



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE BIXA ORELLANA (ACHIOTE)
SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175- ESTUDIO IN VITRO

Línea de investigación:
Salud pública

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Autora

Cosser Torres, Angela Gabriela

Asesora

Chacón Gonzáles, Doris Maura

ORCID: 0000-0003-4845-0791

Jurado

Alvitez Temoche, Daniel Augusto

Galarza Valencia, Diego Javier

Chuna Espinoza, Jorge Dante

Lima - Perú

2025

EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE BIXA ORELLANA (ACHIOTE) SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175- ESTUDIO IN VITRO

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.unfv.edu.pe

Fuente de Internet

4%

2

Submitted to Universidad Nacional Federico Villarreal

Trabajo del estudiante

2%

3

tesis.unap.edu.pe

Fuente de Internet

1%

4

Submitted to Universidad Cesar Vallejo

Trabajo del estudiante

<1%

5

hdl.handle.net

Fuente de Internet

<1%

6

repositorio.uap.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

7

dspace.unitru.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

8

repositorio.uigv.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

9

www.nacion.com

Fuente de Internet

<1%

10

www.grafiati.com

Fuente de Internet

<1%

11

Wilder Geovanny Valencia Sánchez, Juan Esteban Hoyos Manrique, William Esteban Bedoya Chavarría, Carlos Alberto Agudelo Velásquez et al. "¿Existen diferencias en la fuerza máxima, la flexibilidad y la composición corporal en los competidores de CrossFit® según su categoría? (Are there differences in maximal strength, flexibility, and body composition in CrossFit®

<1%



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE BIXA ORELLANA (ACHIOTE)

SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175- ESTUDIO IN VITRO

Línea de Investigación:

Salud Pública

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Autora

Cosser Torres, Angela Gabriela

Asesora

Chacón Gonzáles, Doris Maura

ORCID: 0000-0003-4845-0791

Jurado

Alvitez Temoche, Daniel Augusto

Galarza Valencia, Diego Javier

Chuna Espinoza, Jorge Dante

Lima - Perú

2025

DEDICATORIA

A Dios por siempre estar a mi lado y no soltar mi mano.

A mis padres, Lourdes y Carlos, por enseñarme a ser fuerte y nunca rendirme, espero que estén orgullosos de mí.

A mi hermana Karla por motivarme a salir adelante.

A mi sobrino Kellan por ser el mejor paciente que pude tener.

A mi abuela Alejandra por esperar para verme convertida en profesional.

A los que se fueron, mis ángeles Yolanda e Hipólito, por cuidar de mí desde el cielo.

AGRADECIMIENTO

A Dios porque sin el nada sería posible.

A mis docentes por brindarme sus conocimientos a lo largo de mi carrera profesional.

A la familia Crovetto Calero por acogerme en su hogar y apoyarme en mis años de estudio.

A mis tíos Tomás y Martha por ser mis pacientes y confiar en mí.

A todos aquellos que fueron mis pacientes en mis años de estudio por su apoyo y confianza.

ÍNDICE

RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción y formulación del problema.....	1
1.2. Antecedentes.....	3
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	7
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	7
1.4. Justificación.....	7
1.5. Hipótesis.....	8
II. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	9
2.1.1. <i>Caries dental</i>	9
2.1.2. <i>Microbiota</i>	10
2.1.3. <i>Microbiota oral</i>	10
2.1.4. <i>Streptococcus mutans</i>	11
2.1.5. <i>Bixa orellana Achiote</i>	12
III. MÉTODO.....	14
3.1. Tipo de investigación.....	14
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	14
3.3. Variables.....	14
3.3.1. <i>Variable independiente</i>	14
3.3.2. <i>Variable dependiente</i>	14
3.3.3. <i>Variable control</i>	14

3.3.4. Operacionalización de variables	14
3.4. Población y muestra.....	15
3.4.1. Población.....	15
3.4.2. Muestra.....	15
3.4.3. Criterios de inclusión	16
3.4.4. Criterios de exclusión	16
3.5. Instrumentos.....	16
3.5.1. Materiales.....	16
3.6. Procedimientos.....	17
3.6.1. Producción de los extractos hidroetanólicos.....	17
3.6.2. Acondicionamiento de los materiales.....	17
3.6.3. Formación del medio de cultivo.....	18
3.6.4. Activación de la cepa.....	18
3.6.5. Formación del inóculo.....	19
3.6.6. Inoculación de placas	19
3.6.7. Formación de pocillos	19
3.6.8. Sembrado de muestras y controles.....	19
3.6.9. Incubación	20
3.6.10. Efecto antibacteriano.....	20
3.6.11. Evaluación de los halos de inhibición	20
3.7. Análisis de datos.....	20
3.8. Consideraciones éticas.....	20
IV. RESULTADOS.....	22
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
VI. CONCLUSIONES.....	42

VII. RECOMENDACIONES.....	43
VIII. REFERENCIAS.....	44
IX. ANEXOS.....	50
9.1. Anexo A.....	50
9.1.1. <i>Instrumento de recolección de datos</i>	50
9.2. Anexo B.....	53
9.2.1. <i>Carta de presentación</i>	53
9.3. Anexo C.....	54
9.3.1. <i>Elaboración del extracto hidroetanólico de B. orellana</i>	54
9.4. Anexo D.....	56
9.4.1. <i>Certificado de elaboración del extracto hidroetanólico de B. orellana</i>	56
9.5. Anexo E.....	57
9.5.1. <i>Evaluación del efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de B. orellana al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175</i>	57
9.6. Anexo F.....	58
9.6.1. <i>Certificado del efecto antibacteriano</i>	58
9.7. Anexo G.....	61
9.7.1. <i>Matriz de consistencia</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de sumario estadístico del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro.....	22
Tabla 2. Tabla de sumario estadístico del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 48 horas- In vitro.....	23
Tabla 3. Tabla de sumario estadístico del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro.....	25
Tabla 4. Comparación del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro.....	27
Tabla 5. Comparación del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 48 horas - In vitro.....	30
Tabla 6. Comparación del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro.....	33
Tabla 7. Comparar el efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75%, 100% y la Clorhexidina al 0,12% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 24, 48 y 72 horas - In vitro.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro.....	23
Figura 2. Distribución del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 48 horas - In vitro.....	24
Figura 3. Distribución del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro.....	26
Figura 4. Comparación del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro.....	29
Figura 5. Comparación del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 48 horas - In vitro.....	32
Figura 6. Comparación del efecto antibacteriano del extracto de <i>B. orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro.....	35

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antibacteriano del extracto de *Bixa orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24, 48, y 72 horas – In vitro. **Método:** este trabajo es de carácter experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo. Utilizaron concentraciones del extracto de *B. orellana* al 50%, 75% y 100%, la sustancia control (+) Clorhexidina al 0,12% y sustancia control (-) Agua Destilada. Se inoculó la cepa *S. mutans* ATCC 25175 en 15 placas Petri, se colocaron discos de difusión embebidos con los extractos y los controles, para posteriormente ser medidos a las 24, 48 y 72 horas. El efecto antibacteriano fue evaluado mediante el procedimiento de Kirby-Bauer. **Resultados:** mayor valor promedio fue formado por la Clorhexidina al 0,12% a las 24 y 48 horas con promedios de 11.84 mm y 11.24 mm respectivamente. En cuanto a los extractos de *B. orellana* el mayor valor promedio fue la densidad del 100% al tiempo de 48 horas con inhibición de 8.79 mm. El menor valor promedio fue dado por los extractos de *B. orellana* en la concentración del 50% y el control negativo en todos los periodos estudiados. **Conclusiones:** el extracto de *B. orellana* concentrado al 75% y 100% si presentó efecto antibacteriano ante *S. mutans* ATCC 25175 en los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

Palabras clave: efecto antibacteriano, extracto hidroetanólico, *Bixa orellana*, Achiote, *Streptococcus mutans* ATCC 25175

ABSTRACT

Aim: Estimate the anti-bacterial effectiveness of *Bixa orellana* (Achiote) 50%, 75% and 100% extract against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 at 24, 48, and 72 hours – In vitro. **Method:** This study has an experimental, comparative, longitudinal and prospective approach. Concentrations of *B. orellana* extract at 50%, 75% and 100% were used, Chlorhexidine 0.12% was applied as a control (+) and Distilled Water as a control (-). *S. mutans* ATCC 25175 strain was inoculated in 15 Petri dishes, diffusion disks soaked with the extracts and controls were placed, to later be measured at 24, 48 and 72 hrs. The anti-bacterial effectiveness was estimated with Kirby-Bauer procedure. **Results:** It was obtained that the highest average value was formed by Chlorhexidine 0.12% at 24 and 48 hours with averages of 11.84 mm and 11.24 mm respectively. In the *B. orellana* extracts, the highest average value was in the 100% concentration at 48 hours with a value of 8.79 mm. The lowest average value was given by the *B. orellana* extracts at the 50% concentration and the negative control in all the periods studied. **Conclusions:** The *B. orellana* extract at concentrations of 75% and 100% did present antibacterial effect against *S. mutans* ATCC 25175 at 24, 48 and 72 hours.

Keywords: antibacterial effect, hydroethanolic extract, *Bixa orellana*, Achiote, *Streptococcus mutans* ATCC 25175

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales desencadenadas por bacterias patógenas perduran como un problema mundial con alto impacto en la salud humana. Más de 750 clases de bacterias residen en la boca, algunas de las cuales son especies oportunistas capaces de provocar infecciones relacionadas con el biofilm bucal. (Pen et al., 2022)

La boca es un ambiente cambiante y complejo, donde una amplia variedad de alimentos, bebidas y microorganismos interactúan continuamente. La composición y la estructura de la microbiota bucal puede variar significativamente entre individuos y también a lo largo del tiempo, influenciadas por factores como la higiene oral, la dieta, el uso de productos de cuidado oral (como enjuagues bucales o pastas de dientes), el estado de salud general y el uso de medicamentos, entre otros. Estos cambios pueden originar que la cavidad bucal sea propensa a ciertas patologías. (Sedghi et al, 2021)

En los últimos años, se han adoptado estrategias para superar este tipo de dolencias mediante el uso de plantas medicinales, que desde hace miles de años han sido empleadas como terapia tradicional en todo el mundo, dada su constitución por compuestos bioactivos naturales con múltiples actividades biológicas reconocidas. (Tello et al., 2019)

1.1. Descripción y formulación del problema

Una de las patologías infectocontagiosas de origen multifactorial más común es la caries dental, resultante de una disbiosis entre bacterias que habitan en la cavidad bucal, dando lugar a un predominio de microorganismos más cariogénicos, principalmente *Streptococcus mutans*. (Giacaman, 2018)

El *S. mutans* tiene como hábitat natural la cavidad bucal del humano, precisamente en la placa bacteriana, una biopelícula de diversas especies que se forma en las áreas duras del diente. La gran capacidad cariogénica de *S. mutans* ha sido probada, fundamentalmente en su potencial de síntesis de gran número de polímeros extracelulares de glucano, donde tiene el

poder de transporte y metabolismo de una vasta gama de carbohidratos en ácidos orgánicos teniendo actividad en condiciones particulares, principalmente en un pH bajo. (Lemos et al., 2019)

La acción antibacteriana ligada a extractos de una enorme gama de especies vegetales, relacionadas con la existencia de metabolitos de segundo orden como flavonoides, ácidos fenólicos y taninos, que tienen un rol fundamental sobre la resistencia a diversos patógenos microbianos y en la protección contra radicales libres y toxinas. Respecto a los compuestos fenólicos, se han descrito varios mecanismos a través de los cuales se promueve la actividad antimicrobiana, ya que estos compuestos interactúan con las proteínas bacterianas y las estructuras de las membranas celulares, dañando y reduciendo su fluidez, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos e interfiriendo en el metabolismo energético del propio microorganismo. (Rana et al., 2019)

La flora peruana tiene una inmensa variedad de especies, la cual es famosa por sus propiedades y valores medicinales. La mega fitodiversidad del Perú, sobresale por poseer especies vegetales con propiedades medicinales que cuentan con vitaminas abundantes, sales minerales, carotenoides y colorantes antocianínicos. Estos, junto con los alcaloides y polifenoles presentes en su interior, les otorgan propiedades curativas y de aliviar afecciones. (Mostacero et al., 2018)

Los compuestos derivados de las plantas constituyen un recurso importante de posibilidades terapéuticas de diversas infecciones bacterianas debido a su costo y toxicidad reducidos, así como a su riesgo reducido de efectos secundarios. (León et al., 2022)

En este contexto, el uso de productos naturales (compuestos fitoquímicos) para manejar afecciones causadas por microorganismos resistentes puede resultar ventajoso debido a su amplia gama de funciones biológicas, que los convierten en fuentes eventuales para la creación de nuevos fármacos. (Hernández et al., 2021)

Bixa orellana L. (achiote, orlean, roucou o achiote) pertenece a la familia *Bixaceae* y es una planta nativa del centro, norte y sur de América. Sus semillas se utilizan en la medicina tradicional en el aceite y extracto de raíces como efecto cicatrizante, expectorante, laxante; además de poseer propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, anticonvulsivas, cardioprotectoras y antidiabéticas de las sustancias acuosas derivadas de las hojas. Esta especie vegetal es muy utilizada en países como Brasil y Perú como alimento, así como colorante en la industria cosmética y de pinturas, salud y tecnología. (Lima et al., 2018)

Karmakar et al. (2018) demostró en su investigación la existencia de numerosos compuestos fitoquímicos en *B. orellana* como carotenoides, flavonoides, polifenoles, taninos, compuestos alifáticos, esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, quinonas, terpenoides, alcaloides y triterpenoides.

