UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE QUIMICA Y FARMACIA

TRABAJO DE TITULACION PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO PARA OPTAR POR EL GRADO DE QUÍMICOS Y FARMACÉUTICOS

TEMA:

‘‘ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quínoa* Y *Justicia secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli*’’.

AUTORES:

PAREDES VILLACIS WILSON CAMILO

ZAMORA VELIZ JORGE STEEVEN

TUTORA:

Q.F. CELESTE CARRILLO TOMALA MSc.

COTUTORA:

Q.F. MARIA DEL CARMEN VILLACRES Ph.D.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2019 - 2020

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN			
TÍTULO Y SUBTÍTULO:	"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quínoa* Y *Justica secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli*"		
AUTOR(ES)	PAREDES WILLACIS WILSON CAMILO ZAMORA VELIZ JORGE STEEVEN		
TUTOR(ES) **REVISOR(ES)**	Mg. CELESTE JACQUELINE CARRILLO TOMALA Mg. MARIA AUXILIADORA ALARCON PERASSO		
INSTITUCIÓN:	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL		
UNIDAD/FACULTAD:	FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS		
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:	QUIMICA Y FARMACIA		
GRADO OBTENIDO:	QUÍMICOS Y FARMACÉUTICOS		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	JUNIO/2020	**No. DE PÁGINAS:**	75
ÁREAS TEMÁTICAS:	INVESTIGACIÓN		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	**Palabras Claves:** Actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria, inhibición, *Chenopodium quínoa* Willd, *Justicia secunda* Vahl. **Key words:** antibacterial activity, inhibitory minimum concentration, inhibition, *Chenopodium quínoa* Willd, *Justice second* Vahl.		

RESUMEN/ABSTRACT:

Los saberes ancestrales de las plantas medicinales han sido utilizados para curar y aliviar distintas dolencias, entre esas plantas tenemos a *Chenopodium quínoa* Willd y *justicia secunda* Vahl, este estudio pretende evaluar la actividad antibacteriana de *Chenopodium quínoa* y *justicia secunda* Vahl frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de concentración mínima inhibitoria presentando inhibición en el segundo pocillo en los 3 extractos alcohólicos a una concentración de (75%: 8,41 mg/ml) quínoa con cáscara, (75%: 11,63 mg/ml) quínoa sin cáscara, (75%: 6,24 mg/ml) hoja de insulina, en comparación las pruebas realizadas con alcohol al 70% a una misma dilución que los extractos, presentaron inhibición en el cuarto pocillo a una concentración del 25 %. Los extractos acuosos y alcohólicos de *Chenopodium quínoa* Willd y *justicia secunda* Vahl presentaron altas concentraciones de fenoles totales.

ADJUNTO PDF:	**SI** X	**NO** ☐
CONTACTO CON AUTOR/ES:	**Teléfono:** 0985307385 0993901639	**E-mail:** wilson.paredesv@ug.edu.ec jorge.zamorav@ug.edu.ec
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	**Nombre:** Secretaria de la facultad	
	Teléfono: (04) 2293680	
	E-mail: fcquimic@ug.edu.ec	

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Guayaquil, 10 de marzo del-2020

MARIANITA DE JESÚS RENDÓN MARISCAL, M.Sc,
VICEDECANA
FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad,-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quinoa* Y *Justica secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli*"** de los estudiantes **PAREDES VILLACIS WILSON CAMILO y ZAMORA VELIZ JORGE STEEVEN**, indicando que han cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral,
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO** para los fines pertinentes, que las estudiantes están aptas para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,

MSc. Celeste Carrillo Tomalá
C.I. 0907801559

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Guayaquil, 10 de Junio del 2020

Dra. Q.F. Zoila Luna Estrella, Mgs.
VICEDECANA
FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. -

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quínoa* Y *Justica secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli*"** de los estudiantes **Paredes Villacís Wilson Camilo y Zamora Veliz Jorge Steeven**. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de 20 palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo del 2001.
- La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que los estudiantes **Paredes Villacís Wilson Camilo y Zamora Veliz Jorge Steeven** están aptos para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,

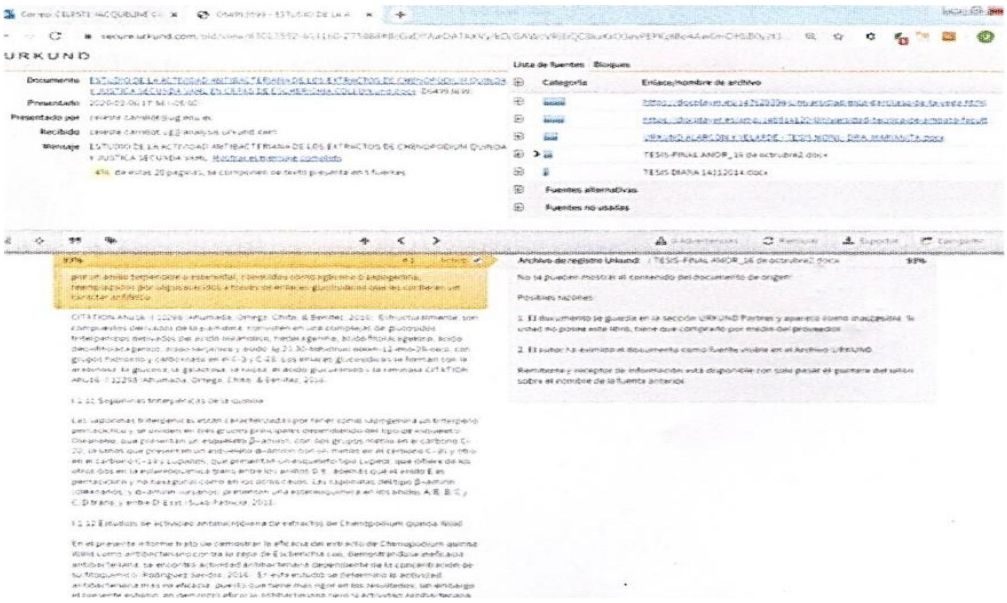
Mg. MARIA AUXILIADORA ALARCON PERASSO
C.I. No.: 0905256871

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

CERTIFICADO DEL PORCENTAJE DE SIMILUTUD

Habiendo sido nombrado **Celeste Jacqueline Carrillo Tomalá**, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por **PAREDES VILLACIS WILSON CAMILO Y ZAMORA VELIZ JORGE STEEVEN**, con mi respectiva supervisión corno requerimiento parcial para la obtención del título de Químico y Farmacéutico.

Se informa que el trabajo de titulación: **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quínoa* Y *Justica secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli***, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio URKIJND, quedando el 4% de coincidencia.



https://secure.urkund.com/view/_63013592-613160-275088

MSC. Celeste Carrillo Tomalá
C.I. 0907801559
FECHA: 10 de Marzo de 2020

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Unidad de Titulación
Facultad de Ciencias Químicas

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document:	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE CHENOPODIUM QUINOA Y JUSTICA SECUNDA VAHL EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI Urkund.docx (D64993699)
Submitted:	3/6/2020 11:56:00 PM
Submitted By:	celeste.carrillot@ug.edu.ec
Significance:	4 %

Sources included in the report:

TESIS DIANA 14112014.docx (D12423311)
URKUND ALARCÓN Y VELARDE - TESIS NONI - DRA. MARIANITA.docx (D54834655)
TESIS-FINAL AMOR_16 de octrubre2.docx (D57385075)
https://docplayer.es/amp/148814120-Universidad-tecnica-de-ambato-facultad-de-ciencias-agropecuarias.html
https://docplayer.es/147629394-Universidad-inca-garcilaso-de-la-vega.html

Instances where selected sources appear:

9

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Unidad de Titulación
Facultad de Ciencias Químicas

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Guayaquil, 10 de marzo de 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutora del trabajo de titulación, certifico que, he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es: **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quinoa* y *Justica secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli*"** presentado por **PAREDES VILLACIS WILSON CAMILO** C.I. N° **0950804005** y **ZAMORA VELIZ JORGE STEEVEN** C.I. N**° 0950551358** previo a la obtención del título de Químicos y Farmacéuticos.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Antiplagio del programa URKUND, quedando el 4 % de coincidencia. Lo certifico:

MSc. Celeste Carrillo Tomalá
C.I.0907801559

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Guayaquil, 12 de Junio de 2020

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR

Habiendo sido nombrado la **Mg. MARIA AUXILIADORA ALARCON PERASSO** tutor revisor del trabajo de titulación **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quínoa* Y *Justicia secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli*"**, certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **PAREDES VILLACIS WILSON CAMILO** C.I. N° **0950804005** y **ZAMORA VELIZ JORGE STEEVEN** C.I. N° **0950551358**, con mi respetiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Químicos y Farmacéuticos, en la Carrera de Química y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas partes, encontrándose apto para su sustentación.

Mg. MARIA AUXILIADORA ALARCON PERASSO
C.I. 0905256871

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Certificado del tribunal

Acta de la sustentación oral

El tribunal de sustentación de **Wilson Camilo Paredes Villacís** con cedula N° **0950804005** y de **Jorge Steeven Zamora Veliz** con cedula N° **0950551358**, después de ser examinados en su presentación, memoria científica y defensa oral, da por aprobado el Trabajo de Titulación,

Mg. María Auxiliadora Alarcón Perasso

Presidenta Miembro 1 del tribunal

PhD. Adonis Bello Alarcón
Docentes Miembro 2 del Tribunal

Mg. Gina Cecil Johnson Hidalgo
Docente Miembro 3 del Tribunal

Ab. Francisco Palomeque Romero, Mgs
Secretario General

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y DE AUTORIZACIÓN DE LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS

Yo, **WILSON CAMILO PAREDES VILLACIS**, Cl. N° **0950804005**, y de **JORGE STEEVEN ZAMORA VELIZ**, Cl. N° **0950551358**, certificamos que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium quínoa* Y *Justica secunda* Vahl EN CEPAS DE *Escherichia coli*"** es de nuestra absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizamos el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

WILSON CAMILO PAREDES VILLACIS
Cl. No: 0950804005

JORGE STEEVEN ZAMORA VELIZ
C.I. No.: 0950551358

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artí culos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.

DEDICATORIA

Wilson Camilo Paredes Villacis

El presente trabajo lo dedico a Dios por ayudarme en todo mi proceso estudiantil a mi madre la Ing.Quim Velma Villacis que con su infinito amor y dedicación fueron de ayuda para culminar esta hermosa carrera a mi abuelita Hercilia Elena Villacis , que con mucho amor me guio y apoyo con todas sus fuerzas gracias a Dios y a ellas soy el que soy .

A mi cotutora la Q.F Maria Del Carmen Villacres PHD y a mi tutora la Q.F Celeste Carrillo Tomalá MSc por guiarme por el camino del bien, ayudándome con sus conocimientos y dedicación para culminar con éxito una etapa muy importante en mi vida.

A toda la familia Arteaga, a mi gran amiga la señora Sixta Piguave y a todas las personas que me han apoyado a que este trabajo se realice con éxito.

Jorge Steven Zamora Veliz

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados de nuestras vidas tanto personal como profesional.

A mis padres, por su gran amor, sacrificio y trabajo de darnos una buena educación en todos estos años desde la escuela hasta ahora; gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser sus hijos, son los mejores padres que hemos tenido.

A mi hermano (a) y familia por estar siempre presentes y pendientes de nosotros y acompañándonos y darnos el apoyo moral, que nos brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTO

Wilson Camilo Paredes Villacis

Agradezco a Dios por guiar mi camino y darme las fuerzas necesarias para permitirme culminar con éxito esta etapa de mi vida, mi eterno agradecimiento a mi madre la Ing. Q.Velma villacis, que con tanto esfuerzo ha luchado junto a mí para llegar a culminar mi carrera ya que sin ella no podría llegar a esta meta, y a mi otra madre Hercilia Villacis que con tanto amor me crio y que ahora desde el cielo celebra este triunfo junto a mi

Jorge Steven Zamora Veliz

Agradezco a Dios, porque ha sabido guiarme por el camino del bien, dándome sabiduría, esperanza e inteligencia para culminar con éxito una etapa muy importante en mi vida; a mi familia porque siempre estuvieron apoyándome sin condiciones, sin su apoyo no podría llegar a esta meta.

A nuestra tutora Q.F. Celeste Carrillo Tomalá MSc y a nuestra cotutora Q.F María del Carmen Villacrés PhD por su colaboración fue de gran ayuda durante este periodo, le agradecemos eternamente por ser atentas con nosotros y por sus rápidas respuestas a nuestras inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo, lo cual se ha visto también reflejado en resultados obtenidos.

