Dimensiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dosis del aceite esencial de <i>Bixa orellana L.</i> (achiote) - <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 	<p>Tipo de Investigación: Básica.</p> <p>Nivel de Investigación: Descriptivo simple.</p> <p>Método General: Científico.</p> <p>Diseño: No experimental, transversal</p>	<p>Población:</p> <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.</p> <p>Muestra:</p> <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.</p> <p>Muestreo:</p> <p>No probabilístico por conveniencia.</p>	<p>Técnica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Observación <p>Instrumentos:</p> <p>Ficha de observación del Anexo 3.</p>

Anexo 2. Cuadro de Operacionalización de Variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Operacionalización		
					Tipo de variables		Escala de Medición
					Según su naturaleza	Según su función	
Poder Bactericida	Sustancias que tienen efecto inhibitorio sobre las enzimas de las bacterias.	La capacidad bactericida del aceite se evaluó utilizando la técnica de observación mediante una dilución al 0.5, conforme a la escala de McFarland. Este proceso implicó la aplicación directa del aceite en cultivos de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.	Dosis del Aceite esencial de <i>Bixa orellana</i> L. (achiote)	Control	Cuantitativa	Independiente	Numérica de Razón
				50 µl			
				100 µl			
				200 µl			
				500 µl			
			Reencuentro de colonias <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Número de unidades formadoras de colonia (UFC)	Cuantitativa	Independiente	Numérica de Razón
			Reencuentro de colonias <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Número de unidades formadoras de colonias (UFC)	Cuantitativa	Independiente	Numérica de Razón

Anexo 3. Instrumento

Ficha de recolección de datos

Bacteria	Poder bactericida de <i>Bixa orellana L.</i> (UFC)											
	Control			0 µl de aceite de <i>Bixa orellana L.</i>	50 µl de aceite de <i>Bixa orellana L.</i>	100 µl de aceite de <i>Bixa orellana L.</i>	200 µl de aceite de <i>Bixa orellana L.</i>	500 µl de aceite de <i>Bixa orellana L.</i>				
	Control de aceite (viable o no viable)	Control de Agar (viable o no viable)	Control de cepa (viable o no viable)									
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1
				OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2
				OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3
				OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4
				OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633				OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1	OBS 1
				OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2	OBS 2
				OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3	OBS 3
				OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4	OBS 4
				OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5	OBS 5

Anexo 4. Carta de autorización de obtención de datos



Año de la unidad la paz y el desarrollo

Solicito: permiso para usar las instalaciones del laboratorio del policlínico metropolitano Huancayo (Es salud)

Doctor: RICARDO LOPEZ DAVALOS, jefe del servicio de ayuda al diagnóstico y tratamiento del policlínico metropolitano Huancayo (Es salud)

Nosotros, **DANILO CAIRAMPOMA PECHO**, identificado con DNI 43004777 y **BETRIZ EVELYN MARTINEZ ECHEVARRIA**, identificada con DNI: 75193613. Estudiantes de la carrera de tecnología médica especialidad laboratorio clínico y anatomía patológica de la **UNIVERSIDAD CONTINENTAL** nos presentamos ante usted para solicitarle permiso para utilizar las instalaciones del laboratorio en el área de microbiología del policlínico metropolitano de Huancayo (Es salud), con la finalidad de realizar estudios para nuestra tesis que lleva como título " **PODER BACTERICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE BIXA ORELLANA L. (ACHIOTE)**" por esta razón pedimos su autorización para usar el servicio del laboratorio en el área de microbiología del policlínico metropolitano Huancayo.

Por lo tanto, rogamos acceda a nuestra solicitud.