Cuong y Chi (2016) refieren en su análisis una acción antibacteriana y antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos al usar hojas y semillas de *B. orellana* frente a bacterias Gram positivas (p. ej., *S. mutans* y *S. sanguinis*).

Lo anteriormente expuesto conduce a la siguiente interrogante: ¿Cuál será el efecto antibacteriano de los extractos de *B. orellana* (Achiote) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 – estudio in vitro?

1.2. Antecedentes

Granados (2023) ejecutó un estudio en Perú con enfoque ensayo in vitro y longitudinal, en el cual buscó determinar la acción antimicrobiana de los extractos metanólicos de *B. orellana* contrastando con los extractos etanólicos de *Camellia sinensis* contra *S. mutans* a los tiempos 24, 48 y 72 h. La muestra fue de 12 elementos por grupo. La acción antimicrobiana se evaluó a concentraciones de 100%, 75% y 50%, mediante el procedimiento de difusión con Agar Müller Hinton en dos etapas. Resultó que, en la primera etapa, los extractos etanólicos de *C. sinensis* al 75% y al 100%, y los extractos metanólicos de *B. orellana* al 75% y al 100%

tuvieron superior acción antimicrobiana frente a *S. mutans* al tiempo 48 h. En la segunda etapa, *C. sinensis* (100% y 75%) y *B. orellana* (100%) tuvieron actividad altamente sensible frente a *S. mutans* a las 48 h. Además, *C. sinensis* (100 % y 75 %) mostró una acción antimicrobiana superior contra *S. mutans* en contraste con *B. orellana* y clorhexidina. Se concluyó que ambos extractos al 100% de concentración, presentaron su mayor acción antimicrobiana contra *S. mutans* a las 48 h.

Valarezo et al. (2023) realizó en Ecuador un trabajo de investigación para determinar la estructura química, organización enantiomérica, además la acción antibacteriana de los aceites esenciales resultantes de semillas y hojas de *B. orellana*. Se utilizó hidrodestilación para aislar el aceite esencial y espectrometría de masas en conjunto con cromatografía de gases para evaluar la composición cualitativa. Se determinó la acción antibacteriana por el procedimiento de microdilución sobre caldo, utilizaron tres cocos Gram positivos, un bacilo Gram positivo y tres bacilos Gram negativos. Resultó que los principales componentes químicos fueron germacreno D ($17,87 \pm 1,20\%$), biciclogermacreno ($14,27 \pm 0,97\%$), cariofileno $\langle E \rangle$ ($8,56 \pm 1,24\%$) y pineno $\langle \alpha \rangle$ ($6,34 \pm 0,13\%$). Se identificaron seis pares de enantiómeros en el aceite esencial de *B. orellana*. Se presentó fuerte acción frente a *Enterococcus faecium* (ATCC 27270) con una mínima concentración de inhibición (MIC) correspondiente a 250 $\mu\text{g/mL}$ y débil actividad contra *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con una MIC de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Se concluyó que existe una buena acción antibacteriana de los aceites esenciales aislado de hojas de *B. orellana*.

Dos Santos et al. (2021) desarrollaron en Brasil un análisis de naturaleza experimental, longitudinal y prospectivo. Tuvo como propósito evaluar si existe actividad antimicrobiana y propiedades físicas en selladores endodónticos compuestos de resina con incorporación de extractos vegetales obtenidos de *B. orellana*, *M. piperita* y *T. minuta*. Los extractos fueron obtenidos y caracterizados por gas-cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS) y

concentración mínima inhibitoria (CIM) contra *S. mutans*, *E. faecalis* y *Candida albicans*. Se encontró que sólo *T. minuta* y los grupos *B. orellana* presentaron actividad antibacteriana contra *S. mutans*, después de 24 h de contacto ($p < 0,05$). Todos los extractos evidenciaron un efecto antibacteriano contra *E. faecalis* ($p < 0,05$). Se concluyó que el extracto de *B. orellana* posterior a las 24 horas obtuvo mayor efecto antibacteriano junto a los otros aceites.

Kar et al. (2021) investigaron en India el presente estudio que buscó encontrar el poder antibacteriano de los extractos hidroetanólicos elaborados con *B. orellana* contra cepas de enfermedades infecciosas. Se analizó la concentración inhibidora mínima (CIM), actividad sinérgica, daño al ADN y perfil de constituyentes químicos empleando cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Resultó que el sector inhibido osciló entre 13mm para el *Acinebacter sp.* y 25 mm para la *Salmonella entérica*, la CIM osciló entre 512 y 2048 $\mu\text{g/mL}$ frente a estos patógenos. La CIM se redujo de 2 a 10 veces para la combinación de ampicilina y el extracto de la planta. Se mostró la capacidad de daño celular contra todos los patógenos y el efecto genotóxico se estableció por primera vez en el estudio actual. El análisis GC-MS mostró la presencia de 40 compuestos que no habían sido reportados previamente en esta planta. Se concluye que existe buen poder antibacteriano de los extractos hidroetanólicos de las hojas de *B. orellana* contra patógenos resistentes a múltiples fármacos.

Murillo (2019) realizó un estudio en Ecuador de tipo experimental y comparativo, para comprobar la acción inhibitoria in vitro de los extractos de *B. orellana* al 50% y 100% frente a cepas de *S. mutans*. La muestra fue de 20 placas Petri, se dividió en dos grupos: Grupo A: extracto al 50% y Grupo B: extracto al 100%. Se usó el control (+) Clorhexidina 0.12% como y control (-) agua destilada. Se evaluó la acción inhibitoria midiendo los halos en milímetros. Resultó que el extracto al 50% de concentración, muestra un efecto inhibitorio con que miden entre 6 a 6.25 mm. Al 100% de concentración, el halo máximo alcanza los 9.4 mm. Sin embargo, en comparación con la clorhexidina al 0.12%, el extracto de *B. orellana* muestra un

efecto inhibitorio inferior en ambas concentraciones. En comparación con el control (-), los extractos de *B. orellana* muestran una acción inhibitoria parecida al 50% (6 mm) y más alto al 100% (8.4 mm). Se concluye que los extractos de *B. orellana* son inferiores que la capacidad inhibitoria de la clorhexidina al 0.12% sobre *S. mutans*.

Collantes (2019) desarrolló en Perú un trabajo cuyo fin fue comparar el poder antibacteriano de diferentes porcentajes de extractos hidroetanólicos de las hojas de *B. orellana* contra *S. mutans* ATCC 25175 in vitro. El grupo de estudio analizado consistió en 10 placas de cultivo que contienen cepas de *S. mutans* ATCC-25175. Se recolectó e identificó la *B. orellana*, se obtuvieron extractos en tres distintas concentraciones. El poder antibacteriano se estudió mediante el procedimiento de Kirby Bauer. Se evidenció que los extractos hidroetanólicos de las hojas de *B. orellana* al 25% de concentración tenía una media de 19.43 mm, en el 50% tenía una media de 23.35 mm y en el 75% tenía una media de 26.38 mm. Se realizó un análisis de varianzas que demostró una variación estadísticamente relevante en los resultados de las tres concentraciones. Se concluyó lo siguiente del extracto hidroetanólico al 75% exhibió una mayor efectividad antibacteriana contra *S. mutans* en comparación con las otras dos concentraciones.

Medina et al. (2016) llevaron a cabo en Perú una evaluación para determinar la acción citotóxica y la efectividad antibacteriana del extracto metanólico de *B. orellana* contra *S. mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Realizaron dos preparaciones de extractos metanólicos usando las semillas y hojas. La efectividad antibacteriana fue evaluada mediante el procedimiento de expansión sobre Agar placa-copa. La concentración mínima de inhibición (CIM) se evaluó mediante microdilución y se evaluó la citotóxicidad por el uso de la línea celular MDCK. Resultó que la mayor efectividad antibacteriana se dio en los extractos de las hojas, formando un halo de $(19,97 \pm 1,31)$ mm en *S. mutans* y $(19,97 \pm 1,26)$ mm en *S. sanguinis*. Los extractos de semillas formaron inhibición

de $(15,11 \pm 1,03)$ mm para *S. mutans* y $(16,15 \pm 2,15)$ para *S. sanguinis*. La concentración mínima de inhibición de los extractos de las hojas frente a *S. mutans* resultó 62,5 mg/mL, y en los extractos de las semillas resultó 31,25 mg/ml. La concentración citotóxica en la concentración del 50% fue de 366,45 y 325,05 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos de hojas y semillas, respectivamente. Se concluye la existencia de una efectividad antibacteriana de los extractos metanólico de *B. orellana* frente las bacterias evaluadas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto antibacteriano del extracto de *Bixa orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24,48, y 72 horas – In vitro.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto de *Bixa Orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro.

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto de *Bixa Orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 48 horas - In vitro.

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto de *Bixa Orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro.

- Comparar el efecto antibacteriano del extracto de *Bixa Orellana* (Achiote) al 50%, 75%, 100% y la clorhexidina al 0,12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24, 48 y 72 horas - In vitro.

1.4. Justificación

La investigación actual se orienta hacia la importancia de encontrar nuevas alternativas terapéuticas frente a las infecciones bacterianas, específicamente contra *S. mutans*, una bacteria ampliamente asociada a la caries dental. La búsqueda de tratamientos efectivos y alternativos a los antibióticos convencionales es esencial para abordar esta preocupación de salud pública.

La *B. orellana* (Achiote) es una planta que ha sido empleada en tratamientos tradicionales a causa de sus virtudes medicinales, incluyendo propiedades antibacterianas.

Evidenciar el efecto antibacteriano, podría abrir un camino para investigaciones posteriores, incluyendo estudios in vivo y ensayos clínicos. Además, la *B. orellana* (Achiote) es una planta asequible en muchas regiones, lo que podría convertirla en una alternativa económicamente viable y beneficiosa para la salud pública.

1.5. Hipótesis

Existe un efecto antibacteriano del extracto de *Bixa orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% estadísticamente significativo sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 – estudio in vitro.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Caries dental*

Se describe como una afección dental común que afecta a los dientes y se caracteriza por la pérdida gradual de minerales y el deterioro progresivo del tejido dental. La falta de un tratamiento oportuno para eliminar la caries puede llevar a una inflamación en la pulpa dental, que comienza como una pulpitis reversible y avanza hacia una pulpitis irreversible, resultando en la pérdida de la vitalidad del diente (Morales y Gómez, 2019).

Esta condición puede dar lugar a la destrucción y eventual pérdida del diente, conllevando consecuencias en términos de funcionamiento, estética y bienestar psicosocial, donde puede influir negativamente en la autoestima, alterar las interacciones sociales y, con el tiempo, provocar aislamiento y ausentismo. Desde una perspectiva funcional, esto puede manifestarse como dificultades en la masticación, lo que a su vez afecta la nutrición y la alimentación del individuo, así como dificultades en el habla. (Alosaimi et al., 2017)

Prevenir la caries preserva una estructura del diente sana, previene la desmineralización del esmalte y promueve los procesos de remineralización. La concentración de fluoruro utilizada para la remineralización dental puede variar según la formulación del producto y la situación clínica específica del paciente. Sin embargo, generalmente se utilizan concentraciones de fluoruro en el rango de 1,000 a 5,000 partes por millón (ppm). (Walsh et al., 2019)

Yon et al. (2019) señaló que los indicadores de enfermedades como el tipo de bacteria, la ausencia de saliva y los malos hábitos alimentarios son determinantes para la aparición de la caries. Demostraron que la saliva, los selladores, los antibacterianos, el flúor y una dieta controlada pueden contribuir a mantener los dientes sanos.