Queremos extender un sincero agradecimiento a los encargados del Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica -INSPI- Dr. Leopoldo Izquieta Pérez Centro de Referencia de Bacteriología, en especial a la Dra. Yolanda Narváez San Martin por ayudarnos en realizar la parte técnico/experimental de la investigación y a la Q.F Jennyfer Romero Ramírez, analista técnica del Laboratorio por dirigirnos en el desarrollo experimental de la investigación.

Agradecemos también la ayuda práctica brindada a la Q.F María Elena Jiménez por realizar una parte experimental de la investigación en el Laboratorio de Análisis de Medicamentos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA……XI

AGRADECIMIENTO XII

INDICE DE CONTENIDOS……..XIII

ÍNDICE DE TABLAS……XVII

INDICE DE FIGURAS……XVIII

INDICE DE ANEXOS……XIX

RESUMEN……...XX

ABSTRACT……XXI

LISTA DE ABREVIATURAS.....XXII

CAPÍTULO I 2

PROBLEMA 2

I.1 Planteamiento del problema 2

I.1.1 Problema 3

I.2 Justificación 3

I.3 Hipótesis 4

I.4 Objetivo General: 4

I.4.1 Objetivos Específicos: 4

CAPÍTULO II 5

MARCO TEÓRICO 5

II.1 Quínoa 5

II.1.1 Generalidades 5

II.1.2 Taxonomía de *Chenopodium quínoa* Willd 5

II.1.3 Descripción botánica de la planta 6

II.1.4 Diversidades de quínoa..... 7

II.1.5 Principales usos farmacológicos de quínoa 8

II.1.6 Nutrientes esenciales 8

II.1.7 Compuestos fotoquímicos de la quínoa 9

II.1.8 Proteínas presentes en la quínoa 9

II.1.9 Contenido de carbohidratos presentes en la quínoa 9

II.1.10 Saponinas de la quínoa..... 10

II.1.11 Saponinas triterpénicas de la quínoa 10

II.1.12 Estudios de actividad antimicrobiana de extractos de *Chenopodium quínoa* Willd ……11

II.2 Justicia secunda Vahl..... 12

II.2.1 Generalidades 12

II.2.2 Características morfológicas de la *Justicia secunda* Vahl..... 12

II.2.3 Distribución, habitad y nombres vernáculos de la *Justicia* 13

II.2.4 Propiedades medicinales atribuidas de la *Justicia* 14

II.2.5 Moléculas identificadas de la *Justicia*..... 14

II.3 Escherichia coli..... 15

II.3.1 Generalidades 15

II.3.2 Características 16

II.3.3 Mecanismo de adherencia 16

II.3.4 Enfermedades asociadas con *Escherichia coli* 17

II.3.5 Resistencia mediada por *Escherichia coli* BLEE..... 17

II.3.6 Epidemiología de *Escherichia coli* BLEE..... 18

II.3.7 Factores de riesgo de bacteriemia por *Escherichia coli* BLEE 18

II.3.8 Opciones terapéuticas en las bacteriemias por *Escherichia coli* BLEE……...19
II.3.9 Actividad antibacteriana 19
II.3.10 Antibiograma 19
II.3.11 Discos para antibiograma..... 20
II.3.12 Método por difusión en agar..... 20
II.3.13 CMI (Concentración Inhibitoria Mínima) 21
II.3.14 Compuestos fenólicos en las plantas 21
II.3.15 Actividad biológica de los compuestos fenólicos..... 22
II.3.16 Cuantificación de compuestos fenólicos 23
CAPÍTULO III 24
MATERIALES Y MÉTODOS 24
III.1 Diseño de la investigación 24
III.2 Tipo de investigación:..... 24
III.3 Especies vegetales:..... 24
III.4 Lugar de la investigación 24
III.5 Muestras (Microorganismos) 24
III.6 Materiales, Reactivos y Equipos..... 25
III.6.1 Materiales..... 25
III.6.2 Reactivos 25
III.6.3 Equipos 26
III.7 Preparación del material vegetal 26
III.8 Obtención de los extractos: 26
III.9 Determinación de solidos totales (ST) 27
III.10 Determinación de fenoles totales (FT)..... 28
III.11 Análisis microbiológico 29

III.11.1 Recuperación de microorganismos 29
III.11.2 Procedimiento 29
III.11.3 Método de difusión (Kirby Bauer). 29
III.11.4 Método de dilución del (MIC) 30
CAPÍTULO IV 31
RESULTADOS Y DISCUSIONES 31
IV.1 Determinación de sólidos totales 31
IV.2 Prueba de sensibilidad antibacteriana 32
IV.3 Prueba de sensibilidad bacteriana 34
IV.4 Determinación de fenoles totales 37
CAPITULO V 40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 40
V.1 Conclusiones 40
V.2 Recomendaciones 41
BIBLIOGRAFÍA 42
GLOSARIO 50
ANEXOS 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I Taxonomía de *Chenopodium quínoa* Willd..... 5
Tabla II Taxonomía de *Justicia secunda* Vahl..... 13
Tabla III Clasificación taxonómica *Escherichia coli* 16
Tabla IV Curva de calibración de ácido gálico utilizando como patrón..... 28
Tabla 5 Promedios de sólidos totales..... 31
Tabla 6 Prueba de actividad antibacteriana en *Escherichia coli* y *Escherichia coli BLEE* 32
Tabla VII Prueba de Dilución (Concentración Mínima Inhibitoria-CMI) Escherichia coli ATCC 25922 y Escherichia coli BLEE ATCC 35218..... 34
Tabla 8 Promedio de fenoles totales en extractos alcoholicos..... 37
Tabla 9 Promedio de fenoles totales en extractos acuosos 38
Tabla 10 Determinación de solidos totales..... 52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Método de Kirby-Bauer en *Escherichia coli* en extractos alcohólicos y acuosos en las tres especies vegetales 33

Figura 2 Método de Kirby-Bauer en *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en las tres especies vegetales..... 33

Figura 3 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en quínoa comercial. 35

Figura 4 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en quínoa con cáscara..... 35

Figura 5 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos *en Justicia secunda* Valh 36

Figura 6 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en estanol 37

Figura 7 Estufa control de solidos totales..... 51

Figura 8 Solidos totales en muestras por triplicado..... 51

Figura 9 Protocolo de Determinación de Solidos totales. 53

Figura 10 Preparación de materiales para los análisis microbiológicos 54

Figura 11 Prueba de Difusión (Kirby Bauer en agar)..... 54

Figura 12 Prueba de Dilución (Concentración Mínima Inhibitoria-CMI)..... 55

Figura 13 Protocolo de Análisis microbiológico 56

Figura 14 Preparación de la curva patrón del Ácido Gálico 57

Figura 15 Fenoles totales en muestras por triplicado..... 57

Figura 16 Protocolo de Determinación de Fenoles totales..... 58

Figura 17 Protocolo de Obtención de los extractos..... 59

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A Determinación de sólidos totales 51
Anexo B Dilución de los extractos para el MIC y antibiograma 54
Anexo C Fenoles totales 57
Anexo D Obtención de los extractos 59

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA

UNIDAD DE TITULACIÓN

‘‘ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *CHENOPODIUM QUÍNOA* WILLD Y *JUSTICIA SECUNDA* VAHL EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*’’.

Autores: Paredes Villacis Wilson Camilo

Zamora Veliz Jorge Steeven

Tutor: Q.F. Celeste Jacqueline Carrillo Tomala Msc.

RESUMEN

Los saberes ancestrales de las plantas medicinales han sido utilizados para curar y aliviar distintas dolencias, entre esas plantas tenemos a *Chenopodium quínoa* Willd y *justicia secunda* Vahl, este estudio pretende evaluar la actividad antibacteriana de *Chenopodium quínoa* y *justicia secunda* Vahl frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de concentración mínima inhibitoria presentando inhibición en el segundo pocillo en los 3 extractos alcohólicos a una concentración de (75%: 8,41 mg/ml) quínoa con cáscara, (75%: 11,63 mg/ml) quínoa sin cáscara, (75%: 6,24 mg/ml) hoja de insulina, en comparación las pruebas realizadas con alcohol al 70% a una misma dilución que los extractos, presentaron inhibición en el cuarto pocillo a una concentración del 25 %. Los extractos acuosos y alcohólicos de *Chenopodium quínoa* Willd y *justicia secunda* Vahl presentaron altas concentraciones de fenoles totales.

Palabras Claves: Actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria, inhibición, *Chenopodium quínoa* Willd, *Justicia secunda* Vahl.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA

UNIDAD DE TITULACIÓN

"STUDY OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF *CHENOPODIUM QUÍNOA* WILLD AND *JUSTICE SECOND* VAHL IN STRAINS OF ESCHERICHIA COLI''

Autores: Paredes Villacis Wilson Camilo

Zamora Veliz Jorge Steeven

Tutor: Q.F. Celeste Jacqueline Carrillo Tomala Msc.

ABSTRACT

The ancestral knowledge of medicinal plants has been used to cure and alleviate various ailments, among those plants; we have *Chenopodium quínoa* Willd and *Justice second* Vahl, this study aims to evaluate the antibacterial activity of *Chenopodium quínoa* and *Justice* second Vahl against strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218. The antibacterial activity was performed using the inhibitory minimum concentration method presenting inhibition in the second well in the 3 alcoholic extracts at a concentration of (75%: 8.41 mg / ml) quínoa in shell, (75%: 11.63 mg / ml) quínoa without skin, (75%: 6.24 mg / ml) insulin leaf, compared with tests carried out with 70% alcohol at the same dilution as the extracts, showed inhibition in the fourth well at a concentration of 25%. Alcoholic extracts of *Chenopodium quínoa* Willd and *Justice second* Vahl had high concentrations of total phenols.

Key words: antibacterial activity, inhibitory minimum concentration, inhibition, *Chenopodium quínoa* Willd, *Justice second* Vahl.

LISTA DE ABREVIATURAS

DE: Desviación estándar

INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

TIR: Translocador de intimina

ST: Solidos totales

FT: Fenoles totales

OMS: Organización Mundial de la Salud

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

DRA: Dirreccion Regional de Agricultura

INTRODUCCIÓN

La medicina natural y tradicional forma parte de la historia de la humanidad, los saberes ancestrales de las plantas medicinales se han transmitido de generación en generación para curar y aliviar dolencias , estas presentan estructuras químicas tales como saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, terpenos, esteroides, lignanos, tales compuestos presentan actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, anticancerígena, hipoglucemiante (Zurita, 2016).

Entre ellas encontramos las propiedades antimicrobianas de *Chenopodium quínoa* Willd (Quínoa) y *Justicia secunda* Vahl (Hoja de Insulina) en todo el mundo se han realizado múltiples investigaciones, muchos de ellos se utilizan como alternativas terapéuticas debido a sus propiedades antibióticas (Rahman, 2009).

La quínoa es una planta andina cultivada desde hace más de 7.000 años y domesticada en los alrededores del lago Titicaca entre Perú y Bolivia, donde hay una gran cantidad de repartición (Arenas & Heredia, 2017).

Los pueblos andinos consideran a la quínoa un grano sagrado debido a sus características medicinales, nutricionales y propiedades curativas. Entre sus usos más frecuentes es el tratamiento de abscesos, hemorragias, luxaciones, contusiones, diurético, para el tratamiento de infecciones del sistema digestivo, se usa en la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas (Chicaiza, 2014).

La hoja de la insulina (*Justicia secunda* Vahl) ha sido usada por las poblaciones latinoamericanas en afecciones como anemia, dolores de riñones, oídos, garganta, como hipoglucemiante, energizante e hipolipemiante. (Zambrano, 2017).

CAPÍTULO I

PROBLEMA

I.1 Planteamiento del problema

La resistencia bacteriana es un problema antiguo pero de gran actualidad, ya que en un marco de “austeridad” en cuanto al número de nuevas moléculas de antibiótico disponibles en el mercado, la presencia de microorganismos multirresistentes es cada vez más frecuente. *E. coli* es el microorganismo más común implicado en bacteriemias nosocomiales y comunitarias. Las infecciones por *E. coli* BLEE han experimentado importantes cambios epidemiológicos en los últimos tiempos y actualmente la atención se centra en el aumento de infecciones y colonizaciones en pacientes procedentes de la comunidad (Garcia, 2011).