Huancayo 28 de Setiembre de 2023

Danilo Cairampoma Pecho
DNI: 43004777

Beatriz Evelyn Martinez Echevarria
DNI: 75193613



Anexo 5. Aprobación del comité de ética



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

Huancayo, 14 de noviembre del 2023

OFICIO N°0706-2023-CIEI-UC

Investigadores:

DANILO CAIRAMPOMA PECHO
BEATRIZ EVELYN MARTINEZ ECHEVARRIA

Presente-

Tengo el agrado de dirigirme a ustedes para saludarles cordialmente y a la vez manifestarles que el estudio de investigación titulado: **PODER BACTERICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE BIXA ORELLANA L. (ACHIOTE)**

Ha sido **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo las siguientes precisiones:

- El Comité puede en cualquier momento de la ejecución del estudio solicitar información y confirmar el cumplimiento de las normas éticas.
- El Comité puede solicitar el informe final para revisión final.

Aprovechamos la oportunidad para renovar los sentimientos de nuestra consideración y estima personal.

Atentamente




Walter Calderón Gerstein
Presidenta del Comité de Ética
Universidad Continental

C.c. Archivo.

Arequipa

Av. Los Incas S/N,
José Luis Bustamante y Rivero
(054) 412 030

Calle Alfonso Ugarte 607, Yanahuara
(054) 412 030

Huancayo

Av. San Carlos 1080
(064) 481 430

Cusco

Urb. Manuel Prado - Lote B, N° 7 Av. Collasuyo
(084) 490 070

Sector Argosura KM. 10,
carretera San Jerónimo - Saylla
(084) 490 070

Lima

Av. Alfredo Mendola 5210, Los Olivos
(01) 213 2760

Jr. Junín 355, Miraflores
(01) 213 2760

Anexo 6. Constancia de validación de la hoja de achiote



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



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

CONSTANCIA N° 296-USM-2023

LA JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas) recibida de Danilo Cairampoma Pecho y Beatriz Evelyn Martinez Echevarria, estudiantes de la Universidad Continental; ha sido estudiada y clasificada como: *Bixa Orrellana L.* y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: VIOLALES

FAMILIA: BIXACEAE

GENERO: *Bixa*

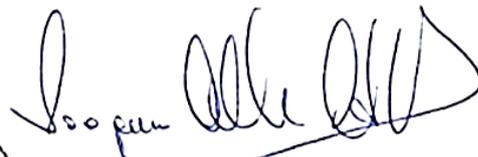
ESPECIE: *Bixa Orrellana L.*

Nombre vulgar: "achiote"

Determinado por: Mg. María Isabel La Torre Acuy

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.




Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Anexo 7. Base de Datos

Bacteria	Poder bactericida de <i>Bixa Orellana L.</i> (UFC)												
	Control			0 µl de aceite de <i>Bixa Orellana L.</i>	50 µl de aceite de <i>Bixa Orellana L.</i>	100 µl de aceite de <i>Bixa Orellana L.</i>	200 µl de aceite de <i>Bixa Orellana L.</i>	500 µl de aceite de <i>Bixa Orellana L.</i>					
	Control de aceite (viable o no viable)	Control de Agar (viable o no viable)	Control de cepa (viable o no viable)										
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Viable	Viable	Viable	OBS 1	1 663 UFC	OBS 1	1 150 UFC	OBS 1	642 UFC	OBS 1	253 UFC	OBS 1	18 UFC
				OBS 2	1 546 UFC	OBS 2	1 032 UFC	OBS 2	523 UFC	OBS 2	134 UFC	OBS 2	11 UFC
				OBS 3	1 591 UFC	OBS 3	1 079 UFC	OBS 3	571 UFC	OBS 3	182 UFC	OBS 3	13 UFC
				OBS 4	1 651 UFC	OBS 4	1 140 UFC	OBS 4	630 UFC	OBS 4	241 UFC	OBS 4	16 UFV
				OBS 5	1 554 UFC	OBS 5	1 040 UFC	OBS 5	528 UFC	OBS 5	140 UFC	OBS 5	12 UFC
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Viable	Viable	Viable	OBS 1	2 500 UFC	OBS 1	21 UFC	OBS 1	12 UFC	OBS 1	0 UFC	OBS 1	0 UFC
				OBS 2	2 484 UFC	OBS 2	11 UFC	OBS 2	6 UFC	OBS 2	0 UFC	OBS 2	0 UFC
				OBS 3	2 519 UFC	OBS 3	19 UFC	OBS 3	10 UFC	OBS 3	0 UFC	OBS 3	0 UFC
				OBS 4	2 493 UFC	OBS 4	14 UFC	OBS 4	8 UFC	OBS 4	0 UFC	OBS 4	0 UFC
				OBS 5	2 557 UFC	OBS 5	25 UFC	OBS 5	16 UFC	OBS 5	0 UFC	OBS 5	0 UFC