2.1.2. Microbiota

Los seres humanos poseemos una relación íntima y dinámica con los microorganismos. Calculamos que la composición celular del cuerpo humano corresponde a más de 10¹⁴, de ellas sólo el 10% son de mamíferos. La mayoría son los microorganismos que componen las microfloras residentes que colonizan todas las superficies expuestas del cuerpo. Las microfloras de la piel, la boca, el tracto digestivo y reproductivo son distintas entre sí a pesar de la frecuente transferencia de organismos entre estos sitios; su composición característica se debe a diferencias significativas en las propiedades biológicas y físicas de cada hábitat. (Marsh, 2010)

2.1.3. Microbiota oral

La boca es similar a otros hábitats del cuerpo en que posee una comunidad microbiana residente diversa pero característica. Las bacterias son el grupo más numeroso, actualmente se estima que hay más de 700 tipos diferentes de microbios que pueden aislarse de la boca. (Arweiler y Netuschil, 2016)

Los microorganismos orales residentes obtienen sus nutrientes principalmente de sustancias endógenas y fuentes como aminoácidos, proteínas y glicoproteínas en la saliva y el líquido crevicular gingival. El metabolismo de estos sustratos produce sólo cambios menores y lentos al pH local. La saliva también desempeña un rol importante en la conservación del pH oral en aproximadamente neutralidad, que es óptima en el desarrollo de gran parte de los organismos asociadas con la salud bucal. (Marsh et al., 2017)

Las biopelículas dentales (placa dental) albergan una variada colección de microorganismos. Un pequeño fragmento de biofilm oral posee, en promedio, entre 12 y 27 especies. Estas biopelículas se desarrollan siguiendo un patrón específico. A los pocos segundos de la erupción, o después de la limpieza, las superficies de los dientes se recubren con una película acondicionadora de moléculas (proteínas y glicoproteínas biológicamente

activas) derivadas principalmente de la saliva. Inicialmente, sólo algunas especies bacterianas pueden adherirse a esta película, que también se denomina película adquirida. Las células se mantienen reversiblemente cerca de la superficie mediante enlaces débiles y de largo alcance como las moléculas (adhesinas) de estos primeros colonizadores bacterianos, principalmente los estreptococos. (Jiang et al., 2019)

2.1.3.1. Microorganismos asociados a caries dental. Los *S. mutans* y los lactobacilos son reconocidos con anterioridad como agentes relacionados a la caries; sin embargo, análisis moleculares más recientes han revelado la existencia de una comunidad patógena que incluye bacterias no estreptocócicas (*Bifidobacterium spp.*, *Scardovia spp.* y *Actinomyces spp.*). La composición microbiana puede variar dependiendo de los diferentes sitios de la superficie del diente. Estos microorganismos tienen interacción sinérgica polimicrobiana dinámica para formar una biopelícula cariogénica, dentro de la cual la comunidad cambia a medida que la caries progresa desde un inicio temprano (desmineralización inicial) hasta lesiones más profundas con exposición a la dentina. (Pitts et al., 2021)

2.1.4. *Streptococcus mutans*

Es un microorganismo de tipo Gram positivo ubicado comúnmente dentro de la zona oral y es conocida por su papel significativo en la formación de caries dental. *S. mutans* es una de las muchas especies de bacterias que habitan naturalmente en la boca de los seres humanos. La encontramos fijándose a los órganos dentales y forma parte del biofilm dental, una película bacteriana que se desarrolla constantemente en los dientes. (Lu et al., 2023)

2.1.4.1. Metabolismo. *S. mutans* necesita indispensablemente la glucólisis para poder producir energía. Este microorganismo tiene propiedades distintivas como el metabolismo de una gran diversidad de carbohidratos. El genoma de la cepa tipo UA159 compila 14 estructuras de azúcar: fosfotransferasa (PTS) ligada a fosfoenolpiruvato con distinciones para varios mono

y disacáridos, tal como dos conductores de casete de vínculo a ATP (ABC) involucrados fundamentalmente en la interiorización de oligosacáridos. (Chen y Lin., 2022)

La sacarosa es un azúcar doble resultante de una combinación de fructosa y glucosa que ha evidenciado, por distintas causas, ser el carbohidrato con mayor acción cariogénica. *S. mutans* ha creado numerosos caminos para catabolizar la sacarosa para la obtención de ácido, donde muchas enzimas glicosiltransferasas (Gtfs) transforman la sacarosa en un polímero extracelular. (Valdebenito, 2019)

2.1.5. *Bixa orellana* Achiote

B. orellana, comúnmente conocida como achiote o annatto, tiene sus orígenes en América tropical y subtropical. Achiote es apreciado por sus usos culinarios y medicinales, así como por su importancia en la industria alimentaria. A nivel botánico, es una planta de tamaño reducido la cual puede crecer entre 6 y 10 m. de alto. Sus hojas tienen forma ovalada y las flores tienen un tamaño diminuto y tonalidad rosa pálido. Lo que más destaca de esta planta son sus frutos, que son cápsulas espinosas con semillas cubiertas de una pulpa rojiza. (Duque et al., 2022)

Las semillas tienen una longitud aproximada entre 0,3 y 0,5 cm, su diámetro cercano a 0,3 cm y, a menudo, presentan una estructura cónica además de la parte inferior larga. Las semillas contienen altos nivel de carotenoides y proporciona cierto tinte orgánico poco tóxico. Bajo este contexto, sus semillas son consideradas la fuente de mayor valor comercial de la planta por sus usos en la industria de la fabricación textil y productos de belleza. (Teixeira et al., 2018)

B. orellana es muy utilizada en la medicina popular para tratar diferentes patologías. Por ejemplo, las semillas de té se utilizan a menudo como laxante, tónico cardíaco, hipotensor, expectorante, agente antimicrobiano y, a veces, como formulación antiinflamatoria en la terapia de patologías respiratorias incluyendo la bronquitis. Estos productos derivados de las

semillas también se utilizan como colirios contra la irritación. Las hojas son empleadas en el manejo de mordeduras ocasionadas por culebras, hepatitis, diarreas, gastritis, gonorrea, diurético, antipirético y en problemas dermatológicos. (Nascimento, 2020)

2.1.5.1. Composición. Las semillas del arbusto *B. orellana* abundan de carotenoides (4-5%) como la Bixina (representa el 80% de estos), Isobixina y Norbixina que son encontrados en mayor concentración. Otros componentes encontrados son los betacarotenos, la criptoxantina, la zeaxantina, la luteína y la orellina. Además, contiene grasas (17%) como son los ácidos linoleicos, alfa-linolénicos y oleicos; y además de aminoácidos (10%) tales como aspartato, glutamato y leucina. (Rivera et al., 2016)

2.1.5.2. Efecto antibacteriano. Los extractos de *B. orellana* son productos alcalinos resultantes de quitar la cubierta externa mediante diferentes procesos. Su presentación puede ser en polvo, pasta, suspensión o solución. Son obtenidos cuando se extrae a la semilla la membrana externa directamente junto a las grasas comestibles o al incorporar los extractos resultantes con los disolventes orgánicos tales como son la acetona, etanol, tricloroetileno, hexano, isopropanol, diclorometano, metanol; para luego eliminar el disolvente. (Lourido y Martínez, 2010)

Han identificado compuestos de esta planta tales como todo-trans-norbixina y 9'-cis-norbixina que son las que poseen efectos antimicrobianos. Además, se plantea que esta planta podría ser un elemento viable para la creación de nuevos productos con capacidad para combatir microorganismos. (Franklin et al., 2023)

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

La investigación presenta un diseño experimental, comparativo, longitudinal y prospectivo.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Fue realizado en el año 2024 en la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Centro de Control Analítico) de la UNMSM.

3.3. Variables

3.3.1. Variable independiente

- Extracto hidroetanólico de *Bixa Orellana* (Achiote)

3.3.2. Variable dependiente

- Efecto antibacteriano

3.3.3. Variable control

- Clorhexidina 0,12%
- Agua Destilada

3.3.4. Operacionalización de variables

Variables	Definición	Indicador	Escala	Valores
Extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote)	Sustancia derivada de	Porcentaje	Nominal	50%
	las semillas de <i>B.</i>	de la disolución		75%
	<i>orellana</i> . Este	del extracto		100%
	extracto es			
	ampliamente			

empleado en los
 ámbitos de la
 alimentación, la
 belleza y sanitaria
 debido a su capacidad
 antibacteriana.

Efecto	Potencial de un compuesto para impedir el crecimiento o eliminar	Diámetro de Halos de inhibición	Razón	Milímetros
Antibacteriano	microorganismos, como bacterias, pueden causar infecciones o enfermedades.			

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

Cepas de la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

3.4.2. Muestra

Está representado de acuerdo a la ecuación de contraste de promedios y los datos fueron tomados de un estudio anterior. (Collantes, 2019)

$$n = 2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2/d^2$$

Dónde:

- Riesgo alfa fijado = 1.645
- Riesgo beta fijado = 0.842
- D.S = 10
- Valor mínimo de diferencia = 9

$n = 15.3 \approx 15$ por grupo

3.4.3. Criterios de inclusión

- *S. mutans* con certificado ATCC 25175.

3.4.4. Criterios de exclusión

- Placas Petri con alteración.
- Placas Petri que presentan filtración.
- Placas Petri donde los *S. mutans* no se activaron según las indicaciones.
- Placas Petri donde no haya formación de halos de inhibición de manera clara.

3.5. Instrumentos

Para una correcta distribución de datos, se dispuso de una ficha elaborada por la autora de la investigación. (Anexo A)

Los datos se obtuvieron mediante la observación directa y la utilización de una regla Vernier digital, midiendo así los halos contenidos en cada cultivo de extracto de *B. orellana* (Achiote) en concentraciones de 50%, 75% y 100%, grupo control + (Clorhexidina 0,12%) y control – (Agua destilada). Estos valores se reflejarán en milímetros(mm).

3.5.1. Materiales

Se utilizaron diversos materiales para la realización de la presente investigación en lo que destacan las placas Petri (90 mm x 15 mm), Asa de Drigalsky, viales (5 ml y 10 ml) y baguetas, siendo estos materiales de vidrio, también utilizamos tubos con tapa enroscable (150 mm), punta de micropipetas (20- 200 μ L y 0.5- 5 ml), micropipeta calibrada (20- 200 μ L y 0.5-

5 ml), frascos con tapa enroscable de vidrio (200 ml y 500 ml). También utilizamos la gradilla y diversas espátulas, además de sacabocado (6 mm de diámetro interno), papel Kraft, asa bacteriológica y la escala de Mac Farland. Para esterilizar se utilizó un indicador multiparámetro y finalmente para la medición una regla Vernier digital.

3.6. Procedimientos

3.6.1. Producción de los extractos hidroetanólicos

La producción del extracto hidroetanólico comenzó llevando las semillas de *B. Orellana* a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, se removieron aquellas impurezas de la muestra y se extendió el total de las semillas de *B. orellana* sobre una hoja de papel Kraft por 24 horas.

Transcurrido el tiempo se pesó la muestra, se colocó el sobre en una estufa configurada por 24 horas a 40°C hasta obtener una masa estable. Procedimos a moler estas semillas hasta obtener 40 gramos y se mezcló con 400 ml de mezcla etanol – agua (70:30) en un frasco ámbar, el cual fue sellado con Parafilm. Se procedió a rotular el frasco y fue colocado en un ambiente cerrado y fresco durante 15 días para una adecuada maceración.

Pasado los 15 días, se continuó con la filtración del extracto con ayuda de un soporte universal, un embudo de vidrio y papel Whatman N°42. Se colocó debajo del embudo un frasco ámbar, previamente esterilizado en autoclave, y se vertió el extracto del envase con el macerado sobre el embudo con papel filtro.

Al terminar con ese primer filtrado se obtuvo el extracto de semilla de *B. orellana* al 100%. De la misma manera, se preparó y filtró el extracto hidroetanólico a concentraciones de 50% y 75% disueltos en la mezcla etanol - agua (70:30).

3.6.2. Acondicionamiento del material

Se envolvieron las placas de cultivo en papel de tipo Kraft y fueron esterilizados con una estufa de calor seco en una temperatura de 180°C en 120 minutos, al mismo tiempo,

también fueron esterilizadas tubos con tapa rosca, viales de vidrio y micropipetas en autoclave con calor húmedo en temperatura de 121°C y 15 lb/pg² en un tiempo de 15 minutos.

3.6.3. Formación del medio de cultivo

Fueron preparados 20 ml de caldo Brain-heart siguiendo los preceptos dados por el productor, colocando 37 g del caldo junto a 1000 ml de agua destilada en dos tubos de ensayo y luego se autoclavó.

En simultáneo elaboraron 100 ml de agar conforme a las indicaciones del productor, colocando en un frasco 1000 ml de agua destilada con 52 g de caldo y luego se autoclavó. Finalizando, dejaron enfriar en baño María a 50 °C y fueron distribuidas en placas estériles.