La tendencia a la aparición de cepas resistentes frente a varios grupos de antimicrobianos se ha visto impulsada por el uso inapropiado de antimicrobianos, la automedicación y el incumplimiento terapéutico. Las consecuencias negativas del incremento de la resistencia bacteriana se ven expresadas en términos de morbilidad, mortalidad y gastos sanitarios derivados de la atención médica que podrían amenazar la sostenibilidad de los sistemas de salud (Miranda, Pinto, Faustino, Sánchez-Jacinto & Ramirez, 2019).

La especie *Escherichia coli* es una enterobacteria que está presente en forma normal en el tracto digestivo de los humanos, pero existen cepas patógenas con altas probabilidades de mortalidad y morbilidad, existen serotipos que presentan síntomas como hemorragias, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, purpura trombocitopenica (Bryan, Youngster & McAdam, 2015).

I.1.1 Problema

¿Tendrán actividad antibacteriana los extractos alcohólicos y acuosos de *Chenopodium quínoa y Justicia secunda* Valh contra *Escherichia coli?*

I.2 Justificación

La resistencia antibacteriana es consecuencia del abuso de antibióticos a gran escala. Sin embargo, la resistencia a antimicrobianos reduce las posibilidades de un tratamiento óptimo cuando ocurren mutaciones de las cepas patógenas en respuesta al uso frecuente de estos fármacos. Este fenómeno está presente en países en vías de desarrollo y desarrollados debido al carente incentivo económico para el desarrollo de nuevos medicamentos (Alós, 2015).

La tasa de mortalidad y morbilidad causada por microorganismos patógenos va en aumento debido a la creciente prevalencia de cepas multirresistentes. Esto añade urgencia a la búsqueda de nuevas estrategias de lucha contra diferentes infecciones (Rahman, 2009).

La bacteria *Escherichia coli* además de ser un miembro importante de la microflora intestinal normal de los humanos, se caracteriza por presentar diferentes patotipos como *E. coli enterotoxigénicas* (ETEC), *E. coli enteropatógenicas* (EPEC), *E. coli enteroagregativas* (EAggEC), *E. coli enterohemorrágicas* (EHEC) y *E. coli enteroinvasivas* (EIEC) las cuales son causantes de infecciones agresivas (Bryan et al., 2015).

Las propiedades antimicrobianas de *Chenopodium quínoa* (Quinua) y *Justicia secunda* Vahl (Hoja de Insulina) se han investigado en varios estudios en todo el mundo y muchos de ellos se han sido utilizados como alternativas terapéuticas debido a sus propiedades antibióticas (Rahman, 2009).

Este estudio permitirá evaluar la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos y acuosos de la *Chenopodium quínoa* y *Justicia secunda* Vahl frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218

I.3 Hipótesis

Con base a la revisión de literatura se plantea la siguiente hipótesis de investigación:

Los extractos acuosos y alcohólicos de *Chenopodium quínoa* y *Justicia secunda* Vahl no presentan actividad antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218.

I.4 Objetivo General:

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos y acuosos de *Chenopodium quínoa* y *Justicia secunda* Vahl en cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218

I.4.1 Objetivos Específicos:

1. Evaluar la concentración de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu.
2. Comparar la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos y acuosos de *Chenopodium quínoa* en cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218
3. Comparar la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos y acuosos de *Justicia secunda* Vahl en cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

II.1 Quínoa

II.1.1 Generalidades

La quínoa es cultivada desde hace más de 7.000 años es una planta andina y domesticada en los alrededores del lago Titicaca entre Perú y Bolivia, donde existe una gran variedad de genotipos y progenitores silvestres. Presenta una planta de gran cantidad nutricional que fue cultivada y utilizada como alimento en tiempos ancestrales por su población como sustitución del déficit de proteínas en animales y reemplazada por los cereales luego de la llegada de los españoles (Arenas & Heredia, 2017).

La quínoa se cultiva en distintas regiones Andinas como Perú, Ecuador, Bolivia, Argentina, Colombia y Chile. En Ecuador la quínoa se cultiva en las áreas de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Loja, Latacunga, Ambato y Cuenca (Bojanic, 2011).

II.1.2 Taxonomía de *Chenopodium quínoa* Willd

Tabla I Taxonomía de *Chenopodium quínoa* Willd

REINO	**PLANTAE**
Nombre del Producto	Quínoa
Reino	Vegetal
División	Fanerógamas
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Angiospermas
Familia	Chenopodiaceas
Género	*Chenopodium*
Sección	Chenopodia
Subsección	Cellulata
Especie	*Chenopodium quínoa* Willd

II.1.3 Descripción botánica de la planta

La quínoa es una planta herbácea, de un porte erecto, de 100 a 142 cm de altura, su inflorescencia forma una panoja de diversos colores (Púrpura, morado, verde, amarillo, rojo y blanco) y también se pueden tener mezclas de colores en una misma panoja (Suxo, 2018).

Raíz: La raíz es pivotante, vigorosa, profunda, bastante ramificada y fibrosa, esto le da características de supervivencia a las condiciones desfavorables del medio, en este caso del altiplano que son sequias (Suxo, 2018).

Tallo: Es cilíndrico en la base tornándose anguloso a partir de la zona donde salen las hojas y ramas, en forma alternada. La textura de la médula del tallo en las plantas jóvenes es blanda, y cuando se acerca a la madurez es esponjosa y hueca, de color crema y sin fibras, el color del tallo puede ser verde, amarillo, rojo, púrpura, naranja o verde con estrías verticales de otra coloración (DRA, 2016).

Hojas: Poseen pecíolo y lámina. Los pecíolos son acanalados en su lado superior, largos, delgados o muy variables. Las hojas de la parte inferior de la planta son de forma romboidal o triangular. Las más grandes llegan a medir hasta 10–15 cm de largo por 8–10 cm de ancho. Son de color verde cuando son tiernas, similares a espinacas y normalmente están cubiertas de papilas ambos lados de la hoja (DRA, 2016).

Flores: Son pequeñas, pueden alcanzar hasta 3 mm, y pueden presentar hasta tres tipos de flores; hermafroditas (pistilo y estambres), pistiladas (femeninas) y androesteriles (pistilo y estambres estériles) (Mujica, Izquierdo, & Marathee, 2016).

Fruto: Es un aquenio, formado por el perigonio en forma de estrella que contiene la semilla, el fruto cuando está maduro su color puede ser gris, amarillo, rojizo, café o negro. Los frutos de la quinua cultivada tienen un borde afilado, mientras que las quinuas silvestres lo tienen redondeado (Mujica, Izquierdo, & Marathee, 2016).

Las principales partes del fruto son: La cubierta externa, el episperma y el embrión; cuando la quinua es cosechada el fruto cae de la planta encerrado en el perianto. Las células débiles adheridas al perianto son fácilmente removidas por lavado y restregado en agua hasta exponer la superficie suave de color amarillo pálido del pericarpio (Sanchez & Chapoñan, 2015).

El pericarpio es la capa externa de fruto que representa alveolos. Sus colores son variados y pueden ser translúcidos, blancos, cremas, amarillos, anaranjados, rozados, rojos, púrpuras, marrones, grises y negros entre otros. Entre algunos genotipos el pericarpio se desprende muy fácilmente durante el proceso de eliminación de saponina, en esta capa se encuentra la saponina (Sanchez & Chapoñan, 2015).

II.1.4 Diversidades de quínoa

Entre los cultivos andinos, principalmente en Ecuador, Perú, Chile y Bolivia se ha agrupado a las quínoas en los siguientes cincos tipos de grupos:

1. **Quínoas de nivel del mar:** Se han encontrado en las zonas de Concepción y Valdivia (Chile) en latitudes de los 30° al sur, estas quínoas se adaptan más a las condiciones húmedas y con temperaturas regulares. Son plantas robustas de 1,0 a 1,4 m de altura, con granos de color crema transparente y tienen una gran semejanza con la *Chenopodium nuttalliae* (FAO, 2019).
2. **Quínoas de valles interandinos:** Se adaptan entre los 3000 a 3500 metros sobre el nivel del mar, su crecimiento puede llegar hasta los tres metros de altura, con muchas ramificaciones y tienen hojas de color verde claro y grano muy blanco (Apaza, Caceres, Estrada, & Pinedo, 2013).
3. **Quínoas del altiplano:** Se desarrollan en zonas de mayor altitud entre 4000 y 6000 metros sobre el nivel del mar, en condiciones climáticas variables. Las plantas crecen con alturas hasta 2 m con un tallo que termina en una panoja colorada (Alavi, Diels, Willems, & Garcia, 2015).
4. **Quínoas de salares:** Son las que crecen en la zona sur del altiplano boliviano, es la zona más seca con 300 mm de precipitación. Se las conoce como ¨Quinua Real¨, tiene el mayor tamaño de grano y se

caracterizan por sus granos por tener un pericarpio grueso y con alto contenido de saponina (FAO, 2019).

5. **Quínoas de los yungas:** Es un grupo muy disminuido de quínoas que se han adaptado a las condiciones de la zona de Yunga de Bolivia, a alturas entre los 1.500 y 2000 metros sobre el nivel del mar con la particularidad de tener el tallo de color naranja al estado maduro, al igual que el perigonio y alcanzan alturas hasta los 2,20 m (Bojanic, 2011).

II.1.5 Principales usos farmacológicos de quínoa

Los pueblos andinos consideran a la quínoa un grano sagrado debido a sus características medicinales, nutricionales y propiedades curativas. Entre sus usos más frecuentes es el tratamiento de abscesos, hemorragias, luxaciones, contusiones, diurético, para el tratamiento de infecciones del sistema digestivo, se usa en la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas, y permite mantener en equilibrio los niveles de azúcar en sangre. Posee grandes cantidades de magnesio, lo permite relajar los vasos sanguíneos y es usada para tratar la ansiedad, diabetes, osteoporosis y migraña, entre otras enfermedades (Hernandez, 2015).

II.1.6 Nutrientes esenciales

La quínoa es un grano con un gran contenido de lisina y altas cantidades de leucina; además contiene aminoácidos, tales como metionina, treonina, triptófano, acido aspártico, acido glutámico, cisteína, serina y tirosina. Todos estos aminoácidos mencionados tienen como función colaborar en la reparación celular, mejorar la función inmunitaria al colaborar en la formación en la formación de anticuerpos, favorecen en la función gástrica, participa en el metabolismo de los ácidos grasos, ayuda al transporte y absorción del calcio; además con la vitamina C impide la metástasis cancerosa, por mencionar solo algunas de sus numerosas actividades terapéuticas (Bojanic, 2011).

II.1.7 Compuestos fotoquímicos de la quínoa

En la quínoa podemos encontrar diferentes metabolitos secundarios, tales como saponinas, taninos, inhibidores de tripsina, flavonoides, aceites esenciales y fitatos; además contiene vitamina C, vitamina E, isoflavonas y presenta un gran contenido de minerales como hierro, calcio y zinc (Repo de Carrasco & Encina, 2008).

En los últimos años se ha estudiado la actividad terapéutica de las saponinas y la literatura documenta sus propiedades antitumoral, fungicida, hemolítica y antinflamatoria (Ahumada, Ortega, Chito, & Benitez, 2016).

II.1.8 Proteínas presentes en la quínoa

Las proteínas de almacenamiento de quínoa consisten principalmente de globulina y albúmina, con poca o ninguna presencia de prolaminas (Chandra, 2015).

II.1.9 Contenido de carbohidratos presentes en la quínoa

Los hidratos de carbono son las partes principales de la materia seca de semillas de quínoa; que comprende fibras de almidón y dietéticos como componentes principales. El contenido de carbohidratos en semillas de quínoa varían de 67% a 74% de la materia seca; fuera de él almidón representa aproximadamente el 55-65%. En quinua semillas compuesto principalmente de almidón se encuentra en perisperma como unidades simples o como agregados esféricos (Chito, Ortega, Ahumada, & Rosero, 2017).

Cuando se compara por su contenido de amilosa, quínoa almidón contiene 11% de amilosa, la quínoa contiene 2% a 9% de grasa presenta un contenido medio de aceite que es de alrededor de 6% se puede considerar como un cultivo de pseudo-aceite (Chandra, 2015).

II.1.10 Saponinas de la quínoa

En la literatura, se reporta al menos 30 saponinas triterpenicas que están distribuidas en todas las partes de la planta, tales como hojas, flores, frutos, semillas y la cáscara de las semillas. Las saponinas son metabolitos secundarios que constituyen por un anillo terpenoide o esteroidal, conocidos como aglicona o sapogenina, reemplazados por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfifilico (Ahumada et al., 2016).