Anexo 8. Evidencias del desarrollo del trabajo

Evidencia 1. Recolección de las hojas de *Bixa Orellana L.* (achiote)



Evidencia 2. Destilación del aceite de *Bixa Orellana L.* (achiote)



Evidencia 3. Selección de cepas y medios de cultivo



Cepa de Escherichia Coli ATCC 25922



Cepa de Bacillus Subtillis ATCC 6633

Evidencia 4. Control de calidad



Control del Agar Müller Hinton – viable



Control del aceite de achiote – viable



Control de la cepa Escherichia Coli ATCC 25922 – viable



Control de la cepa Bacillus subtilis ATCC 6633 – viable

Evidencia 5. Sembrado



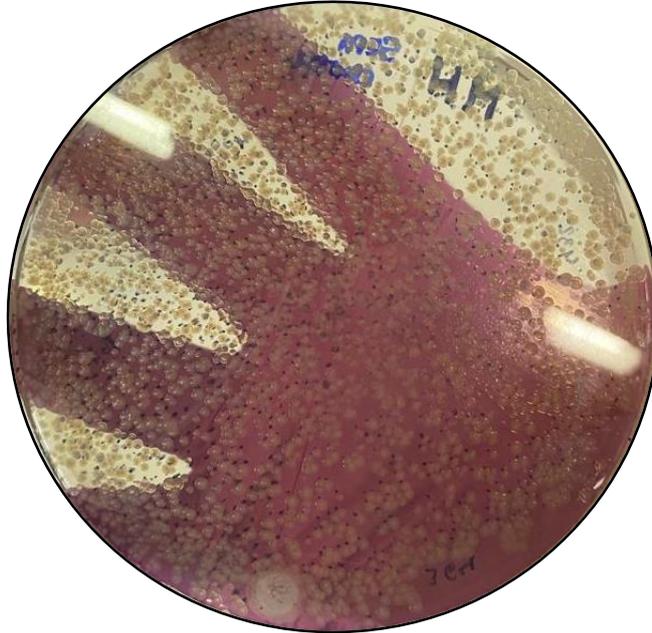
Rotulado de placas y preparación del inóculo al 0.5 en la escala de McFarland



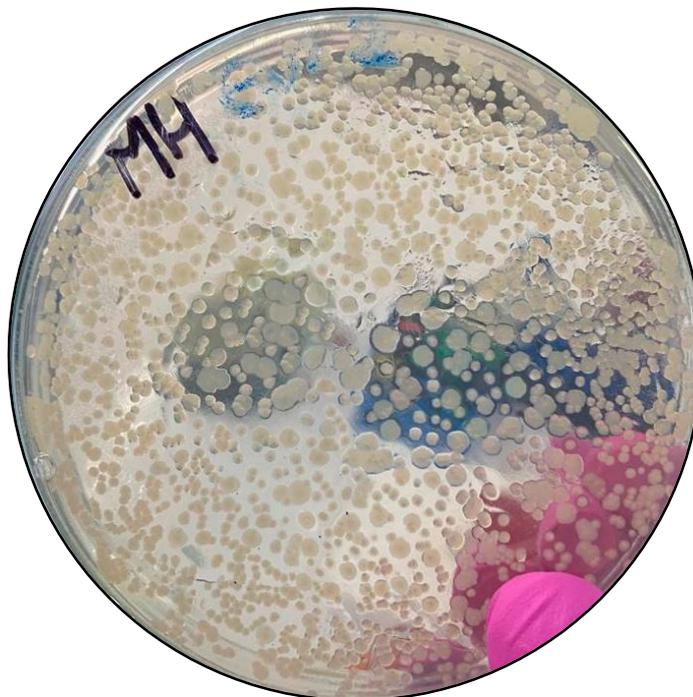
Sembrado de las cepas y aplicación del aceite de Bixa Orellana L. (achiote)