También fueron preparados en un frasco de vidrio 0.8 litros de agar Mueller Hinton siguiendo indicaciones del productor. El agar fue autoclavado en una temperatura de 121°C y 15 lb/pg² con un tiempo de 15 minutos. Luego fue llevado a una temperatura de 50 °C en Baño María. Cuando se alcanzó la temperatura adecuada, fue distribuido en placas estériles, dando 4 mm de fondo, correspondiente a 30 ml en placas con diámetro de 90 mm. Este agar fue distribuido en placas para solidificarse y se midió los niveles de pH, el cual debe mantenerse entre 7,0-7,6, con el bulbo del potenciómetro.

Después se preparó 100 ml de suero fisiológico estéril, pesando 0,9 g de cloruro de sodio grado bacteriológico y completándose con agua destilada. Por último, añadieron a 4 tubos estériles 10 ml de esta solución.

3.6.4. Activación de la cepa

Tomaron con el asa bacteriológica la cepa, la cual estaba refrigerada entre 4-8°C y fueron sembrados con caldo Brain- heart en tubos estériles, luego pasó a incubarse por 24 horas a una temperatura de 37°C.

Se observó los crecimientos de las cepas mediante la turbidez.

3.6.5. Formación del inóculo

Se tomaron colonias puras del microorganismo *S. mutans* ATCC 25175 y se diluyó en 10 ml de suero fisiológico en tubos de ensayo estériles, luego midieron la turbidez de la solución mediante la escala de Mac Farland, resultando el N°1 correspondiente a 3×10^8 UFC/mL de concentración.

Diluyeron en proporción de 1 en 3 usando tubos con tapa rosca esterilizados, colocaron 3 ml del preparado y un volumen de 9 ml de suero fisiológico. El resultado tuvo 1×10^8 UFC/mL de concentración.

3.6.6. Inoculación de las placas

Se inoculó con agar Mueller Hinton un total de 15 placas Petri, añadiéndose 1×10^8 UFC/mL de cada inóculo bacteriano preparado y se esparció con una espátula de Drigalsky de manera que se obtenga un crecimiento uniforme, deslizando el asa en sentido paralelo y compacto por toda el área. Repitieron dos ocasiones más este proceso girando 60° la placa.

Debe realizarse este proceso con extrema precaución para asegurar precisión en las lecturas. Antes de realizar los pocillos se secó durante 3 a 5 minutos.

3.6.7. Formación de los pocillos

Para formar los pocillos, se utilizó un sacabocados previamente esterilizado en alcohol y flameado en un mechero. Se hicieron 5 pocillos en 15 placas Petri para el análisis del extracto hidroetanólico de *B. orellana*. La distancia entre pocillos debe ser la necesaria para evitar superposiciones de los halos de inhibición, además debe estar separada del límite de la placa Petri en 15 mm.

3.6.8. Sembrado de las muestras y controles

Usaron 5 pocillos en 15 placas Petri para las muestras. Estos pocillos estaban conformados por el control (+), el control (-) y los extractos hidroetanólicos de *B. orellana*. Se añadió 40 uL en cada pocillo de las placas Petri. Además, el control (+) fue Clorhexidina al

0,12% (PERIO.AID) y el control (-) fue agua destilada. También se añadió 40 uL de estos grupos control a los pocillos.

3.6.9. Incubación

Se llevó a incubar las 15 placas Petri sembradas con las diluciones y controles a 37°C por 24, 48 y 72 horas.

3.6.10. Efecto antibacteriano

Se realizó el procedimiento de difusión en placa Kirby- Bauer para hallar el efecto antibacteriano. Este método sirve para determinar la capacidad de inhibición de un medicamento frente a un microorganismo, por lo cual fue modificado con el fin de analizar la efectividad de un espécimen vegetal contra una bacteria o población bacteriana.

3.6.11. Evaluación de los halos de inhibición

Al terminar la incubación de 24, 48 y 72 horas, se procedió al estudio de las muestras. La inhibición formada debe ser uniforme y formar un círculo homogéneo. La medición del diámetro de los halos formados se realizó en milímetros desde el punto central de los pocillos. Tomaron las medidas tres veces y se promediaron para obtener un número entero en el reporte.

3.7. Análisis de datos

Los datos fueron colocados en un registro de Microsoft Excel y procesados en SPSS 26. De esta manera, se elaboraron las tablas de frecuencia y gráficos respectivos. La estadística descriptiva utilizó medidas de tendencia central y medidas de dispersión. En cuanto al análisis inferencial para las variables de distribución normal se hizo uso de la prueba ANOVA con el post- hoc de Bonferroni y para las variables no paramétricas se usó la prueba H de Kruskal-Wallis con el post- hoc de comparaciones múltiples por pares de Dunn.

3.8. Consideraciones éticas

Los microorganismos utilizados en el estudio fueron manejados de forma segura y ética, siguiendo las pautas y regulaciones aplicables. Esto incluye la manipulación adecuada en

laboratorios con condiciones de bioseguridad apropiadas y la disposición segura de desechos biológicos.

Previo a realizar la investigación se garantizó el cumplimiento de los estándares mediante la aprobación del Comité de ética.

La investigación contó con el asesoramiento profesional y un laboratorio certificado donde además se utilizaron cepas de *S. mutans* certificadas y de calidad (ATCC 25175). Los datos fueron publicados y reconocidos sin favorecer a ningún grupo determinado manteniendo la objetividad del estudio.

IV. RESULTADOS

Esta investigación empleó 15 muestras por cada grupo de estudio con la finalidad de evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de las semillas de *B. orellana* en concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre la cepa *S. mutans* ATCC 25175 en tiempos de 24, 48 y 72 horas.

Tabla 1

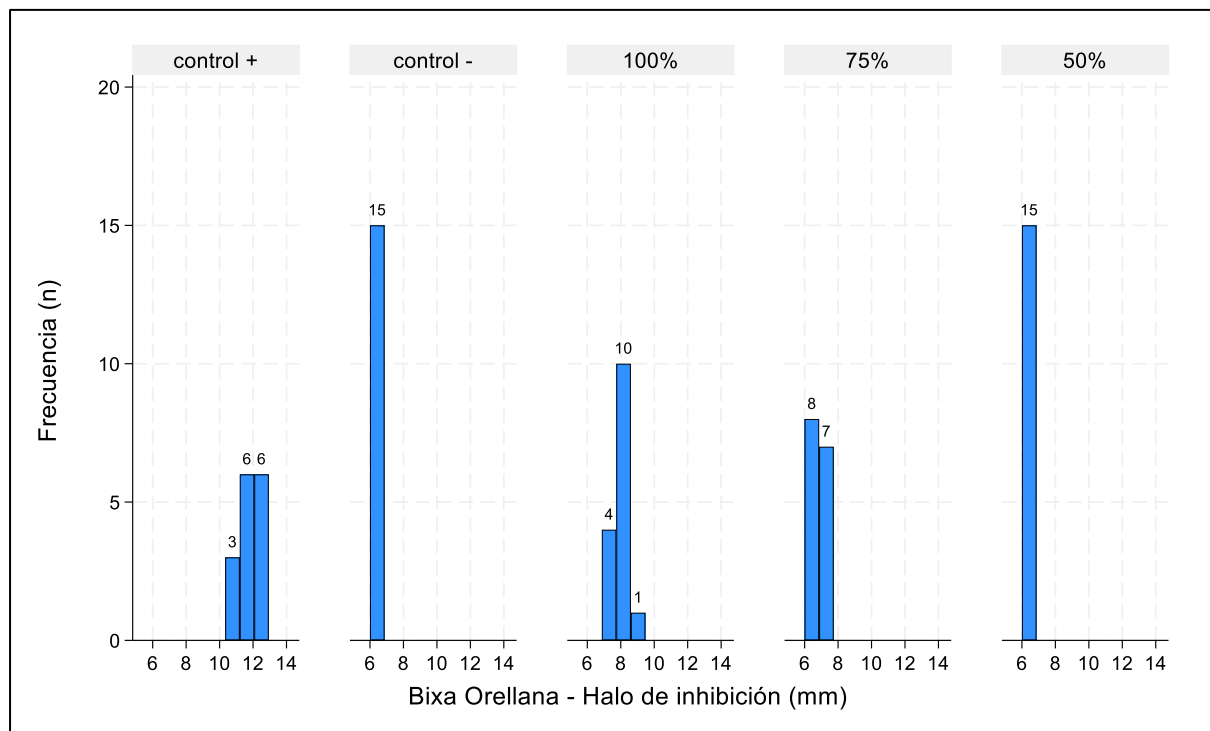
Tabla de sumario estadístico del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro

Grupos	n	\bar{x}	D.E.	Me	IQR	Mínimo	Máximo
control							
positivo	15	11.84	0.75	11.75	1.25	10.66	12.94
control							
negativo	15	6.00	0.00	6	0	6	6
100%	15	8.06	0.54	8.27	1.04	7.13	8.83
75%	15	6.91	0.56	6.86	1.21	6.13	7.66
50%	15	6.00	0.00	6	0	6	6
Total	75	7.76	2.24	6.86	2.42	6	12.94

Nota. El mayor valor de media lo presentó la Clorhexidina 0,12% (control +) resultando 11.84 mm y una D.E. correspondiente a 0.75 mm, seguido por el extracto de *B. orellana* en concentración de 100% con 8.06 mm de media y una D.E. correspondiente a 0.54 mm, luego el extracto de *B. orellana* al 75% con 6.91mm de media y una D.E. correspondiente a 0.56 mm. También se observó los menores valores de la media en el extracto de *B. orellana* al 50% y en el Agua destilada (control -) con 6 mm y una D.E. correspondiente a cero.

Figura 1

Distribución del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro



Nota. En la figura se observa que el mayor halo de inhibición lo presentó el control positivo (Clorhexidina 0,12%) con valores entre 10 y 12 mm, mientras el menor halo de inhibición se presentó en el control negativo y el extracto *B. orellana* al 50% con valores de 6 mm.

Tabla 2

Tabla de sumario estadístico del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 48 horas- In vitro

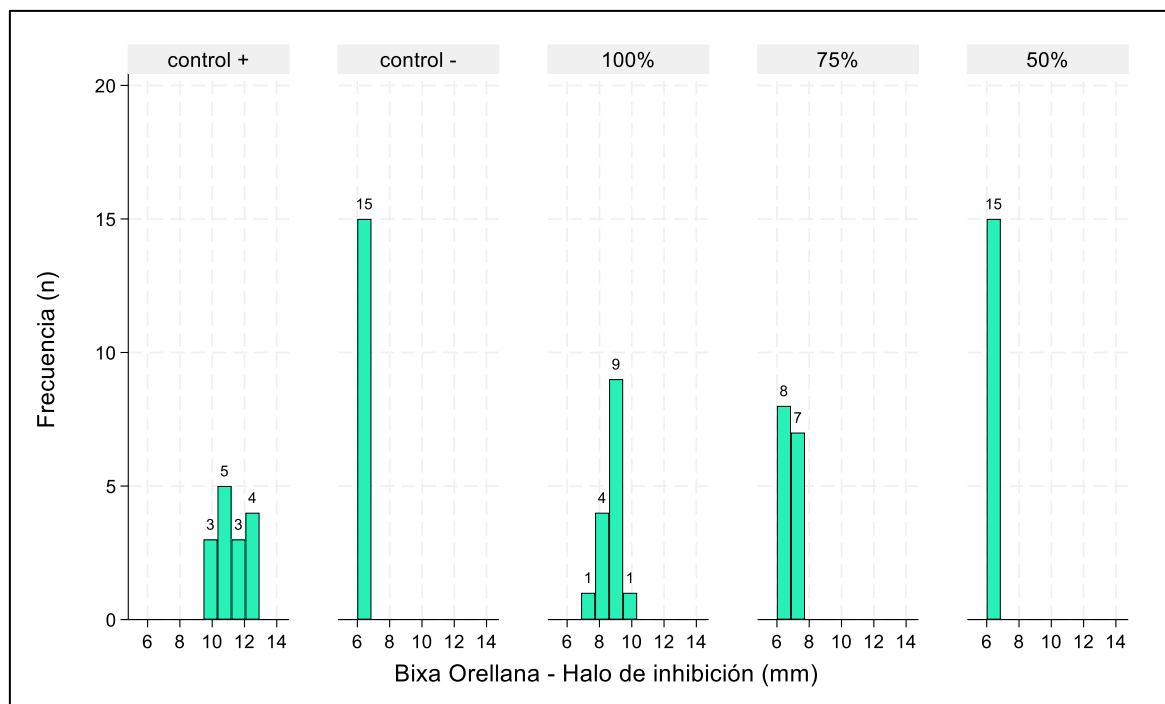
Grupos	n	\bar{x}	D.E.	Me	IQR	Mínimo	Máximo
Control							
positivo	15	11.24	0.94	10.76	1.74	10.29	12.93
Control							
negativo	15	6.00	0.00	6	0	6	6

100%	15	8.79	0.59	9.03	1.03	7.63	9.51
75%	15	6.77	0.59	6.86	1.18	6	7.63
50%	15	6.00	0.00	6	0	6	6
Total	75	7.76	2.10	6.86	3.29	6	12.93

Nota. El mayor valor de media lo presentó la Clorhexidina 0,12% (control+) resultando 11.24 mm y una D.E. correspondiente a 0.94 mm, seguido por el extracto de *B. orellana* en la concentración de 100% con 8.79 mm de media y una D.E. correspondiente a 0.59 mm, luego el extracto de *B. orellana* al 75% con 6.77 mm de media y una D.E. correspondiente a 0.59 mm. También se observó los menores valores de la media en el extracto de *B. orellana* al 50% y en el Agua destilada (control-) con 6 mm de media y una D.E. correspondiente a cero.