Estructuralmente, son compuestos derivados de la β-amirina; consisten en un complejo de glucósidos triterpenicos derivados del ácido oleanolico, hederagenina, ácido fitolacagenico, ácido deoxifitolacagenico, ácido serjanico y acido 3β,23,30-trihidroxi olean-12-eno-28-oico, con grupos hidroxilo y carboxilato en el C-3 y C-28. Los enlaces glucosídicos se forman con la arabinosa, la glucosa, la galactosa, la xilosa, el ácido glucurónico y la ramnosa (Ahumada et al., 2016).

II.1.11 Saponinas triterpénicas de la quínoa

Las saponinas triterpénicas están caracterizadas por tener como sapogenina un triterpeno pentacíclico y se dividen en tres grupos principales dependiendo del tipo de esqueleto: Oleanano, que presentan un esqueleto β–amirin, con dos grupos metilo en el carbono C–20; Ursanos que presentan un esqueleto α–amirin con un metilo en el carbono C–20 y otro en el carbono C–19 y Lupanos, que presentan un esqueleto tipo Lupeol, que difiere de los otros dos en la estereoquímica trans entre los anillos D/E, además que el anillo E es pentacíclico y no hexagonal como en los otros casos. Las saponinas del tipo β–amirin (oleananos) y α–amirin (ursanos) presentan una estereoquímica en los anillos A/B, B/C y C/D trans; y entre D/E cis (Guevara, 2012).

II.1.12 Estudios de actividad antimicrobiana de extractos de *Chenopodium quínoa* Willd

En el presente informe se trató de demostrar la eficacia del extracto de *Chenopodium quínoa* Willd como antibacteriano contra la cepa de *Escherichia coli*, demostrándose ineficacia antibacteriana, se encontró actividad antibacteriana dependiente de la concentración de su fitoquímico (Rodríguez, 2016).

En este estudio se determinó la actividad antibacteriana mas no eficacia, puesto que tiene más rigor en los resultados; sin embargo no se logró demostrar la eficacia antibacteriana pero si actividad antibacteriana (Rodríguez, 2016)

Se demostró actividad antibacteriana a través de la presencia de sus metabolitos; pero ello no es suficiente para extrapolar in vivo. En otro alcancé se demostró actividad antibacteriana de diferentes extractos diluidos (etanólicos y aceitósos) se comportaron mejor con el método de dilución en pocillo que con el método de difusión en placa; cuya desventaja respecto a esta última fue la poca difusión de los extractos principalmente de los extractos aceitosos y extractos etanólicos aun diluidos por el método de dilución en pocillos tiene mejor actividad antibacteriana (Falconi, 2015).

Se demostró *in vitro* por el método de difusión en disco tanto para bacterias y hongos; que los extractos puros mejor se comportan respecto a extractos en tintura al 20%; cuyos compuestos bioactivos fueron: quinonas, flavonoides y cumarinas. Logrando halos de inhibición para *E. coli* de 8 y 9 mm, esto deduce nuestros resultados respecto a las diluciones sometidas; puesto que mejor se comportó el extracto puro de *Chenopodium quínoa* willd logrando actividad antibacteriana de 11.86 mm, respecto a las diluciones sometidas al extracto de *Chenopodium quínoa* willd, ninguna se comportó con eficacia antibacteriana cuyo solvente fue suero fisiológico, se utilizó como solvente el dimetilsulfoxido al 30% a concentraciones de 50, 30 y 10 µl y todos se comportaron con actividad antibacteriana por el método de dilución en pocillo (Falconi, 2015).

Mientras que los aceites y extracto diluido por la misma concentración sometidos al método de difusión en disco fue negativa su actividad

antibacteriana; este autor aduce que fue debido a la poca capacidad de difusión de los extractos en la placa; sin embargo en la presente investigación se consiguió actividad antibacteriana con al extracto de quínoa incluso sometidos a diferentes diluciones (Rodriguez, 2016).

II.2 Justicia secunda Vahl

II.2.1 Generalidades

La familia Acanthaceae, orden Scrophulariales, superorden Lamiiflorae, comprende casi 250 géneros con 2500 especies. Sus especies están muy extendidas en las regiones tropicales del mundo y están mal representadas en las regiones templadas (Correa & de Alcantara, 2011).

Pertenece al género Justicia el cual comprende alrededor de 420 especies de plantas, pertenecientes a la familia Acanthaceae (Zambrano, 2017).

El género justicia es uno de los más grandes y complejos de la familia acanthaceae, constituye alrededor de 600 y 700 especies en el mundo, 200 crecen en America (Aguilar, 2012).

Las especies más utilizadas en América Latina con fines medicinales son la *Justicia spicigera, Justicia secunda, Justicia pectoralis* mostrando actividad antiviral, citotóxica, broncodilatadora, antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante atribuida principalmente a alcaloides, lignanos y flavonoides (Aguilar, 2012).

II.2.2 Características morfológicas de la *Justicia secunda* Vahl

La especie *Justicia secunda* Vahl es una hierba 0,5- 1m de alto; tallos erectos o ascendentes, subcilíndricos- cuadrangulares y superficialmente sulcados en sentido longitudinal, glabros. Hojas simples, opuestas; láminas lanceoladas, 6-13 x 1,5- 3 cm, foliáceas a subcartáceas, base algo obtusa hasta apenas aguda, ápice acuminado, margen entero, glabras en ambos lados; peciolos 1-3 mm; brácteas florales lineal- filiformes, ca. 2 mm; cáliz de 5 sépalos valvados, mayormente libres, 4-7 mm, divergentes, pilosos; corola subtubular y bilabiada,

púrpura suave, ca. 20 x 3-4 mm; estambres 2, ca. 18 mm; filamento 1, ca. 20 mm. Fruto cápsula.(Garcia & Patiño, 2015)

Tabla II Taxonomía de *Justicia secunda* Vahl

REINO	**PLANTAE**
Genero	*Justicia*
Familia	Acanthaceae
Sub-familia	Acanthoideae
Tribu	Justicieae
Número o código único	414246
Especie	*Secunda*
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Scrophulariales

(National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland., 2010)

II.2.3 Distribución, habitad y nombres vernáculos de la *Justicia*

Proviene de regiones tropicales y templadas, por lo que se encuentran distribuidas en varios países, en los cuales les han dado nombres comunes como: "la hoja de la vida", "singamochilla", "cascajera", "insulina", "sanguinaria", "curatodo", "canilla de pollo" entre otros (Zambrano & Bustamente, 2017).

Existen alrededor de 600 a 700 especies del género *Justicia* es uno de los más grandes y complejos de la familia acanthaceae, 300 especies están presentes en el continente americano y 400 en Asia (Zambrano & Bustamente, 2017).

México tiene alrededor 75 especies, en Colombia 85 especies, Ecuador presenta alrededor de 27 especies, 50 especies en Perú y 28 en Argentina. Estas especies se encuentran en bosques húmedos, pero también existen en

ambientes semiáridos. Grupos étnicos y campesinos le atribuyen importancia etnofarmacéutica a muchas de estas especies (Aguilar, 2012).

II.2.4 Propiedades medicinales atribuidas de la *Justicia*

Se ha utilizado en poblaciones latinoamericanas en enfermedades como anemia, dolores de riñones, oídos, garganta, como hipoglucemiante, energizante e hipolipemiante (Arias, 2003).

En los países en desarrollo y particularmente en Colombia, como los agricultores, las personas de pequeños pueblos aislados y las comunidades nativas usan la medicina popular para el tratamiento de infecciones comunes (Rojas et al., 2006).

Se ingieren como decocciones, tés para tratar infecciones respiratorias. Estas plantas se usan en la medicina popular colombiana para tratar infecciones de origen microbiano (Rojas et al., 2006).

Pruebas en extractos metanolicos de las partes áreas de *Justicia Secunda* Vahl, presentaron actividad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli y Candida albicans* en la prueba de concentración mínima inhibitoria a una concentración de 0,6 g/ml (Arias, 2003).

II.2.5 Moléculas identificadas de la *Justicia*

Se encuentran diversas clases químicas, principalmente alcaloides, lignanos, flavonoides y terpenoides (iridodos, diterpenoides y triterpenoides) (Correa & de Alcantara, 2011).

Otras clases químicas de especies de *Justicia* se han aislado, como aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos (ácido docosanoico) y ácido salicílico. Los esteroides campesterol, estigmasterol, sitosterol y sitosterol-D-glucósido se aislaron de las hojas y raíces de J.flava, J. spicigera y J. gendarussa (Martinez, 2014).

Los esteroides campesterol, estigmasterol, sitosterol y sitosterol-D-glucósido se aislaron de las hojas y raíces de *J.flava*, *J. spicigera* y *J. gendarussa.* La

literatura describe el efecto de alelopatía de los esteroles y triterpenos. Ambas clases químicas aisladas del extracto alcohólico de las partes aéreas de J. anselliana (Correa & de Alcantara, 2011).

Los lignanos son los principales componentes de los extractos activos de las especies de Justicia, exhibiendo importantes propiedades farmacológicas, tales como antiviral, antitumoral, anti-inflamatorio, y las actividades de agregación anti plaquetarios (Martinez, 2014).

II.2.5.1 Estudios de actividad antimicrobiana de extractos de *Justicia secunda*

Un cribado biológico de la actividad de *Justicia secunda* Vahl. Extractos y fracciones contra varias cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas de Enterobacteriaceae. Ensayo se informa. El extracto de etanol de las partes aéreas de la planta se dividió secuencialmente con n-hexano (FHX) y cloroformo (FCH), quedando una solución de agua (FOH). Todas las fracciones mostraron actividad bactericida contra las bacterias Gram-positivas *Bacillus cereus* (ATCC 9634) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), mientras que estaban inactivas contra las cepas Gram negativas (ATCC 0389), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Proteus vulgaris* (ATCC 9920) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Tres fracciones de FHX y cuatro fracciones de FCH fueron activas contra cepas bacterianas Gram positivas, y fueron inactivas contra las Gram negativas (Herrera, 2002).

II.3 Escherichia coli

II.3.1 Generalidades

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra presente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo algunas de ellas, como *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, producen toxinas conocidas como toxinas Shiga por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae* (OMS, 2016).

E. coli productora de toxina Shiga puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 ºC. Causan graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre por el consumo de alimentos contaminados (OMS, 2016).

II.3.2 Características

Escherichia coli se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utilización de citrato como fuente de carbono y no producción de acetoína. Además fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas.(Milvaques, 2016)

La cubierta de *Escherichia coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas crecen a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 ºC (Milvaques, 2016).

Tabla III Clasificación taxonómica *Escherichia coli*

Dominio :	Bacteria
Filo :	Proteobacteria
Clase :	Gammaproteobacteria
Orden :	Enterobacteriales
Familia :	Enterobacteriaceae
Género :	*Escherichia*
Especie :	*Escherichia coli*

II.3.3 Mecanismo de adherencia

La bacteria se adhiere primeramente a una célula intestinal blanco uniéndose y encajando con su receptor, llamado receptor translocador de intimina (Tir, por sus siglas en inglés), situado en la membrana de la célula epitelial huésped. La

bacteria se une a las células intestinales al unir sus proteínas intiminas a las proteínas Tir insertadas (Farfan, Ariza, & Vargas, 2016).

Se ha observado que el complejo proteico presenta prolongaciones rígidas con estructuras de sujeción situadas en el extremo de la intimina. Los brazos de la proteína están doblados de tal forma que son capaces de aferrar la bacteria a la superficie de la célula intestinal (Rodriguez, Villalobos, & Martinez, 2009).

La estructura cristalográfica demuestra que cada Tir consiste de dos unidades, que forman una estructura llamada dímero. Esa dimerización entrecruza al sistema, como las superficies de un cierre que se pegan una con otra. Cuando se tiene un solo par de puntas entrecruzadas (Rodriguez, Villalobos, & Martinez, 2009).

Al unirse a la célula intestinal, la bacteria utiliza probablemente innumerables uniones entre intimina y Tir, y puesto que E. coli es una bacteria de gran tamaño, cuando se tienen muchos de estos complejos uniendo la bacteria a la superficie se consigue, dada la resistencia de estos elementos es decir una fuerte adherencia (Farfan, Ariza, & Vargas, 2016).