Evidencia 6. Resultados por concentraciones

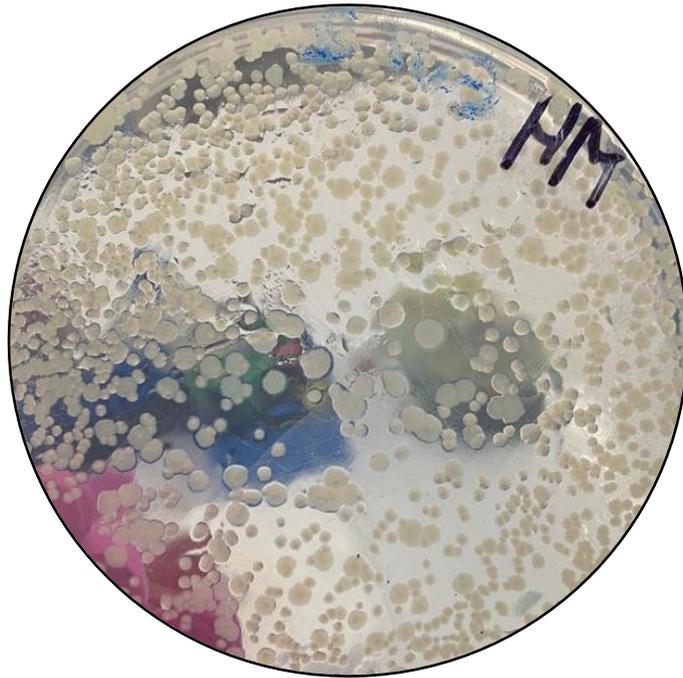
1. *Escherichia Coli* ATCC 25922



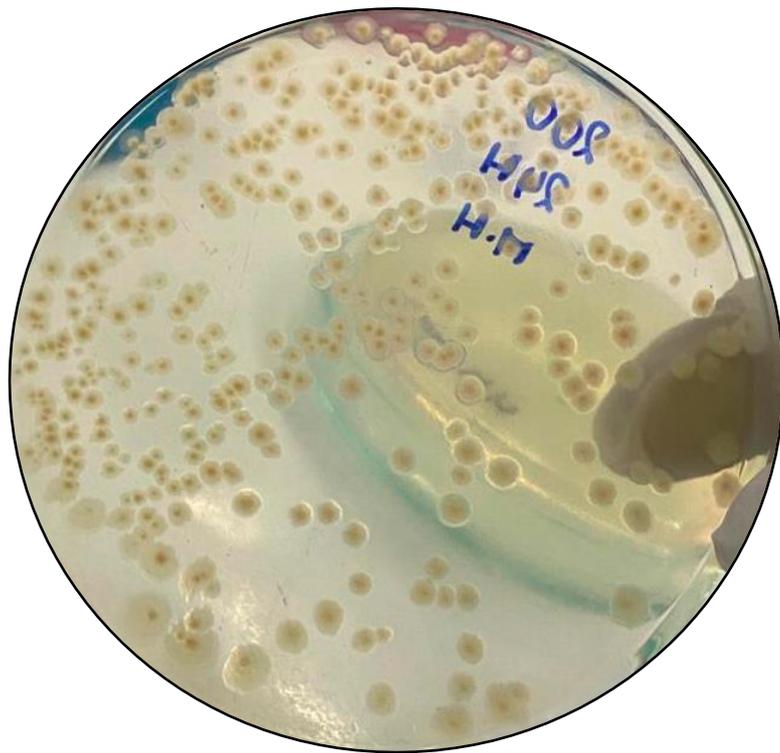
0 µl de aceite de achiote frente a Escherichia Coli ATCC 25922