Figura 2

Distribución del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 48 horas - In vitro



Nota. En la figura se observa que el mayor halo de inhibición lo presentó el control positivo (Clorhexidina 0,12%) con valores entre 10 y 12 mm, mientras el menor halo de inhibición se presentó en el control negativo y el extracto *B. orellana* al 50% con valores de 6 mm. Respecto a los extractos de *B. orellana*, el mayor valor de halo de inhibición se encontró en la concentración del 100% con valores entre 6 y 10 mm.

Tabla 3

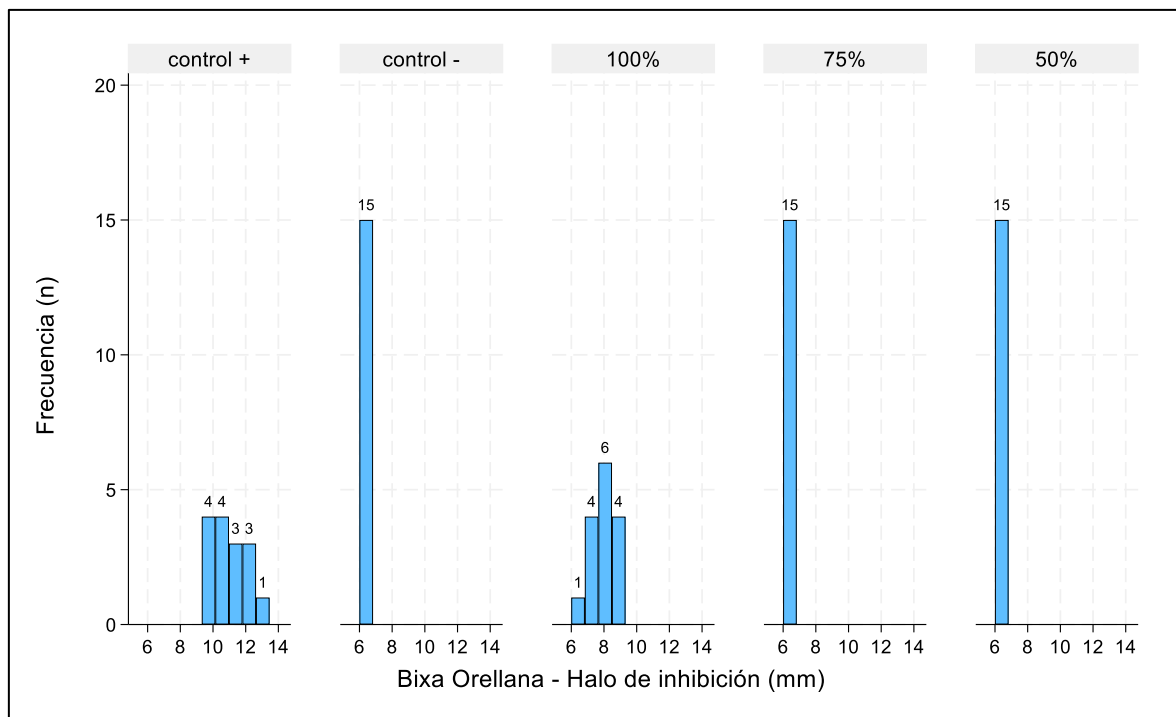
Tabla de sumario estadístico del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro

Grupos	n	\bar{x}	D.E.	Me	IQR	Mínimo	Máximo
control							
positivo	15	11.07	0.95	10.67	1.95	10.03	12.63
control							
negativo	15	6.00	0.00	6	0	6	6
100%	15	7.96	0.69	7.82	0.99	6.57	8.93
75%	15	6.16	0.21	6	0.35	6	6.52
50%	15	6.00	0.00	6	0	6	6
Total	75	7.44	2.04	6	2.51	6	12.63

Nota. El mayor valor de media lo presentó la Clorhexidina 0,12% (control +) resultando 11.07 mm y una D.E. correspondiente a 0.95 mm, seguido por el extracto de *B. orellana* en la concentración de 100% con 7.96 mm de media y una D.E. correspondiente a 0.69 mm, luego el extracto de *B. orellana* al 75% con 6.16 mm de media y una D.E. correspondiente a 0.21 mm. También se observó el menor valor de la media en el extracto de *B. orellana* al 50% y en el Agua destilada (control -) con 6 mm de media y una D.E. correspondiente a cero.

Figura 3

Distribución del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro



Nota. En la figura se observa que el mayor halo de inhibición lo presentó el control positivo (Clorhexidina 0,12%) con valores entre 10 y 14 mm, mientras el menor halo de inhibición se presentó en el control negativo y los extractos de *B. orellana* al 75% y al 50% con valores de 6 mm. Respecto a los extractos de *B. orellana*, el mayor valor de halo de inhibición se encontró en la concentración del 100% con valores entre 6 y 10 mm.

Tabla 4

Comparación del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 24 horas - In vitro

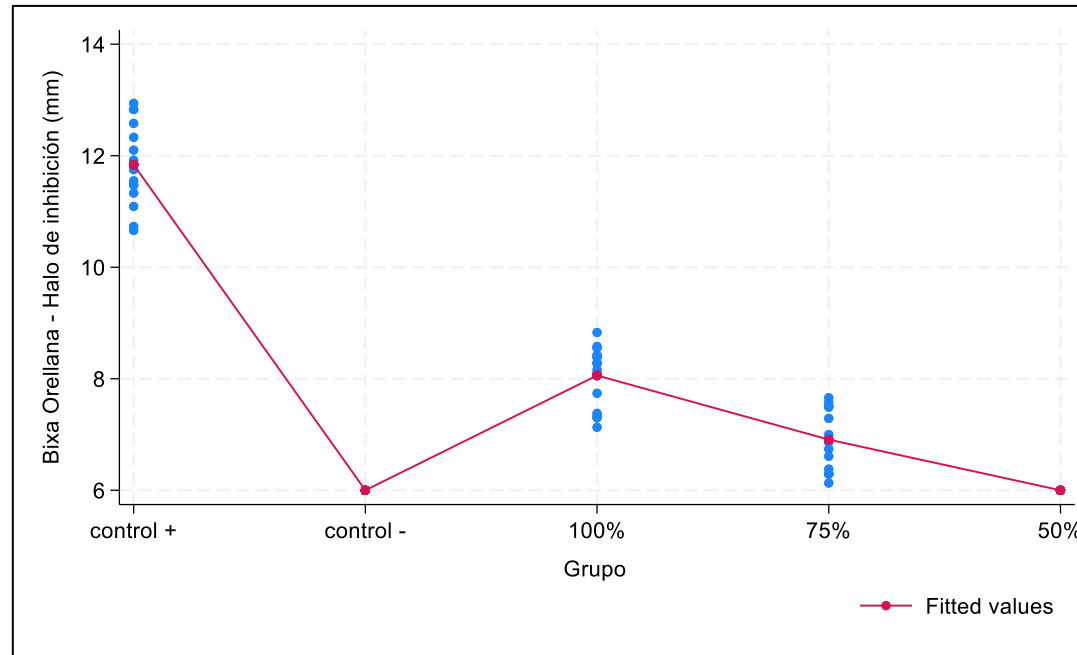
Tabla Sumario estadístico					
Grupo	Media	D.E.	Frecuencia (n)		
control positivo	11.84	0.75	15		
control negativo	6.00	0.00	15		
100%	8.06	0.54	15		
75%	6.91	0.56	15		
50%	6.00	0.00	15		
Total	7.76	2.24	75		
ANOVA de un factor					
Fuente	Sum S.	Degree f.	Media S.	Estadístico F	p valor
Entre grupos	354.73	4	88.68	380.31	0.001
Dentro de grupos	16.32	70	0.23		
Total	371.06	74	5.01		

Post-hoc Bonferroni				
	Control positivo	Control negativo	100%	75%
Control negativo	-5.84			
	0.01			
100%	-3.78	2.06		
	0.01	0.01		
75%	-4.93	0.91	-1.15	
	0.01	0.01	0.01	
50%	-5.84	0.00	-2.06	-0.91
	0.01	1.00	0.01	0.01

Nota. Al realizar la comparación se obtiene la existencia de diferencias significativas en el estudio. Cuando se realizan las comparaciones múltiples o prueba post-hoc de Bonferroni para identificar a los grupos entre los cuales existen diferencias significativas se determina que estos fueron control negativo vs control positivo ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs control positivo ($p=0.01$), *B. orellana* 75% vs control positivo ($p=0.01$), *B. orellana* 50% vs control positivo ($p=0.01$), control negativo vs *B. orellana* 100% ($p=0.01$), control negativo vs *B. orellana* 75% ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs *B. orellana* 75% ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs *B. orellana* 50% ($p=0.01$), *B. orellana* 75% vs *B. orellana* 50% ($p=0.01$).

Figura 4

Comparación del efecto antibacteriano del extracto de *B. orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *S. mutans* ATCC 25175 a las 24 horas -
In vitro



Nota. Se observa en la figura que el mayor valor de halo de inhibición se presentó en el grupo control positivo y el menor valor en los grupos control negativo y *B. orellana* al 50%. Cuando se comparan los grupos con diferentes concentraciones de *B. orellana*, el mayor valor de halo de inhibición se presentó en el grupo con una concentración del 100%.

Tabla 5

Comparación del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 48 horas - In vitro

Tabla Sumario estadístico					
Grupo	Media	D.E.	Frecuencia (n)		
Control positivo	11.24	0.94	15		
control negativo	6.00	0.00	15		
100%	8.79	0.59	15		
75%	6.77	0.59	15		
50%	6.00	0.00	15		
Total	7.76	2.10	75		
ANOVA de un factor					
Fuente	Sum S.	Degree f.	Media S.	Estadístico F	Prob > F
Entre grupos	304.72	4	76.18	242.2	0.001
Dentro de los grupos	22.02	70	0.31		
Total	326.74	74	4.42		

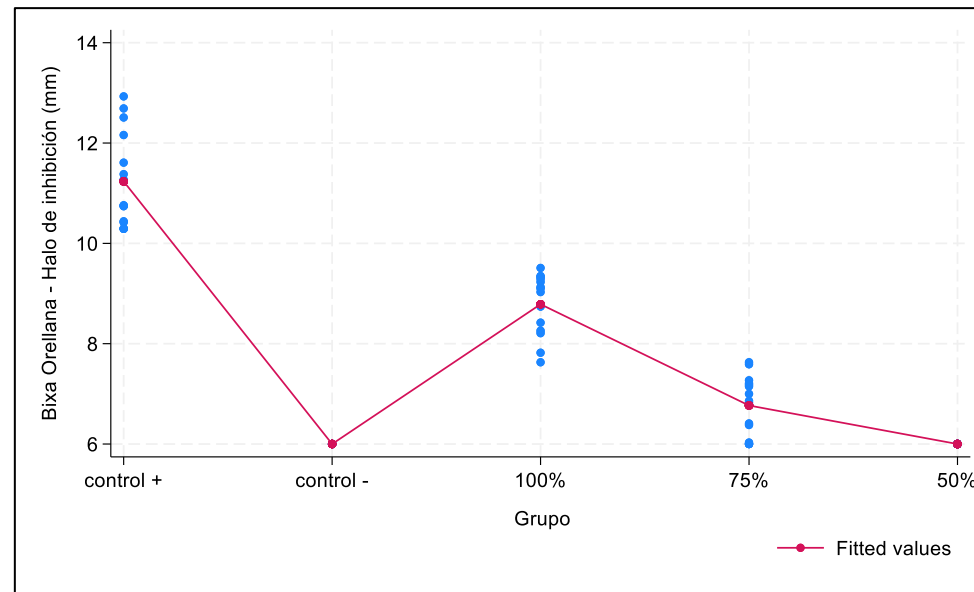
Post -hoc Bonferroni				
	Control positivo	Control negativo	100%	75%
Control negativo	-5.24			
	0.01			
100%	-2.45	2.79		
	0.01	0.01		
75%	-4.47	0.77	-2.02	
	0.01	0.01	0.01	
50%	-5.24	0.00	-2.79	-0.77
	0.01	1.00	0.01	0.01

Nota. Al realizar la comparación se observa la existencia de diferencias significativas en el estudio. Cuando se realizan las comparaciones múltiples o prueba post-hoc de Bonferroni para identificar a los grupos entre los cuales existen diferencias significativas se determina que se presentó diferencias significativas en las siguientes comparaciones control negativo vs control positivo ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs control positivo ($p=0.01$), *B. orellana* 75% vs control positivo ($p=0.01$), *B. orellana* 50% vs control positivo ($p=0.01$), control negativo vs *B. orellana* 100%

($p=0.01$), control negativo vs *B. orellana* 75% ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs *B. orellana* 75% ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs *B. orellana* 50% ($p=0.01$), *B. orellana* 75% vs *B. orellana* 50% ($p=0.01$).