II.3.4 Enfermedades asociadas con *Escherichia coli*

E. coli productora de toxina Shiga presenta síntomas como calambres abdominales y la diarrea, que puede progresar en algunos casos a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica). Un pequeño porcentaje de los casos especialmente niños pequeños y ancianos la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, como el síndrome hemolítico urémico. Caracterizado por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (OMS, 2016).

II.3.5 Resistencia mediada por *Escherichia coli* BLEE

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), también llamadas betalactamasas de espectro ampliado (BLEA), son enzimas producidas por

bacilos gran negativos fundamentalmente enterobacterias, con más frecuencia por *E. coli y Klebsiella pneumoniae* (Garcia, 2011).

Son capaces de inactivar a las penicilinas, a las cefalosporinas (incluidas tercera y cuarta generación excepto cefamicinas), a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam con frecuencia, los plásmidos que codifican esta resistencia portan genes de resistencia a otros antibióticos (Garcia, 2011).

II.3.6 Epidemiología de *Escherichia coli* BLEE

En humanos, el principal reservorio de *E. coli* BLEE es el tracto digestivo, y su transmisión se facilita por el contacto a través de las manos, habiéndose descrito transmisión plasmídica y bacteriana de estas enzimas entre personas en contacto estrecho. También se ha considerado que ciertos alimentos de origen animal, principalmente en relación con las aves de corral, podrían ser fuente de transmisión de enzimas BLEE al hombre (Lopez & Alvaro, 2007).

Su incidencia es creciente, lo que en un principio causó una considerable alarma, con manifestaciones quizá excesivamente catastrofistas por parte de algunos autores en cuanto al futuro de este tipo de resistencia. El incremento en el número de aislamientos fue ocurriendo de forma paulatina, describiéndose principalmente en brotes nosocomiales y grupos seleccionados de pacientes. No obstante las cifras que se manejan en la actualidad no son nada discretas, ascendiendo a más de 170 BLEE de tipo TEM, más de 120 de tipo SHV detectadas sobre todo en *E. coli y Klebsiella spp* (Lopez & Alvaro, 2007).

II.3.7 Factores de riesgo de bacteriemia por *Escherichia coli* BLEE

Los factores de riesgo asociados a la adquisición de infecciones por cepas productoras de BLEE, son múltiples y difieren según los estudios. La enfermedad de base grave se asocia con mayor frecuencia de infección por *E. coli* BLEE en múltiples estudios (Garcia, 2013)

Se podría explicar por el uso empírico de antibióticos de amplio espectro que con frecuencia se emplean más en pacientes gravemente enfermos y que favorecería la selección de cepas resistentes. apunta como factores predictivos para el aislamiento de *E. coli* con BLEE la adquisición nosocomial, el sondaje urinario y la terapia previa con betalactámicos (Garcia, 2013).

II.3.8 Opciones terapéuticas en las bacteriemias por *Escherichia coli* BLEE

Las opciones de tratamiento en las infecciones causadas por microorganismos Gram negativos productores de BLEE son limitadas, ya que presentan resistencia a cefalosporinas (incluidas tercera y cuarta generación excepto cefamicinas), penicilinas de amplio espectro y aztreonam (Morales, 2003).

Hasta el momento solo los carbapenemes han demostrado de forma consistente su eficacia frente a infecciones por cepas de *E. coli y K. pneumonie* productoras de BLEE, con dudas respecto a la utilización de cefamicinas como la cefoxitina y las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas como piperacilina-tazobactam (Morales, 2003).

II.3.9 Actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana se define como un término colectivo en el que un agente activo tiene un efecto negativo sobre la vitalidad de los microorganismos. Todos los principios activos que inhiben el crecimiento de bacterias, evitan la formación de colonias microbianas y pueden destruir microorganismos esto se conoce como actividad antibacteriana (Mogahzy, 2009).

II.3.10 Antibiograma

El antibiograma es un ensayo realizado para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. En los

laboratorios microbiológicos se utilizan las técnicas de antibiograma para analizar la actividad de los antimicrobianos frente a los microrganismos causantes de infecciones (Águila, 2016).

II.3.11 Discos para antibiograma

La concentración de los discos de antibiograma tiene una similitud con la concentración mínima inhibitoria con respecto al antibiótico, según el resultado estandarizado de resistencia o susceptibilidad, cada tubo de discos para antibiograma tiene 50 discos (Águila, 2016).

Al momento de ser usados en cada prueba deben de ser almacenados a una temperatura de 2 y 8 ºC. Los discos que se utilizan a largo plazo, deben almacenarse a -20ºC (Águila, 2016).

II.3.12 Método por difusión en agar

Basado en el método Kirby- Bauer en el antibiograma disco se realiza para determinar la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano. Se colocan en la superficie del agar en una placa de Petri ya solidificado los discos de papel filtros saturado con concentraciones conocidas de los agentes microbianos (Herrera, 1999)

El periodo de incubación es de 18-24 horas; los antimicrobianos son difundidos en el agar, y los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenidas por el método de dilución se la determina en microorganismos en crecimiento (Águila, 2016).

Si la concentración del antimicrobiano es eficaz, presenta un halo de inhibición alrededor del disco. Para interpretar la CMI de una cepa, se mide el diámetro, expresado en mm del halo de la zona de inhibición. Por lo tanto, la lectura se interpreta mediante una tabla de ese fármaco, se verifica y se reporta si el microorganismo es (S) sensible, (I) intermedio (R) resistente al antimicrobiano (Aguilar, 2012).

II.3.13 CMI (Concentración Inhibitoria Mínima)

Se utiliza para medir la sensibilidad bacteriana a un antibiótico o también estudia la capacidad de un antimicrobiano determinado para inhibir el crecimiento bacteriano (Quintana, Diaz, Taboada, & Ortiz, 2005).

Hay diferentes métodos cualitativos para poder clasificar a una cepa microbiana con respecto a su sensibilidad frente al antibiótico de interés (Canton, 2010).

Los halos de inhibición se leen clasificando el resultado como sensible, intermedio y resistente para un antimicrobiano específico (Canton, 2010).

Sensible: Cuando un aislamiento microbiano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano lo que se relaciona a una alta probabilidad de un exitoso efecto terapéutico (Lopez M. , 2016)

Intermedio: Cuando un aislado microbiano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano lo que se relaciona con un efecto terapéutico imprevisto (Lopez M. , 2016)

Resistente: Cuando un asilamiento bacteriano no es inhibido in vitro por una respectiva concentración de un antimicrobiano que se relaciona con una alta probabilidad de un efecto terapéutico poco exitoso (Lopez M. , 2016)

II.3.14 Compuestos fenólicos en las plantas

Existen muchas variedades de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos llamarlos polifenoles. Su origen es principalmente de las plantas, que son sintetizadas en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido

hidroxicinamico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Isla, 2016).

Los flavonoides, nombre que deriva del latin “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Todos los flavonoides tienen estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenolicas. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Isla, 2016).

II.3.15 Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo (Guimeno, 2004)

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antinflamatorias, antidiarreicas, antiúlcera, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. También inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantinamonoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvejecimiento (Quiñonez, Trujillo, Capdesuñer, Quirós, & Hernández de la Torre, 2013).

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticancerígena, antiviral, antinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar; y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la

aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, cicloxigenasa, lipoxigenasa) y acción antinflamatoria (Echavarria, Franco, & Martinez, 2009).

II.3.16 Cuantificación de compuestos fenólicos

La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de actividad antioxidante, pero puede ser útil para tales estudios, en especial si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante. Entre los métodos para la medición de fenoles totales se encuentra el de Folin-Ciocalteu, uno de los métodos más antiguos para determinar el contenido de fenoles totales (Cruzado, Pastor, Castro, & Cedrón, 2013)

Esta prueba se basa en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico. Los polifenoles fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno, este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia de UV/VIS (Muñoz, y otros, 2015)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño de la investigación

Analítico-Experimental: Analiza los diferentes compuestos de la *Chenopodium quínoa* Willd*, Justicia secunda* Vahl y su potencial como antibacteriano usando cepas de ATCC Escherichia coli 25922, Escherichia coli BLEE 35218, como microrganismos indicador.

III.2 Tipo de investigación:

La investigación se caracteriza por ser de tipo descriptiva-experimental.

III.3 Especies vegetales:

- Quínoa criolla blanca, variedad comercial pelada
- Quínoa blanca con cáscara
- Hoja de insulina (*Justicia secunda* Vahl)

III.4 Lugar de la investigación

La investigación se realizó en:

Laboratorios de Análisis de Medicamentos y Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil

Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica – INSPI – Dr. Leopoldo Izquieta Pérez Centro de referencia de Bacteriología.

III.5 Muestras (Microorganismos)

Para el ensayo microbiológico se emplearon las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922*, Escherichia coli con* BLEE ATCC 35218*.*

III.6 Materiales, Reactivos y Equipos

III.6.1 Materiales

- Probeta 50 ml
- Embudo
- Papel filtro
- Balón Erlenmeyer 250 ml y 500 ml
- Capsulas de porcelana
- Pipetas volumétricas de 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Pipetas automáticas 10-100 uL
- Puntas amarrillas 10-100 uL
- Matraz aforado de 50 ml y 100 ml
- Alícuotas de 1-10 ml
- Extractos (Acuosos-Alcohólicos de quínoa comercial, quínoa con cáscara, hoja de insulina (*Justicia secunda* Valh)).
- Pinzas, azas.
- Tubos de ensayos.
- Discos blancos.
- Malla plástica.
- Guantes, coffea, mandil, mascarilla y zapatones
- Caja bipetri y cajas monopetri.

III.6.2 Reactivos

- Solución patrón: Acido gálico.
- Solución de carbonato de sodio anhidro.
- Reactivo Folin – Ciocalteau.
- Agar (Müller Hinton).
- Solución salina estéril 0,9%.
- Agua destilada
- Alcohol absoluto 99%

- Alcohol diluido 1%.
- Hipoclorito de sodio al 1%

III.6.3 Equipos

- Estufa de secado con capacidad de 100 – 200°C
- Balanza analítica 200 g + 0.1 mg
- Desecador
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Incubadora.
- Cabina de bioseguridad tipo 2.

III.7 Preparación del material vegetal

Una vez recolectadas las diferentes especies vegetales de *Chenopodium quinoa* Wild se procedió a secar los granos a temperatura ambiente. Para *Justicia secunda* Valh se lavó las hojas seleccionadas de la plana con hipoclorito de sodio al 1% eliminando toda suciedad y las hojas se enjuagaron con agua destilada. Se completó el secado en una estufa a temperatura de 50°C durante 24 - 48 horas. Posteriormente, se trituro el material vegetal hasta obtener una consistencia pulverizada.

III.8 Obtención de los extractos:

Se pesó 25 g del grano de quínoa pulverizado (quínoa comercial y quínoa con cáscara), se agregó 100 ml de alcohol absoluto, se agitó y se tapó. Se dejó por 24 horas. Luego se filtró y se almacenó el extracto (VER ANEXO D) (Suscal & Vite, 2018).

Se pesó 25 g del grano de quínoa pulverizado (quínoa comercial y quínoa con cáscara), se agregó 100 ml de agua destilada, se agitó y se tapó. Se dejó por 24 horas. Luego se filtró y se almacenó el extracto (VER ANEXO D) (Suscal & Vite, 2018).

Se pesó 40 g del polvo de las hojas secas (*Justicia secunda* Valh), se agregó 250 ml de agua destilada. Se dejó reposar por 48 horas en refrigeración, se filtró el extracto. El filtrado obtenido se conservó en un recipiente de vidrio con tapa rosca a 4°C (VER ANEXO D) (Chicaiza G, 2014).

Se pesó 40 g de las hojas pulverizadas (*Justicia secunda* Valh), se adicionó 150 ml de etanol al 96%. Luego de 48 horas, se filtró y se conservó en un recipiente de vidrio en refrigeración (VER ANEXO D) (Chicaiza G, 2014).

III.9 Determinación de solidos totales (ST)

La determinación del contenido de ST se basó en la evaporación total de una muestra. Separando por filtración el material suspendido, se puede conocer por diferencia, el contenido de este último y del material disuelto (VER ANEXO A). (Toasa Llumigusin, 2012).