50 µl de aceite de achiote frente a Escherichia Coli ATCC 25922



100 µl de aceite de achiote frente a Escherichia Coli ATCC 25922

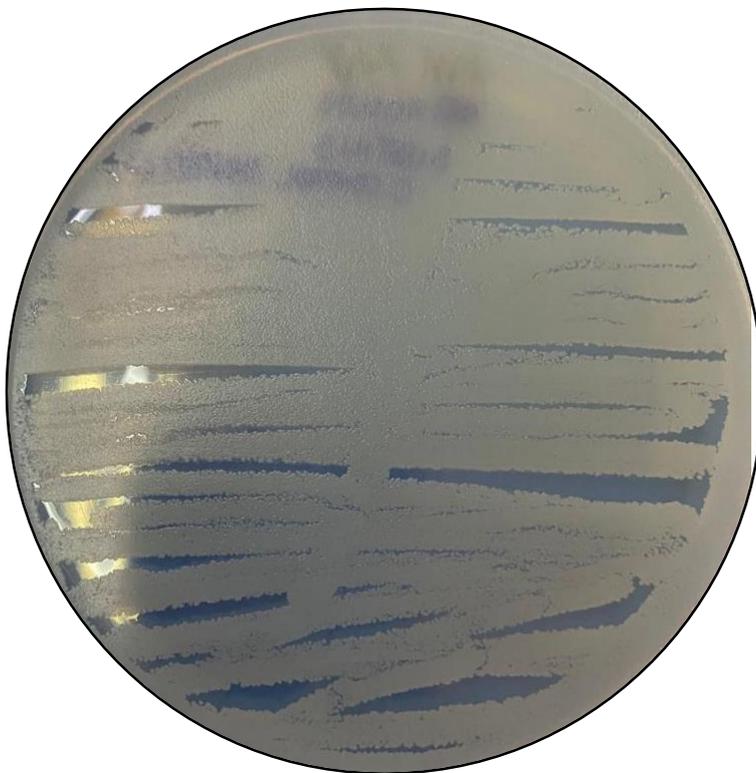


200 µl de aceite de achiote frente a Escherichia Coli ATCC 25922

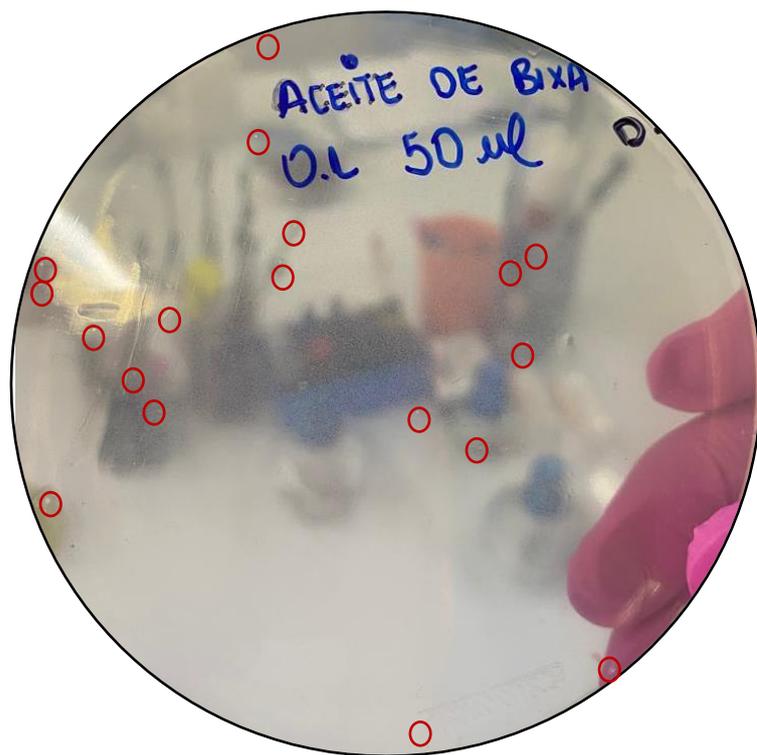


500 µl de aceite de achiote frente a Escherichia Coli ATCC 25922

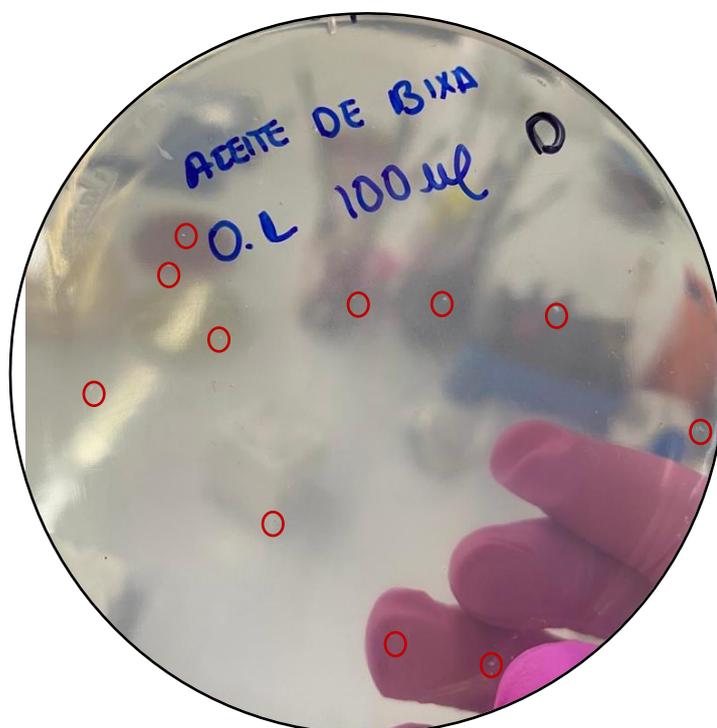