Figura 5

Comparación del efecto antibacteriano del extracto de *B. orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *S. mutans* ATCC 25175 a las 48 horas -
In vitro



Nota. Se observa en la figura que el mayor valor de halo de inhibición a las 48 horas se presentó en el grupo control positivo y el menor valor en los grupos control negativo y *B. orellana* al 50%. Al comparar los grupos con diferentes concentraciones de *B. orellana*, el mayor valor de halo de inhibición se presentó en el grupo con una concentración del 100%.

Tabla 6

Comparación del efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 72 horas - In vitro

H de Kruskal-Wallis		
Grupos	Observado	Rango de suma
control (+)	15	1020.00
control (-)	15	292.50
100%	15	795.00
75%	15	450.00
50%	15	292.50
chi2(4) =	59.163	
Prob =	0.0001	
chi2(4) with ties =	68.005	
Prob =	0.0001	
Test de Dunn		

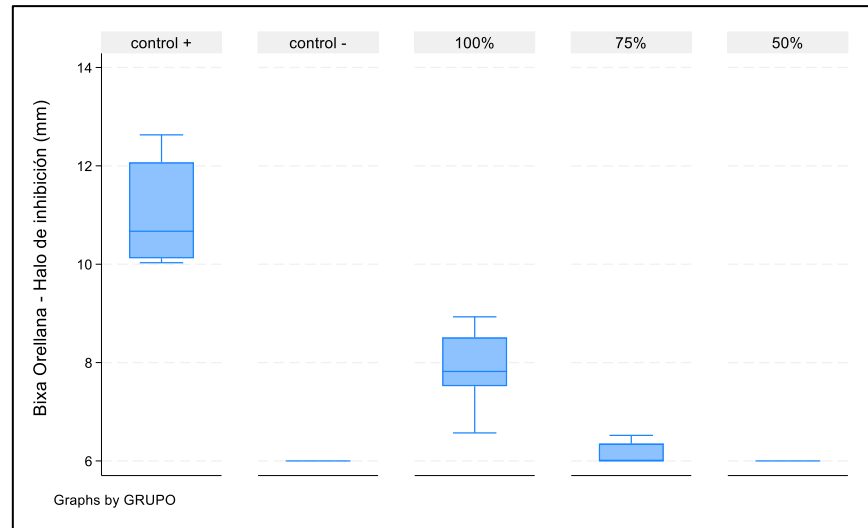
	Control positivo	Control negativo	100%	75%
Control negativo	6.53			
	0.01			
100%	2.02	-4.51		
	0.02	0.01		
75%	5.12	-1.41	3.10	
	0.01	0.08	0.01	
50%	6.53	0.00	4.51	1.41
	0.01	0.50	0.01	0.08

Nota. Al realizar la comparación se observa que existen diferencias significativas en el estudio. Cuando se realizan las comparaciones múltiples o prueba post-hoc de Dunn para identificar a los grupos entre los cuales existen diferencias significativas se determina que se presentó diferencias significativas en las siguientes comparaciones control positivo vs control negativo ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs control positivo ($p=0.02$), *B.*

orellana 75% vs control positivo ($p=0.01$), *B. orellana* 50% vs control positivo ($p=0.01$), control negativo vs *B. orellana* 100% ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs *B. orellana* 75% ($p=0.01$), *B. orellana* 100% vs *B. orellana* 50% ($p=0.01$).

Figura 6

Comparación del efecto antibacteriano del extracto de *B. orellana* (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre *S. mutans* ATCC 25175 a las 72 horas -
In vitro



Nota. Se observa que el mayor valor de la mediana de halo de inhibición se presentó en el grupo con control positivo a comparación del resto de grupos y el menor valor de la mediana se presentó en el grupo con concentración de *B. orellana* al 50% y control negativo. Al comparar el valor de la mediana entre las diferentes concentraciones de *B. orellana* se observa que el mayor valor de la mediana de halo de inhibición se presentó en la concentración al 100%.

Tabla 7

Comparar el efecto antibacteriano del extracto de B. orellana (Achiote) al 50%, 75%, 100% y la Clorhexidina al 0,12% sobre S. mutans ATCC 25175 a las 24, 48 y 72 horas - In vitro

H de Kruskal-Wallis		
Grupos	Observado	Rango de suma
24h +	15	3146
24h -	15	765
24h100%	15	2270.5
24h75%	15	1847
24h50%	15	765
48h +	15	3019
48h -	15	765
48h100%	15	2512
48h75%	15	1644
48h50%	15	765

	0.01	0.01	0.11								
24h50%	7	0	4.43	3.18							
	0.01	0.5	0.01	0.01							
48h +	0.37	-6.63	-2.2	-3.45	-6.63						
	0.35	0.01	0.01	0.01	0.01						
48h -	7	0	4.43	3.18	0	6.63					
	0	0.5	0.01	0.01	0.5	0.01					
48h100%	1.86	-5.14	-0.71	-1.96	-5.14	1.49	-5.14				
	0.03	0.01	0.24	0.03	0.01	0.07	0.01				
48h75%	4.42	-2.59	1.84	0.6	-2.59	4.04	-2.59	2.55			
	0.01	0.01	0.03	0.28	0.01	0.01	0.01	0.01			
48h50%	7	0.01	4.43	3.18	0	6.63	0	5.14	2.59		
	0.01	0.5	0.01	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	0.01		
72h +	0.52	-6.48	-2.06	-3.3	-6.48	0.14	-6.48	-1.35	-3.9	-6.48	
	0.3	0.01	0.02	0.01	0.01	0.44	0.01	0.09	0.01	0.01	
72h -	7	0	4.43	3.18	0	6.63	0	5.14	2.59	0	6.48

	0.01	0.5	0.01	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	0.01	0.5	0.01			
72h100%	2.64	-4.36	0.07	-1.18	-4.36	2.27	-4.36	0.78	-1.77	-4.36	2.12	-4.36		
	0.01	0.01	0.47	0.12	0.01	0.01	0.01	0.22	0.04	0.01	0.02	0.01		
72h75%	5.78	-1.22	3.21	1.96	-1.22	5.41	-1.22	3.92	1.37	-1.22	5.27	-1.22	3.14	
	0.01	0.11	0.01	0.02	0.11	0.01	0.11	0	0.09	0.11	0	0.11	0.01	
72h50%	7	0	4.43	3.18	0	6.63	0	5.14	2.59	0	6.48	0	4.36	1.22
	0.01	0.5	0.01	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	0.11

Nota. En el cuadro se observa que existen diferencias significativas entre los grupos estudiados (extractos de *B. orellana*, Clorhexidina 0,12%). También se logra observar que el control positivo (Clorhexidina 0,12%) a las 24 horas presentó un mayor valor de la mediana en comparación con todos los grupos evaluados.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el tiempo actual se ha hecho uso de la terapia alternativa basada en el empleo de plantas medicinales para tratar diversas patologías originadas por microorganismos. La cavidad oral no ha sido ajena a ello, pues también se ha hecho el uso de esta terapia para evitar el desarrollo de microorganismos orales, más aún la evidencia científica es escasa para poder demostrar su eficacia ante estas patologías.

Por lo tanto, es fundamental estudiar el efecto antibacteriano de ciertas especies, entonces la presente investigación tiene como propósito evaluar la efectividad antibacteriana del extracto hidroetanólico de *B. Orellana* (Achiote) en concentraciones de 50%, 75% y 100% a las 24, 48 y 72 horas frente al microorganismo *S. mutans* ATCC 25175.

En nuestra investigación obtuvimos como resultado que los extractos hidroetanólicos de *B. orellana* presentan efectividad antibacteriana sobre el *S. mutans* evidenciando formación de halos inhibitorios, siendo la concentración del 100% la que tuvo mayor valor de inhibición promedio (8.79 mm) en las 48 horas. Este hallazgo muestra coincidencia con la investigación realizada por Granados (2023), donde hubo una formación de 10.22 mm, siendo mayor en diferencia de otras concentraciones y tiempos estudiados. De la misma forma, hay coincidencia con los resultados del estudio de Murillo (2019) que determinó que el mayor halo inhibitorio se formó en la concentración del 100% a las 48 horas.

En el estudio realizado por Collantes (2019) también se encuentra concordancia en tiempos (48 horas) con nuestra investigación, pero difiere en concentraciones, pues este estudio presenta como mayor resultado al halo de inhibición formado por el extracto al 75% a diferencia de nuestro estudio que presenta el mayor halo inhibitorio en la concentración del 100%. Esto posiblemente sucede porque el estudio sólo tomó en cuenta las concentraciones del 25%, 50% y 75% y no se realizó en la concentración al 100%.

En comparativa con la investigación que efectuó Dos Santos et al. (2021) el cual tuvo como el mayor resultado en el tiempo de 24 horas, encontramos diferencias con la investigación que realizamos la cual mostró una inhibición promedio de 8.06 mm en las 24 horas siendo menor que el promedio de halo de inhibición formado a las 48 horas (8.79 mm). Probablemente esto fue en consecuencia a que el estudio sólo se realizó en un periodo de tiempo a diferencia de nuestra investigación que fue realizada en tres tiempos (24, 48 y 72 horas).

Otro resultado obtenido por nuestro estudio fue la menor inhibición promedio (6 mm), el cual se formó en el extracto de *B. orellana* al 50% a las 24,48 y 72 horas. Este resultado coincide con el estudio de Granados (2023) que presentó en los tres tiempos el menor valor en la concentración del 50%. También coincide con la investigación de Murillo (2019) que presentó un valor de 6 mm a las 24 horas y 6,25 mm a las 48 horas. A su vez nuestro estudio difiere con el estudio de Collantes (2019) que presentó el menor valor en la concentración del 25% con un valor de 23,35 mm.

Con respecto a la Clorhexidina 0,12% (control +), nuestro estudio revela presencia de una inhibición superior promedio en comparación a los extractos de *B. orellana* en los tres tiempos estudiados. Resultados que coinciden con la investigación de Murillo (2019) donde la Clorhexidina 0,12% a las 24 y 48 horas presenta mayor valor promedio que el extracto de Achiote. Además, estos resultados difieren con los obtenidos por Granados (2023) el cual obtuvo inhibición superior promedio en *B. orellana* al 100% y Collantes (2019) que obtuvo igual acción antibacteriana tanto en la Clorhexidina 0,12% como en el extracto de *B. orellana* al 75%.

VI. CONCLUSIONES

6.1. Se llegó a la conclusión que el extracto hidroetanólico de *B. orellana* en la concentración de 75% y en la de 100% muestra efectividad antibacteriana frente al *S. mutans* ATCC 25175 en los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

6.2. Se concluye que, el promedio más alto de formación de halo inhibido fue de la Clorhexidina al 0.12% (11.84 mm) en las 24 horas, seguido por el extracto hidroetanólico de *B. orellana* al 100% (8.06 mm) y el promedio más bajo de formación de halo inhibido fue del extracto hidroetanólico de *B. orellana* al 50% (6 mm).

6.3. Se demostró que, la más alta medida de promedio de formación de halo inhibido fue de la Clorhexidina al 0.12% (11.24 mm) en las 48 horas, lo sigue el extracto hidroetanólico de *B. orellana* al 100% (8.79 mm) y la menor medición promedio de halo de inhibición fue formado por el extracto hidroetanólico de *B. orellana* al 50% (6 mm).

6.4. Se observó que, a las 72 horas, el mayor promedio de formación de halo inhibido fue de la Clorhexidina al 0.12% (11.07 mm), seguido por el extracto hidroetanólico de *B. orellana* al 100% (7.96 mm) y el promedio más bajo de formación de halo inhibido fue del extracto hidroetanólico de *B. orellana* al 50% (6 mm).