Procedimiento

Se procedió a lavar las cápsulas, rotularlas y llevarlas a secar en la estufa para evitar algún tipo de humedad, luego se procedió a pesar las capsulas vacías y se anotó el peso, después se colocó 2 ml de muestra en cada capsula y se pesó, luego se colocó las capsulas en la estufa a 105 °C durante dos horas y por último se dejó enfriar en el desecador y pesar (VER ANEXO A)

Para determinar los sólidos totales se aplica la siguiente ecuación 1.

$$\frac{mg}{ml}\ ST = \frac{(A - B)}{Volumen\ de\ muestra\ ml}\ x\ 100$$

Ecuación 1

Donde:

A = Peso de la capsula más el residuo (mg).

B= Peso de la capsula vacía (mg) (Pulla Marca, 2014).

III.10 Determinación de fenoles totales (FT)

La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método de Follin-Ciocalteau, Esta prueba se basa en hacer pasar los fenoles frente a agentes oxidantes. La lectura de la absorbancia del complejo es de 765 nm en un espectrómetro ultravioleta – visible, se realizó una curva de calibración con ácido gálico (patrón); y los resultados son expresados en mg del ácido gálico equivalentes por el gramo del extracto de quínoa y hoja de insulina (Rioja Antezana, y otros, 2018).

Procedimiento

Se preparó con anticipación la solución diluida de Follin-Ciocalteu: Se tomó 10 ml del reactivo Follin-Ciocalteu y diluir a 100 ml con agua destilada y la solución de carbonato de sodio 7,5%: Se pesó 7,5 de Na_2CO_3 anhidro y se disolvió en 100 ml de agua destilada (VER ANEXO C).

Curva patrón

Se pesó 500 mg de ácido gálico y se disolvió en 20-30 mL de etanol al 96%, se transfirió a matraz aforado de 50 mL y se enrasó con agua destilada. De esta solución concentrada de ácido gálico tomar alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 mL y diluirlas a 100 mL. Estas diluciones corresponden a las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 70 y 100 mg/ml de ácido gálico. El contenido de fenoles totales se expresó en mEq de ácido gálico/ml de extracto (VER ANEXO C).

Tabla IV Curva de calibración de ácido gálico utilizando como patrón

Concentración de ácido gálico (mg/ml)	Absorbancias
10	0,01
20	0,038
30	0,07
40	0,109
50	0,17
70	0,23
100	0,375

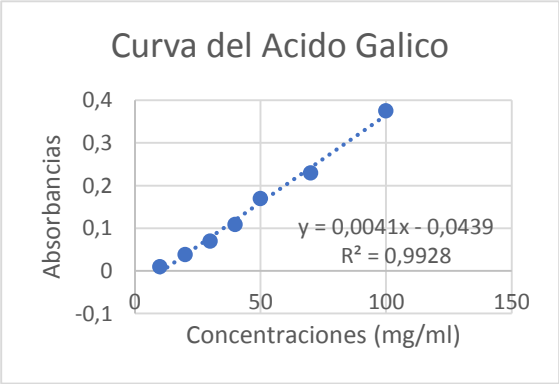


Gráfico 1 Curva de calibración de ácido gálico utilizando como patrón

Técnica

En matraces aforados de 50 ml se adicionó 200 µL de extracto de la muestra o de la solución diluida de ácido gálico, 10 mL de solución diluida de Follin-Ciocalteu, 1,8 mL de agua destilada; se agitó y se dejó reposar por cinco minutos, se adicionó 8 mL de solución 7,5 % de Na_2CO_3 y se homogenizó, se dejó en reposo durante dos horas y leer la absorbancia a 765 nm. El blanco es agua destilada (VER ANEXO C).

III.11 Análisis microbiológico

III.11.1 Recuperación de microorganismos

Cada vial de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli BLEE* ATCC 35218 con un palillo estéril se raspó un poquito del hielo del criotubo, se colocó en agar Sangre de Caballo y se incubó por 24 h a 35 °C con el propósito de revitalizar los microorganismos y posteriormente recuperarlos.

III.11.2 Procedimiento

Se trabajó en una cabina de bioseguridad tipo 2, se limpió el área de trabajo con alcohol diluido 1% y luego se procedió a rotular las cajas para la concentración minina inhibitoria-CIM y el método de difusión (Kirby Bauer).

III.11.3 Método de difusión (Kirby Bauer).

Se tomó de a 1 a 3 colonias de un cultivo previamente incubado a 35°C por 18 a 24 h, se suspendió en 5 ml de solución salina estéril. Se agitó por unos 15 segundos y se ajustó la densidad de la suspensión equivalente a McFarland 0,5 (1,5 x 108 UFC/ml). Se colocó discos de papel filtro en una malla plástica y luego se colocó 30 µL de la solución acuosa y alcohólica de los extractos (VER ANEXO B).

Se preparó las placas en agar Müller Hinton, mediante un hisopo estéril se introdujo en el inóculo exprimiendo el hisopo contra las paredes del tubo. Se inóculo la placa de agar Müller Hinton desplazando el hisopo en tres direcciones diferentes y se dejó reposar por unos 15 minutos; se colocó los discos con las concentraciones establecidas por duplicado y finalmente se incubo con la caja invertida a 35 ± 2°C por 24 h (VER ANEXO B) (Montero, Vayas, Avile, Pazmiño, & Erazo, 2018).

Se procedió a leer el diámetro de cada halo de inhibición con ayuda de una regla. Según los criterios que han sido emitidos por la Sociedad Latinoamericana de Fitomedicina, un halo mayor de 9 mm indica que el resultado es positivo, si el halo tiene un tamaño entre 6-9 mm, y si el halo es inferior a 6 mm se considera negativo o llamado también resistente; estos valores se aplican para los extractos de origen vegetal (VER ANEXO B) (Espinosa, 2017).

III.11.4 Método de dilución del (MIC)

Se colocó en un tubo 9,9 ml del caldo Müller Hinton (MHSC Ph 7,3), se añadió 100 µL de la suspensión bacteriana McFarland 0,5 (1,5 x 10^8 UFC/ml) y luego se agito. Se colocó en cada pocillo 50 µL de los extractos acuosos y alcohólicos, después se colocó 50 µL del caldo, luego se adicionó 50 µl de la suspensión bacteriana, se añadió 100 µL del caldo y por último se mezcla e incubar a 35 ± 2°C por 24 h (VER ANEXO B) (Quintana H. , Diaz, Taboada, & Ortiz, 2005).

Se procedió a leer el crecimiento bacteriano con la presencia o la usencia de turbidez en las placas que se dejaron incubar a 35°C por 24 h (VER ANEXO B) (Quintana et al., 2005).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1 Determinación de sólidos totales

En general, los extractos acuosos de las 3 variedades tuvieron valores más altos de solidos totales comparando con los extractos alcohólicos respectivos, mencionando que el material pulverizado de las 3 especies contiene altas concentraciones de compuestos solubles en agua (Tabla V).

Tabla 5 Promedios de sólidos totales

Muestra	Promedio mg/ml	DE mg/ml
Quínoa con cáscara /extracto acuoso	32,9 mg/ml	1,02 mg/ml
Quínoa sin cáscara /extracto acuoso	26,17 mg/ml	1,31mg/ml
Justicia secunda Vahl / extracto acuoso	27,22 mg/ml	1,95 mg/ml
Quínoa con cáscara /extracto alcohólico	22,43 mg/ml	1,69 mg/ml
Quínoa sin cáscara /extracto alcohólico	19,83 mg/ml	1,39 mg/ml
Justicia secunda Vahl /extracto alcohólico	16,63 mg/ml	1,05 mg/ml

DE: Desviación Estándar

Elaborado por: Autores

El extracto acuoso de quínoa con cáscara tiene un valor promedio de 32,9 ± 1,02 mg/ml de solidos totales, por otro lado que el valor correspondiente del extracto alcohólico fue de 22,43 ± 1,69 mg/ml; el extracto acuoso de quínoa sin cáscara tiene un valor promedio de 26,17 ± 1,31 mg/ml de solidos totales, mientras tanto que el valor correspondiente del extracto alcohólico fue de 19,83

± 1,39 mg/ml y en el extracto acuso de *Justicia secunda* Vahl tiene un valor promedio de 27,22 ± 1,95 mg/ml de solidos totales, en cambio el valor correspondiente del extracto alcohólico fue de 16,63 ± 1,05 mg/ml dando resultados altos de solidos totales (Tabla V).

Los resultados obtenidos están en un rango de 25-35 mg/ml para el extracto acuoso y para el extracto alcohólico tienen un rango de 15-25 mg/ml, y para la desviación estándar tiene un rango de 1-4 mg/ml, para lo cual según (Chilán & Chalén, 2019), se encuentra dentro de los valores permitido entre 25-35 mg/ml para extracto acuoso y para extracto alcohólico entre 15-25 mg/ml, y para desviación estándar entre 1-4 mg/ml.

Estos valores permiten calcular las concentraciones de solidos totales de cada especie utilizada en los ensayos.

IV.2 Prueba de sensibilidad antibacteriana

Interpretación de Resultados

- Resistente (R) : <6 mm.
- Intermedio (I) : 6-9 mm.
- Sensible (S) : > 9 mm (Espinosa, 2017).

Los ensayos de inhibición microbiana indican resistente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218 para los tres extractos en solventes alcohólicos y acuosos (Tabla VI).

Tabla 6 Prueba de actividad antibacteriana en *Escherichia coli* y *Escherichia coli BLEE*

Escherichia coli* y *Escherichia coli BLEE	**N° de replicas**	**Promedio mm**	**DE mm**	**Interpretación**
Extracto Alcohólico / Quínoa con cáscara	2	-	-	R
Extracto Alcohólico / Quínoa sin cáscara	2	-	-	R

Extracto Alcohólico / *Justicia secunda* Vahl	2	-	-	R
Extracto Acuoso / Quínoa con cáscara	2	-	-	R
Extracto Acuoso / Quínoa sin cáscara	2	-	-	R
Extracto Acuoso / *Justicia secunda* Valh	2	-	-	R

DE: Desviación Estándar

Elaborado por: Autores

Los extractos alcohólicos y acuosos de quínoa con cáscara, quínoa sin cáscara y *Justicia secunda* Valh ninguno de los tres extractos presentaron inhibición en los halos en las cepas de ATCC *Escherichia coli* 25922 y ATCC *Escherichia coli* BLEE 35218.

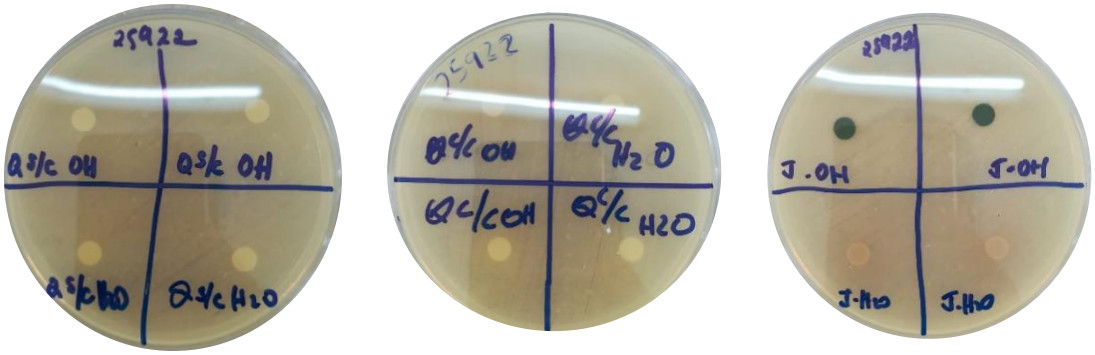


Figura 1 Método de Kirby-Bauer en *Escherichia coli* en extractos alcohólicos y acuosos en las tres especies vegetales

En la Figura 1 los extractos acuosos y alcohólicos de quínoa comercial, quínoa con cáscara y *Justicia secunda* Valh no mostraron halo de inhibición frente *Escherichia coli* ATCC 25922

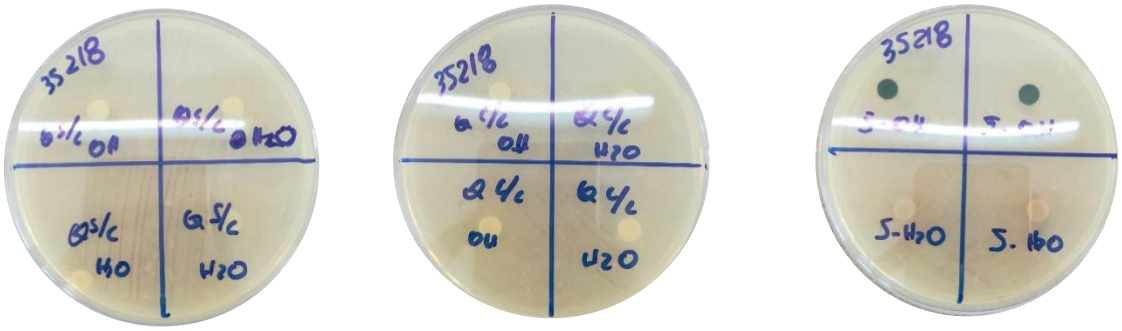


Figura 2 Método de Kirby-Bauer en *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en las tres especies vegetales

En la Figura 2 los extractos acuosos y alcohólicos de quínoa comercial, quínoa con cáscara y *Justicia secunda* Valh no mostraron halo de inhibición frente *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218

IV.3 Prueba de sensibilidad bacteriana

Los ensayos de dilución presentan inhibición bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218 para los extractos en solventes alcohólicos, mientras en los extractos acuosos no presentaron (Tabla VII).