2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633



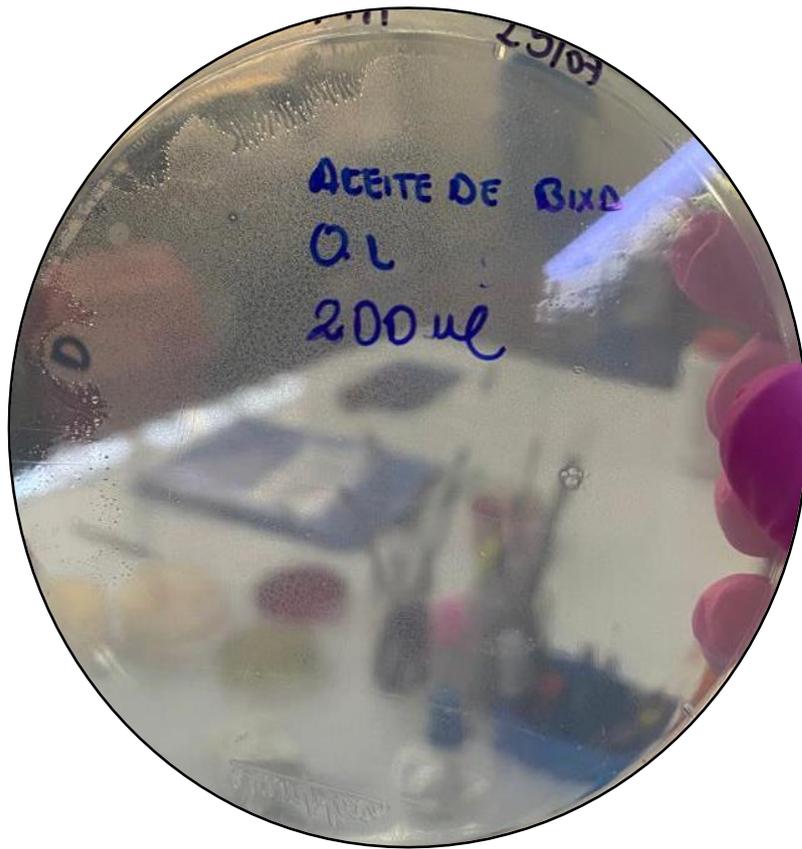
0 µl de aceite de achiote frente a Bacillus subtilis ATCC 6633



50 µl de aceite de achiote frente a Bacillus subtilis ATCC 6633



100 µl de aceite de achiote frente a Bacillus subtilis ATCC 6633



200 µl de aceite de achiote frente a Bacillus subtilis ATCC 6633