6.5. Se infiere que el mayor valor promedio fue obtenido por la Clorhexidina al 0.12% a las 24 horas en comparación con los extractos hidroetanólicos de *B. orellana* al 50%, 75% y 100%.

6.6. Se demostró que el mayor valor promedio fue obtenido por la Clorhexidina al 0.12% a las 48 horas en comparación con los extractos hidroetanólicos de *B. orellana* al 50%, 75% y 100%.

6.7. Se infiere que el mayor valor promedio fue obtenido por la Clorhexidina al 0.12% a las 72 horas comparado con los extractos hidroetanólicos de *B. orellana* al 50%, 75% y 100%.

VII. RECOMENDACIONES

7.1. Se recomienda hacer futuras investigaciones “in vivo” del extracto hidroetanólico de *B. orellana* (Achiote), para comparar con los datos resultantes en las pruebas “in vitro”.

7.2. Recomendamos evaluar la efectividad antibacteriana de la *B. orellana* (Achiote) en otros patógenos relacionados a enfermedades orales.

7.3. Se sugiere desarrollar nuevas investigaciones para evaluar el daño celular que puedan provocar los componentes de la *B. orellana* (Achiote).

7.4. Se recomienda elaborar extractos de otras partes de la planta *B. orellana* (Achiote) para evaluar si tienen mayor efectividad ante las cepas de *S. mutans* ATCC 25175.

7.5. Se recomienda desarrollar colutorios y pastas dentales que tengan como componente *B. orellana* (Achiote) para estudiar su efecto en la prevención de enfermedades orales.

VIII. REFERENCIAS

- Alosaimi B, Alturki G, Alnofal S, Alosaimi N, Ansari S. (2017). Assessing untreated dental caries among private and public preschool children in Riyadh, a cross-sectional study design. *Journal Dental Oral Health*, 3(10), 1-5. <https://www.semanticscholar.org/paper/Assessing-Untreated-Dental-Caries-among-Private-and-Alosaimi-Alturki/0f89024aca910fc748cab0b679fdc987126ae784>
- Arweiler, N., y Netuschil, L. (2016). The Oral Microbiota. *Advances in experimental medicine and biology*, 902, 45–60. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4
- Collantes, M. (2019). *Efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanolico de hojas de Bixa orellana L. (ACHIOTE) frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175, TRUJILLO – 2018*. [Tesis para optar el título profesional de cirujano dentista, Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote]. Repositorio Institucional ULADECH CATÓLICA. http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/11178/ACHIOTE_ANTIBACTERIANO_COLLANTES_VARGAS_MERLY.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cuong, T., y Chin, K. (2016). Effects of Annatto (Bixa orellana L.) Seeds Powder on Physicochemical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Pork Patties during Refrigerated Storage. *Korean journal for food science of animal resources*, 36(4), 476–486. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.476>
- Chen, D. y Lin, H. (2022). *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban. Journal of Sichuan University. Medical science edition*, 53(2), 208–213. <https://doi.org/10.12182/20220360508>
- Dos Santos, D., Da Silva, A., Schneider, L., Cuevas, C., Ribeiro, J., Damian, M., Campos, A., y Lund, R. (2021). Antimicrobial and physical properties of experimental endodontic sealers containing vegetable extracts. *Scientific reports*, 11(1), 6450.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85609-4>

- Duque, E., Aguirre, M., y Tamayo, A. (2022). Caracterización fenotípica, genotípica y ensayos de autopolinización en 18 accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 46(2), 117-134. <https://dx.doi.org/10.15517/rac.v46i2.52052>
- Franklin, V., Bach, E., Wadt, N., Bach, E. (2023). Aqueous extract from urucum (*Bixa orellana* L.): antimicrobial, antioxidant, and healing activity. *Porto Biomedical Journal*, 8(1), 1-5. <https://doi.org/10.1097/j.pbj.000000000000183>
- Giacaman R. (2018). Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. *Oral Dis*, 24(7), 1185–1197. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/odi.12778>
- Granados, L., Medrano, S., Gamboa, E., Ladera, M., Castañeda, L., Cervantes L (2023). Antibacterial activity of *Bixa orellana* compared with *Camellia sinensis* against *Streptococcus mutans*: An in vitro comparative study. *Journal of international oral health*, 15,174-83.
- Hernández, L., Pabón, L. y Hernández, P. (2021). Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(1), 43–56. <https://doi.org/10.18359/rfcb.4896>
- Jiang, Q., Liu, J., Chen, L., Gan, N., y Yang, D. (2019). The oral microbiome in the elderly with dental Caries and health. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 442. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00442>
- Kar, B., Chandar, B., Rachana, S. S., Bhattacharya, H., y Bhattacharya, D. (2021). Antibacterial and genotoxic activity of *Bixa orellana*, a folk medicine and food supplement against multidrug resistant clinical isolates. *Journal of Herbal Medicine*, 100502.

<https://doi:10.1016/j.hermed.2021.100502>

- Karmakar, U., Sultana, S., Nishi, S., Biswas, N. N., Hossain, L., & Sheikh, S. (2018). Antioxidant, Analgesic, Antimicrobial, and Anthelmintic Activity of the Dried Seeds of *Bixa orellana* (L). *International Journal of Pharmacy*, 8(1), 150-163. <https://www.pharmascholars.com/abstract/antioxidant-analgesic-antimicrobial-and-anthelmintic-activity-of-the-dried-seeds-of-bixa-orellana-1-51360.html>
- Lima, J., Zagmignan, A., Lima Lobato, L. F., Gomes Abreu, A., Jr, da Silva, L. C. N., de Sá, J. C., Monteiro, C. A., Lago, J. H. G., Gonçalves, L. M., Carvalho, R. C., Neto, L. G. L., & de Sousa, E. M. (2018). Hydroalcoholic Extract and Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* Leaves Decrease the Inflammatory Response to Mycobacterium abscessus Subsp. massiliense. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2018, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/6091934>
- Lemos, J., Palmer, S., Zeng, L., Wen, Z., Kajfasz, J., Freires, I., Abranches, J., y Brady, L. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology spectrum*, 7(1), 1-18. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018>
- León, G., Saavedra M, y Valenzuela, M. (2022). Prácticas de medicina tradicional en trabajadores administrativos nativos andinos en el sur del Perú. *Atencion primaria*, 54(8), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2022.102355>
- Lu, Y., Lin, Y., Li, M., y He, J. (2023). Roles of *Streptococcus mutans*-*Candida albicans* interaction in early childhood caries: a literature review. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1-7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1151532>
- Marsh, P., Do, T., Beighton, D., y Devine, D. (2017). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>
- Marsh, P. (2010). Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 441–454.

<https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.002>

Medina, D., Ulloa G., Camere, R., Caballero, S., Mayta F., y Del Valle J. (2016) Antibacterial activity of *Bixa orellana* L.(achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5), 400–403.

<https://core.ac.uk/download/pdf/82791827.pdf>

Mostacero. J., García, L., López, S., De La Cruz-Castillo A, Gil A. (2022) Valor de uso medicinal de la flora empleada por la Comunidad Andina de Jesús, Cajamarca, Perú. *Revista Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 21 (5), 561 - 576.

<https://doi.org/10.37360/blacpma.22.21.5.34>

Morales., L, y Gómez, W. (2019). Caries dental y sus consecuencias clínicas relacionadas al impacto en la calidad de vida de preescolares de una escuela estatal. *Revista Estomatológica Herediana*, 29(1), 17-29. <https://dx.doi.org/10.20453/reh.v29i1.3491>

Murillo M. (2019). *Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de achiote (Bixa orellana) sobre cepas de Streptococcus mutans*. [Tesis para optar el título profesional de cirujano dentista, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Digital UCE.

<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/18333>

Nascimento, N., Roberval, G., Gabrielle, Rezende., de Brito Pontes D., Pinheiro, R., de Araújo, D., Pontes, R., Lima-Neto, L., y de Sousa, E. (2020). Compounds isolated from *Bixa orellana*: evidence-based advances to treat infectious diseases. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 49(3), 581-601.

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n3.91247>

Ojeda, J., Oviedo, E., y Salas, L. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES Odontología*, 26(1), 44-56.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en&tlng=es.

- Pitts, N., Twetman, S., Fisher, J., y Marsh, P. (2021). Understanding dental caries as a non-communicable disease. *British dental journal*, 231(12), 749–753. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>
- Peng, X., Cheng, L., You, Y., Tang, C., Ren, B., Li, Y., Xu, X., y Zhou, X. (2022). Oral microbiota in human systematic diseases. *International journal of oral science*, 14(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00163-7>
- Rana, R., Sharma, R., y Kumar, A. (2019). Repurposing of Existing Statin Drugs for Treatment of Microbial Infections: How Much Promising?. *Infectious disorders drug targets*, 19(3), 224–237. <https://doi.org/10.2174/1871526518666180806123230>
- Rivera, R., Aguilar, M., Cárdenas, Y., y Garza, L. (2016). Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Frontiers in plant science*, 7, 1406. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01406>
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S., y Kapila, Y. (2021). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontology 2000*, 87(1), 107–131. <https://doi.org/10.1111/prd.12393>
- Teixeira da Silva, J., Dobránszki, J., y Rivera, R. (2018). The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (achiote). *Planta*, 248(2), 267–277. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2909-7>
- Tello G, Flores, M, y Gómez, V. (2019). Uso de las plantas medicinales del distrito de Quero, Jauja, Región Junín, Perú. *Ecología Aplicada*, 18(1), 11-20. <https://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i1.1301>
- Valarezo, E., Torres, S., Pineda, N., Jaramillo, X., Cartuche, L., Morocho, V., Meneses, M. (2023) Study of Essential Oil Isolated from Achiote (*Bixa orellana*) Leaves: Chemical Composition, Enantiomeric Distribution and Antimicrobial, Antioxidant and Anticholinesterase Activities. *Antibiotics*, 12(1), 1-13.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics12040710>

Valdebenito, E. (2019). *Efecto remineralizante de un agente a base de Flúor y Grafeno sobre discos de esmalte desmineralizado con un modelo de biopelícula de Streptococcus mutans observado en Microct.* [Tesis para optar el título profesional de cirujano dentista, Universidad de Chile]. Repositorio académico de la Universidad de Chile.

<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/173410>

Velázquez, G., Pérez, B., Ortega, L., y Nelly Z. (2019). Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(3), 265-276.

<https://doi.org/10.37360/blacpma.19.18.3.17>

Walsh, T., Worthington, H., Glenny, A., Marinho, V., y Jeroncio, A. (2019). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3(3), 7868.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD007868.pub3>

Yon, M., Gao, S., Chen, K., Duangthip, D., y Chu, C. (2019). Medical Model in Caries Management. *Dentistry journal*, 7(2), 37. <https://doi.org/10.3390/dj7020037>

IX. ANEXOS

9.1. Anexo A

9.1.1. Instrumento de recolección de datos

MICROORGANISMO	EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE <i>Bixa orellana</i>					
	Longitud de halos de inhibición (mm) – 24 horas					
	N	Control positivo	Control negativo	100%	75%	50%
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	13					
	14					
	15					

MICROORGANISMO	EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE <i>Bixa orellana</i>					
	Longitud de halos de inhibición (mm) – 48 horas					
	N	Control positivo	Control negativo	100%	75%	50%
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	13					
	14					
	15					

MICROORGANISMO	EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE <i>Bixa orellana</i>					
	Longitud de halos de inhibición (mm) – 72 horas					
	N	Control positivo	Control negativo	100%	75%	50%
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	13					
	14					
	15					

9.2. Anexo B

9.2.1. Carta de presentación

 <p>Universidad Nacional Federico Villarreal</p>	<p>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</p>
<p>"Año del Bicentenario de la consolidación de nuestra Independencia y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"</p>	
<p>OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO</p>	
<p>Pueblo Libre, 2 de julio de 2024</p>	
<p>Doctor EDUARDO FLORES JUAREZ DECANO - FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</p>	
<p>Atención: Q.F. PAÚL IVÁN GUTIÉRREZ ELESCANO CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO</p>	
<p>Presente.-</p>	
<p>De mi especial consideración:</p>	
<p>Tengo el agrado de dirigirme a usted, con la finalidad de presentarle a la Bachiller en Odontología Srta. Angela Gabriela Cosser Torres, quien se encuentra realizando el Plan de Tesis titulado:</p>	
<p>«EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE BIXA ORELLANA (ACHIOTE) SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175- ESTUDIO IN VITRO»</p>	
<p>En tal virtud, mucho agradeceré le brinde las facilidades del caso a la Srta. Cosser quien realizará el siguiente trabajo:</p>	
<p>✓ <i>Preparación del extracto de semilla de Bixa Orellana (Achiote) en tres concentraciones y posterior prueba de sensibilidad ante el streptococcus mutans ATCC 25175.</i></p>	
<p>Estas actividades, le permitirán al bachiller, desarrollar su trabajo de investigación.</p>	
<p>Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para renovarle los sentimientos de mi especial consideración.</p>	
<p>Atentamente</p>	
 <p>Dr. FRANCO RAÚL MAURICIO VALENTÍN DECANO</p>	 <p>Dr. AMÉRICO A. MUNAYCO MAGALLANES JEFE OFICINA DE GRADOS y GESTIÓN DEL EGRESADO FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</p>
<p>Se adjunta: Plan de Tesis 022-2024 NT: 048553 - 2024 AAMM/Luz V.</p>	
<p>Calle San Marcos N°351 – Pueblo Libre e-mail: ogt.fo@unfv.edu.pe</p>	
<p>Telef.: 7480888 - 8335</p>	