Tabla VII Prueba de Dilución (Concentración Mínima Inhibitoria-CMI) Escherichia coli ATCC 25922 y Escherichia coli BLEE ATCC 35218

***Escherichia coli* ATCC 25922 *y* *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218**	**N° de replicas**	**Interpretación**
Extracto Alcohólico / Quínoa con cáscara	3	Pocillo 2 (75%: 8,41 mg/ml)
Extracto Alcohólico / Quínoa sin cáscara	3	Pocillo 2 (75%: 11,63 mg/ml)
Extracto Alcohólico / *Justicia secunda* Vahl	3	Pocillo 2 (75%: 6,24 mg/ml)
Extracto Acuoso / Quínoa con cáscara	3	En todos los pocillos (>1)
Extracto Acuoso / Quínoa sin cáscara	3	En todos los pocillos (>1)
Extracto Acuoso / *Justicia secunda* Vahl	3	En todos los pocillos (>1)

Elaborado por: Autores

Los extractos alcohólicos de quínoa con cáscara, quínoa sin cáscara y *Justicia secunda* Vahl inhibieron en la concentración del 75% con concentraciones de 8,41 mg/ml (quínoa con cáscara), 11,63 mg/ml (quínoa sin cáscara), 6,24 mg/ml (*Justicia secunda* Vahl), mientras que en los extractos acuosos todos presentaron crecimiento en las cepas de ATCC *Escherichia coli* 25922 y ATCC *Escherichia coli* BLEE 35218.

Figura 3 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en quínoa comercial***.***

En la Figura 3 los extractos alcohólicos de quínoa comercial presentaron inhibición bacteriana en la concentración del 75% con una concentración 11,63 mg/ml (quínoa sin cáscara), la inhibición bacteriana fue debido al efecto antibacteriano del etanol y también por la presencia de turbidez en los pocillos, mientras que en los extractos acuosos todos presentaron crecimientos en los todos los pocillos frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218.

Figura 4 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en quínoa con cáscara

En la Figura 4 los extractos alcohólicos de quínoa con cáscara presentaron inhibición bacteriana en la concentración del 75% con una concentración 8,41 mg/ml, la inhibición bacteriana fue debido al efecto

antibacteriano del etanol y también por la presencia de turbidez en los pocillos, mientras que en los extractos acuosos todos presentaron crecimientos en los todos los pocillos frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218.

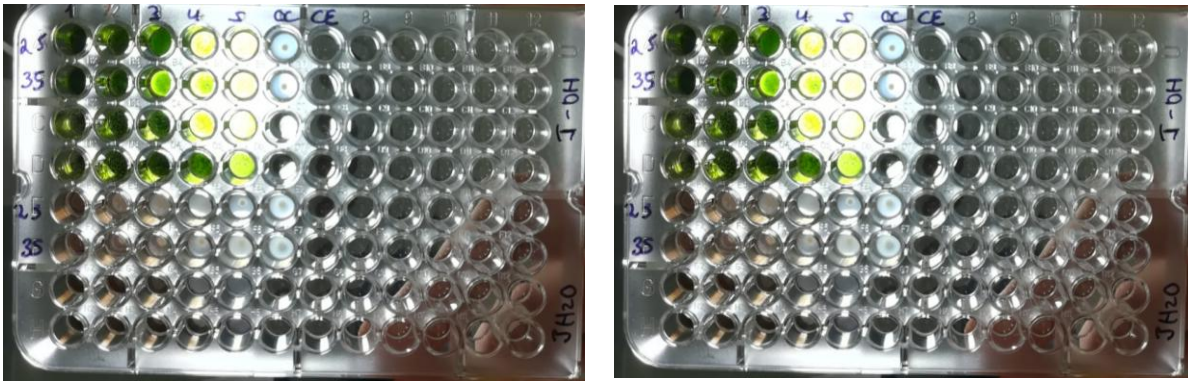


Figura 5 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos *en Justicia secunda* Valh

En la Figura 5 los extractos alcohólicos de *Justicia secunda* Vahl presentaron inhibición bacteriana en la concentración del 75% con una concentración 6,24 mg/ml, la inhibición bacteriana fue debido al efecto antibacteriano del etanol y también por la presencia de turbidez en los pocillos, mientras que en los extractos acuosos todos presentaron crecimientos en los todos los pocillos frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* BLEE ATCC 35218.

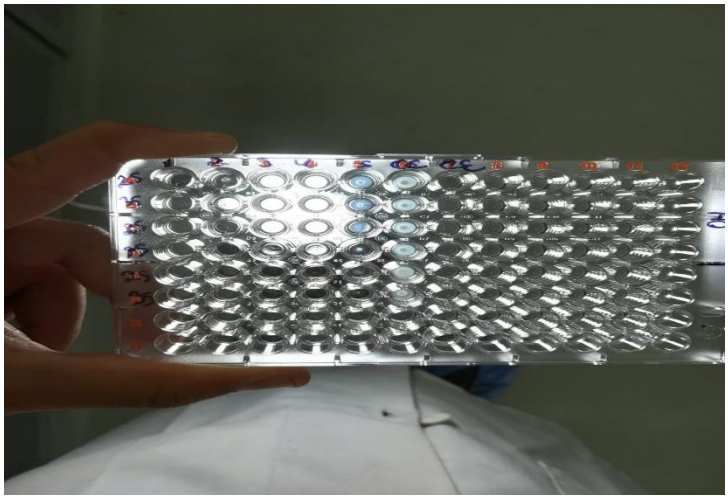


Figura 6 Método de Dilución en *Escherichia coli* y *Escherichia coli* BLEE en extractos alcohólicos y acuosos en etanol

En la figura 6 el etanol como vehículo para los extractos alcohólicos se presentó inhibición bacteriana en el cuarto pocillo en una concentración de 25% según su dilución lo que afirma que la actividad antibacteriana presente en los extractos es debido a la acción antibacteriana del etanol

IV.4 Determinación de fenoles totales

En general, los extractos alcohólicos y acuosos de *Justicia secunda* Valh presentan más concentración en los compuestos fenólicos en comparación con los extractos alcohólicos y acuosos *Chenopodium quínoa* Willd (Tabla VIII).

Tabla 8 **Promedio de fenoles totales en extractos alcoholicos**

Extracto Alcohólico de Quínoa con cáscara	**Absorbancias**	**Fenoles Totales Concentración**
1	0,220	75,975 mEq ácido gálico/ml
2	0,270	75,965 mEq ácido gálico/ml
3	0,280	75,969 mEq ácido gálico/ml
Media	0,256	75,969 mEq ácido gálico/ml
Extracto Alcohólico de Quínoa comercial	**Absorbancias**	**Fenoles Totales Concentración**
1	0,209	68,995 mEq ácido gálico/ml
2	0,210	68,980 mEq ácido gálico/ml
3	0,200	68,988 mEq ácido gálico/ml
Media	0,206	68,991 mEq ácido gálico/ml
Extracto Alcohólico de Hoja de Insulina	**Absorbancias**	**Fenoles Totales Concentración**
1	0,350	97,968 mEq ácido gálico/ml

2	0,350	97,972 mEq ácido gálico/ml
3	0,350	97,976 mEq ácido gálico/ml
Media	0,350	97,972 mEq ácido gálico/ml

Elaborado por: Autores

El extracto alcohólico de quínoa con cáscara posee con un valor promedio de 75,969 mEq ácido gálico/ml, los extractos alcohólicos de quínoa comercial poseen un valor promedio de 68,991 mEq ácido gálico/ml, los extractos alcohólicos de hoja de insulina poseen un valor promedio 97,972 mEq ácido gálico/ml, según los resultados los tres extractos alcohólicos la hoja de insulina posee mayor concentración de fenoles, la quínoa con cáscara presente mayor concentración de fenoles en comparación con la quínoa sin cáscara.

Tabla 9 Promedio de fenoles totales en extractos acuosos

Extracto Acuosos de Quínoa con cáscara	**Absorbancias**	**Fenoles Totales Concentración**
1	0,330	90,988 mEq ácido gálico/ml
2	0,330	90,985 mEq ácido gálico/ml
3	0,320	90,978 mEq ácido gálico/ml
Media	0,326	90,983 mEq ácido gálico/ml
Extracto Acuosos de Quínoa comercial	**Absorbancias**	**Fenoles Totales Concentración**
1	0,220	75,975 mEq ácido gálico/ml
2	0,220	75,978 mEq ácido gálico/ml
3	0,220	75,973 mEq ácido gálico/ml

Media	0,220	75,974 mEq ácido gálico/ml

Extracto Acuosos de Hoja de Insulina	Absorbancias	Fenoles Totales Concentración
1	0,349	96,998 mEq ácido gálico/ml
2	0,340	96,995 mEq ácido gálico/ml
3	0,350	96,989 mEq ácido gálico/ml
Media	0,346	96,994 mEq ácido gálico/ml

Elaborado por: Autores

El extracto acuoso de quínoa con cáscara posee con un valor promedio de 90,983 mEq ácido gálico/ml, los extractos acuosos de quínoa comercial poseen un valor promedio de 75,974 mEq ácido gálico/ml, los extractos acuosos de hoja de insulina poseen un valor promedio 96,994 mEq ácido gálico/ml, según los resultados los tres extractos acuosos la hoja de insulina posee mayor concentración de fenoles, la quínoa con cáscara presente mayor concentración de fenoles en comparación con la quínoa sin cáscara.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 Conclusiones

Según los análisis realizados por el método de Follin-Ciocalteu los extractos alcohólicos y acuosos de *Justicia secunda* Valh presentan más concentración en los compuestos fenólicos en comparación con los extractos alcohólicos y acuosos *Chenopodium quínoa* Willd

Se concluyó que los extractos acuosos de *Chenopodium quínoa* Willd no presentan actividad antibacteriana, pero los extractos alcohólicos presentan inhibición en la prueba de concentración mínima inhibitoria en el segundo pocillo a una concentración de (75%: 8,41 mg/ml) en quínoa con cáscara y (75%: 11,63 mg/ml) en quínoa sin cáscara fue dada por la actividad antibacteriana del alcohol.

Se concluyó que los extractos acuosos de *Justicia secunda* Valh no presentan actividad antibacteriana, pero los extractos alcohólicos presentan inhibición en la prueba de concentración mínima inhibitoria en el segundo pocillo a una concentración de (75%: 6,24 mg/ml) fue dada por la actividad antibacteriana del alcohol.

Según los análisis del método de método de difusión (Kirby Bauer) los extractos alcohólicos y acuosos de *Chenopodium quínoa* Willd y *Justicia secunda* Valh no presentaron inhibición en los halos que indican que son resistentes.

V.2 Recomendaciones

- Evaluar con concentraciones mayores al principio activo utilizadas en la propuesta de investigación.

- Continuar con el estudio de *Chenopodium quínoa* Willd y *Justicia secunda* Valh realizando ensayos adicionales en otras cepas bacterianas gran positivas y gran negativas.

- Analizar los extractos con otros vehículos que presenten una buena solubilidad, bajo costo e inocuos para el consumo humano.

BIBLIOGRAFÍA

Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benitez, R. (2016). Saponinas de quinua (Chenopodium quinoa): un subproducto con alto potencial biologico. *Revista Colombia de Ciencias Quimica y Farmacia*, 438-469.

Águila Alexandra. (2016). Antibiograma. *FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE PANAMÁ*.

Aguilar, G. & R. &. (2012). Chemistry and Pharmacology of Selected Asian and American Medicinal Species of Justicia. *Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine*.