9.3. Anexo C

9.3.1. *Elaboración del extracto hidroetanólico de B. orellana*



Mezcla de la muestra triturada y etanol-agua, almacenamiento en frasco ámbar y rotulado



Filtración del extracto



Extracto de *Bixa orellana* al 50%, 75% y 100%



9.4. Anexo D

9.4.1. Certificado de elaboración del extracto hidroetanólico de *B. orellana*

	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Universidad del Perú. Decana de América Facultad de Farmacia y Bioquímica CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO – CCA	
REPORTE DE ANÁLISIS N° 00290-CCA-2024		

SOLICITADO POR*	:	ANGELA GABRIELA COSSER TORRES
DIRECCIÓN*	:	CALLE SAN MARTIN 157 COOPERATIVA SANTA ELENA
MUESTRA*	:	SEMILLAS DE <i>Bixa orellana</i>

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO RECEPCIONADO	:	01 caja de cartón embalada y rotulado a mano.
VARIEDAD RECEPCIONADA*	:	-
PRINCIPIO ACTIVO*	:	- N° CAS*: -
NÚMERO DE LOTE*	:	-
CANTIDAD	:	400 g
ORDEN DE ANÁLISIS	:	0238-2024
FECHA DE RECEPCIÓN	:	22 de julio del 2024
FECHA DE FABRICACIÓN*	:	-
FECHA DE VENCIMIENTO*	:	-
EJECUCIÓN DEL ENSAYO	:	Del 24 de julio del 2024 al 12 de agosto del 2024
FECHA DE EMISIÓN	:	16 de agosto del 2024

ENSAYO	CONCENTRACIÓN	RESULTADOS
EXTRACTO HIDROETANÓLICO	100% (p/v)	Conforme
EXTRACTO HIDROETANÓLICO	75% (p/v)	Conforme
EXTRACTO HIDROETANÓLICO	50% (p/v)	Conforme

 Q.F. Paul Iván Gutiérrez Elecano Director del Centro de Control Analítico	
--	---

*Datos proporcionados por el cliente.
Los resultados son válidos solo para la muestra creada.

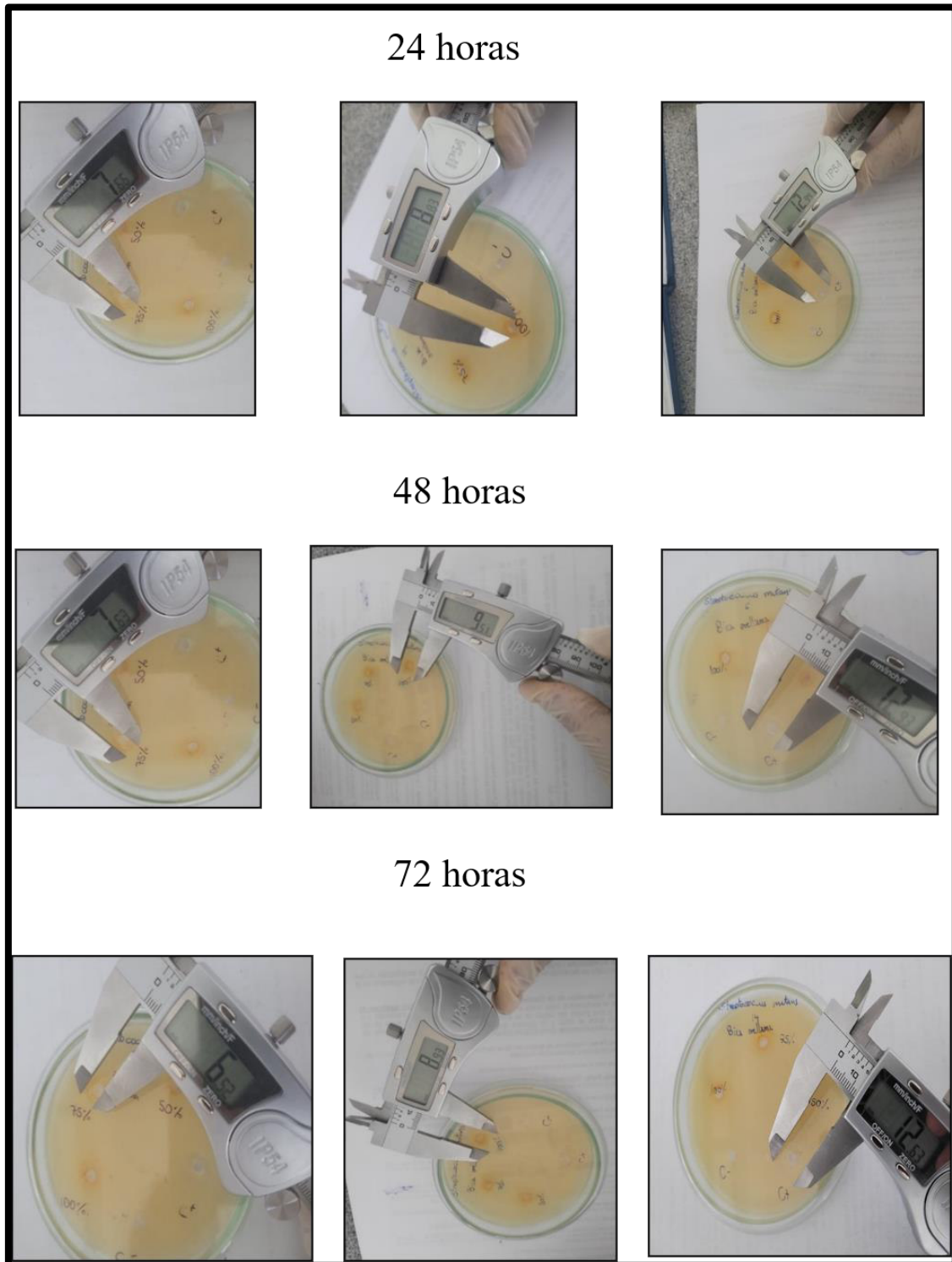

*El presente código QR contiene el
este documento válido original.

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú Teléfonos: 619-7000 anexo 4824 - 982949135 – Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

9.5. Anexo E

9.5.1. Evaluación de efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de *B. orellana* al 50%, 75% y 100% sobre *S. mutans* ATCC 25175



9.6. Anexo F

9.6.1. Certificado del efecto antibacteriano



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica



CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO – CCA

REPORTE DE ANÁLISIS N° 00299-CCA-2024

SOLICITADO POR* : ANGELA GABRIELA COSSER TORRES
DIRECCIÓN* : CALLE SAN MARTIN 157 COOPERATIVA SANTA ELENA
MUESTRA* : EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE BIXA ORELLANA
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO RECEPCIONADO : 03 frascos de vidrio oscuro sellado con Parafilm + 01 control positivo de Perio-Aid de 150 mL.
VARIEDAD RECEPCIONADA* : -
PRINCIPIO ACTIVO* : - N° CAS*: -
NÚMERO DE LOTE* : -
CANTIDAD : 100 mL aprox. c/u
ORDEN DE ANÁLISIS : 0244-2024
FECHA DE RECEPCIÓN : 12 de agosto del 2024
FECHA DE FABRICACIÓN* : -
FECHA DE VENCIMIENTO* : -
EJECUCIÓN DEL ENSAYO : Del 26 de agosto del 2024 al 02 de septiembre del 2024
FECHA DE EMISIÓN : 03 de septiembre del 2024

EFICACIA ANTIMICROBIANA

MICROORGANISMO	EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE BIXA ORELLANA				
	Halos de inhibición (mm) – 24 horas				
	Control positivo	Control Negativo	50%	75%	100%
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	11.55	6	6	7.51	8.58
	11.75	6	6	7	8.10
	11.47	6	6	6.29	7.33
	12.10	6	6	7.58	8.38
	10.73	6	6	6.61	8.55
	12.94	6	6	7.29	8.83
	12.33	6	6	6.38	8.42
	11.48	6	6	6.74	8.29
	12.83	6	6	6.86	7.13
	11.33	6	6	7.51	8.16
	10.66	6	6	6.13	7.74
	11.09	6	6	7.66	8.27
	11.92	6	6	6.30	7.30
	12.83	6	6	6.29	7.38
	12.58	6	6	7.49	8.42

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
 Universidad del Perú. Decana de América
 Facultad de Farmacia y Bioquímica



MICROORGANISMO	EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE BIXA ORELLANA				
	Halos de inhibición (mm) – 48 horas				
	Control positivo	Control Negativo	50%	75%	100%
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	10.30	6	6	7.21	9.29
	10.75	6	6	7	8.75
	10.76	6	6	7.15	8.26
	10.42	6	6	6.03	9.03
	10.29	6	6	6.82	9.10
	12.93	6	6	6.38	9.51
	12.16	6	6	7.27	9.33
	10.29	6	6	7.59	8.74
	11.38	6	6	6.86	7.63
	11.27	6	6	6	9.23
	10.44	6	6	6	7.82
	10.74	6	6	7.18	9.35
	11.61	6	6	7.63	8.21
	12.69	6	6	6	8.42
	12.51	6	6	6.41	9.13



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú Teléfonos: 619-7000 anexo 4824 - 982949135 – Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica



MICROORGANISMO	EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE BIXA ORELLANA				
	Halos de inhibición (mm) – 72 horas				
	Control positivo	Control Negativo	50%	75%	100%
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	10.05	6	6	6.47	8.51
	10.51	6	6	6.11	8.16
	10.67	6	6	6	7.62
	10.38	6	6	6	8.47
	10.06	6	6	6.31	8.33
	12.44	6	6	6	8.86
	12.07	6	6	6.52	8.69
	10.12	6	6	6.48	7.72
	11.29	6	6	6	6.96
	11.18	6	6	6	7.81
	10.03	6	6	6	6.57
	10.67	6	6	6.12	8.93
	11.54	6	6	6.35	7.49
	12.63	6	6	6	7.52
	12.46	6	6	6	7.82

El tamaño de los pocillos es de 6 mm, por lo tanto, cuando se reporta esta medida, indica que no hay formación de halos de inhibición.
 *Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL
 *Control positivo: Perio-AID (Proporcionado por el cliente)
 *Control negativo: Agua destilada.


 Q.F. Paul Iván Gutiérrez Elescano
 Director del Centro de Control Analítico

*Datos proporcionados por el cliente
 Los resultados son válidos solo para la muestra ensayada.



*El presente código QR contiene el único documento válido emitido.

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú Teléfonos: 619-7000 anexo 4824 - 982949135 – Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

9.7. Anexo G

9.7.1. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Metodología
¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 – In vitro?	<p>Objetivo general: Evaluar el efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a las 24, 48 y 72 h– estudio in vitro.</p> <p>Objetivos específicos: -Determinar el efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) al 50%, 75%, 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a las 24 horas- In vitro.</p>	<p>Existe un efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) al 50%, 75% y 100% estadísticamente significativo sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 – estudio In vitro.</p>	<p>Variable independiente: Extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) en diferentes concentraciones (50%, 75% y 100%).</p> <p>Variable dependiente: Efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote).</p>	<p>Diseño de la investigación Experimental Comparativo Longitudinal Prospectivo</p> <p>Población Cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>

	<p>-Determinar el efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) al 50%, 75%, 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a las 48 horas- In vitro.</p> <p>-Determinar el efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) al 50%, 75%, 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a las 72 horas- In vitro.</p> <p>-Comparar el efecto antibacteriano del extracto de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) al 50%, 75%, 100% y la Clorhexidina al 0,12% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a las 24, 48 y 72 horas- In vitro.</p>		<p>Control:</p> <p>Clorhexidina 0,12%. Agua Destilada.</p>	<p>Muestra</p> <p>15 placas Petri por cada grupo de evaluación.</p> <p>Técnica</p> <p>Observación.</p> <p>Instrumentos</p> <p>Ficha de recolección de datos.</p>
--	---	--	---	---