Alavi, G., Diels, J., Willems, P., & Garcia, M. (2015). Simulacion de la produccion de Quinua en el Altiplano Boliviano con el modelo de AQUACROP con escenarios futuros generados por LARS-WG y QPM. *Investigacion e Innovacion Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7-118.

Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica* (Vol. 33, Issue 10, pp. 692–699). Elsevier Doyma. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004

Aranibar Tito, G. M. (27 de Abril de 2017). *repositorio.unap.edu.pe.* Obtenido de Universidad Nacional del Altiplano: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5813/Aranibar_Tito_Gledy_Mabel.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Arenas, L. C., & Heredia, A. (2017). *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.* Obtenido de repository.udca.edu.co: https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/766/1/Trabajo%20de%20grado%20Calidad%20y%20germinaci%C3%B3n%20de%20semillas%20de%20quinua%20Chenopodium%20quinoa%20Willd.%20almacenada.pdf

Arias, C. (2003). *Universidad de los Andes*. Obtenido de repositorio.uniandes.edu.co: https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/15464/u234843.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Azuero C, A. (2015). *repositorio.utamachala.edu.ec.* Obtenido de ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE DOCE PLANTAS MEDICINALES DE USO ANCESTRAL EN EL ECUADOR: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2822/2/CD0000-20-TRABAJO%20COMPLETO.pdf

Bojanic, A. (Julio de 2011). *Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion.* Obtenido de fao.org: http://www.fao.org/3/aq287s/aq287s.pdf

Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga Toxin Producing Escherichia coli. In *Clinics in Laboratory Medicine* (Vol. 35, Issue 2, pp. 247–272). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.004

Chicaiza G. (2014). DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIMICÓTICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE PLANTAS DE QUÍNOA (Chenopodium quinoa willd) APLICADO SOBRE CEPAS DE INTERÉS CLÍNICO. *Universidad de Chimborazo, Riobamba.*

Canton, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Revista Elsevier*, 375-385.

Chandra, s. (2015). Quinoa (Chenopodium quinoa Willd. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH*

Correa, G. M., & de Alcantara, A. F. C. (2011). Chemical constituents and biological activities of species of justicia -a review. In *Brazilian Journal of Pharmacognosy* (Vol. 22, Issue 1, pp. 220–238). Sociedade Brasileira de Farmacognosia. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000196

Chito, D., Ortega, R., Ahumada, A., & Rosero, B. (2017). Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) versus soja (Glycine max [L.] Merr.) en la nutrición humana: revisión sobre las características agroecológicas, de composición y tecnológicas. *Revista Española de Nutricion Humana y Dietetica*, 2174-5145.

Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N., & Cedrón, J. C. (2013). Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (Cynara scolymus L.). *Revista de la Sociedad Quimica de Peru*.

Cuadrado, L., Villacres, E., Rios, A., Quelal, M. B., & Alvarez, J. (Agosto de 2015). *INIAP*. Obtenido de Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias: https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2654/1/iniapscbt428.pdf

DRA. (2016). *Dirreccion Regional de Agricultura - Ancash*. Obtenido de agroancash,gob.pe: https://agroancash.gob.pe/agro/wp-content/uploads/2016/06/libro-quinua.pdf

Echavarria, B., Franco, A., & Martinez, A. (2009). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EXTRACTOS DE MACROALGAS DEL CARIBE COLOMBIANO. *Revista de la Falcultad de Quimica Farmaceutica*, 126-131.

Espinosa, J. (2017). *Plantas aromaticas y medicinales tropicales con potencial actividad antimicrobiana.* Tabasco: Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Villahermosa.

Falconi, F. (2015). *Universidad Nacional de Chimmborazo*. Obtenido de dspace.unach.edu.ec: http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1305/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2015-0004.pdf

FAO. (2015). *fao.org*. Obtenido de Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf

FAO. (2019). *Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura.* Obtenido de fao.org: http://www.fao.org/in-action/quinoa-platform/quinua/biodiversidad-de-la-quinua/es/

Farfan, A., Ariza, S., & Vargas, F. V. (26 de Julio de 2016). *Universidad de Santander.* Obtenido de scielo.coincyt.cl: https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n4/art09.pdf

Garcia, E. (2011). Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimoter*.

Garcia, M. (2013). Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. *Revista Sanidad MIlitar*.

Garcia, S., & Patiño, C. (2015). ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II,QUE CONSUMEN LA INFUSIÓN DE Justicia secunda (PLANTA DE INSULINA), COMO COADYUVANTE EN SU TERAPIA Y QUE INTEGRAN EL CLUB DE DIABÉTICOS DEL CANTÓN PALESTINA GUAYAS. *UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS*.

Guevara, E. (2012). *Escuela Superior Politecnica de Chimborazo*. Obtenido de dspace.espoch.edu.ec: http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2588/1/56T00365.pdf

Guimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista Elsevier*, 80-84.

Hernandez, J. (2015). La quinua, una opción para la nutrición del paciente con diabetes mellitus. *Revista Cubana de Endocrinología*, 304-312.

Herrera, M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Métodología de laboratorio. *Revista Medica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Saenz Herrera*.

Herrera, H. (2002). Actividad biológica de los extractos de “Sanguinaria” (Justicia secunda). *Biologia Farmaceutica Taylor*.

Isla, M. (2016). CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN HOJA DE Phyllanthus niruri. *Universidad Catolica Los Angeles Chimbote*.

INDECOPI. (12 de Diciembre de 2015). *INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCION DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL*. Obtenido de Indecopi.gob.pe: https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/202940/Bolet%C3%ADn+N%C2%BA+12+%E2%80%93+Tema+QUINUA/717f8ff4-f3d2-43c2-aa7e-e8281dd6d8b6

INIAP. (13 de Junio de 2019). *scielo.senecyt.gob.ec*. Obtenido de Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias:

http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/enfoqueute/v10n2/1390-6542-enfoqueute-10-02-00079.pdf

Lopez, L., & Alvaro, P. (2007). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25 Supl. 2:23-823Epidemiología de las BLEE en la comunidad:un problema emergente. *Revista Elsevier*, 23-28.

Lopez, M. (Abril de 2016). *Universidad Tecnica de Ambato*. Obtenido de repositorio.uta.edu.ec: https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22436/2/LOPEZ%20ESTRELLA%2C%20MARIA%20TERESA.pdf

Martinez, L. (2014). *Pontifica Universidad Javeriana*. Obtenido de epository.javeriana.edu.co: https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/12027/MartinezGonzalezLibardoAngel2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Milvaques, A. (2016). Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I). *Escherichia Coli: Características, Patogenicidad y Prevención (I)*.

Miranda, J., Pinto, J., Faustino Arias, D. M., Sánchez-Jacinto, B., & Ramirez, F. (2019). Antimicrobial resistance of uropathogens in older adults in a private clinic in Lima, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, *36*(1), 87–92. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3765

Mogahzy. (2009). Tejidos con acabado antimicrobiano. *ScienceDirect*.

Montero, M., Vayas, L., Avile, D., Pazmiño, P., & Erazo, V. (2018). Evaluacion de dos metodos para medir la sensibilidad de inhibicion de la cepa certificada de Staphylococccus aureus subsp. aureus. *Inv Vet Peru*, 1543-1547.

Morales, R. (2003). Terapia de bacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido. *Revista Chilena de Infectologia*, 24-27.

Mujica, A., Izquierdo, J., & Marathee, J. P. (2016). Obtenido de ciq.org.bo: https://www.ciq.org.bo/images/recursosInformacion/repositorioDigital/16%20LIBRO%20Quinua-ancestral-cultivo-de-los-andes-r-miranda.pdf

Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L., Rendón, M., Patricia, M., & Otálvaro, Á. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (Campomanesia lineatifolia). *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 38-46.

OMS. (2016). Organizacion Mundial de la Salud. *Organizacion Mundial de La Salud*.

Pulla Marca, H. M. (2014). Evaluacion de la estabilidad fisiquimica y microbiologica de un extracto acuoso de moringa (Moringa oleifera Lam), cosechada en al facultad de ciencias agropecuarias de la Universidad Tecnica de Machala. *Trabajo de Titulacion previo a la obtencion del Titulo de Bioquimica Farmaceutico*. Machala, El Oro, Ecuador. Obtenido de Repositorio de la Universidad de Machala: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1427/7/CD00285-TESIS.pdf

Quintana, H., Diaz, S., Taboada, V., & Ortiz, T. (2005). Concentracion minima inhibitoria y concentracion minima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatogenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplasocas. *Revista Medica Herediana*.

Quintana, H., Diaz, S., Taboada, W., & Ortiz, T. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas . *Revista Medica Herediana*.

Quiñonez Perez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolucion y perseptivas actuales ante el enfoque ¨Una Salud¨. *Revista Cubana de Medicina Tropical*.

Quiñonez, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y., & Hernández de la Torre, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de Theobroma cacao L. (cacao). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.

Repo de Carrasco, R., & Encina Zelada, C. R. (2008). Determinacion de la capacidad antioxidante y compuestos fenolicos de cereales andinos:

quinua (Chenopodium quinoa), kañiwa (Chenopodium pallidicaule) y kiwicha (Amaranthus caudatus). *Revista de la Sociedad Quimica del Peru*.

Rioja Antezana, A. P., Vizaluque, B. E., Aliaga Rossel, E., Tejada, L., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta, M. (2018). Determinacion de la capacidad antioxidante total, fenoles totales u actividad enzimatica en un bebida no lactea en base a granos de chenopodium quinoa. *Revista Boliviana de Quimica*.

Rodriguez, E., Villalobos, L., & Martinez, R. (2009). Escherichia coli shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia* , 1315-2556.

Rodriguez, S. (2016). *Universidad Cesar Vallejo*. Obtenido de respositorio.ucv.edu.pe: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/589/rodriguez_ms.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Rodríguez, S. (2016). Eficacia antibacteriana del extracto de Chenopodium quínoa Willd “QUINOA” sobre la cepa de Escherichia coli, Estudio in Vitro. *Universidad Cesar Vallejo*.

Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A., & Muñoz, J. F. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *6*(1), 2. https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-2

Sanchez, J., & Chapoñan, J. (2015). *Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.* Obtenido de repositorio.unprg.edu.pe: http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/1032/BC-TES-5803.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Suscal, J., & Vite, G. (2018). *ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE EXTRACTOS ACUOSOS Y ETANÓLICOS DE LA PLANTA Senna pistaciifolia CONTRA LA PRESENCIA DE Candida albicans.* Tesis para Quimico y Farmacueutico , Universidad de Guayaquil , Guayaquil.

Suxo Patricia. (2018). CUANTIFICACIÓN, EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA Y

DERIVATIZACIÓN DE SAPOGENINAS DE CASCARILLA DE QUINUA (Chenopodium quinoa Willd). *UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES*.

Toasa Llumigusin, F. A. (2012). Validacion de los metodos de ensayo para fenoles, tensoactivos, solidos suspendidos y total de solidos disueltos (TDS). *Tesis de grado para la obtencion del tirulo de Ingeniera Quimica*. Quito, Pichincha, Ecuador. Obtenido de Repositorio de la Universidad Central del Ecuador: http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/894/1/T-UCE-0017-19.pdf

Zambrano, P., % Bustamente, K. (2017). Characterization and phytochemical study of Justicia secunda valh (sanguinaria, singamochilla, insulina). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. https://doi.org/76616

Zurita Maritza. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Scielo*

GLOSARIO

Absceso: Es una infección del tejido del organismo por la acumulación de pus.

Anemia hemolítica: Son unos grupos de trastornos en lo que los glóbulos rojos causan la destrucción de la producción de la medula ósea.

Antibacteriano: Toda sustancia que destruye las bacterias o les impide que crezcan y causen enfermedad.

Carcinogénesis: Es el proceso por el cual las células normales obtienen mutaciones y comienzan a reproducirse descontroladamente, afectando el balance entre nacimiento y muerte celular.

Escherichia coli: Es una bacteria que forma parte de las enterobacterias que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano.

Hipoglucemiante: Son medicamentos para bajar los niveles de azúcar en la sangre, principalmente para las personas que son diabéticos y resistentes a la insulina.

Osteoporosis: Es una enfermedad que debilita los huesos, por ende hace que se quiebra fácilmente los huesos.

Síndrome hemolítico urémico: Es un trastorno que ocurre por una infección en el aparato digestivo que produce sustancias tóxicas, destruyendo los glóbulos rojos causando lesiones en los riñones.

Trombocitopenia: Es la disminución de la cantidad de plaquetas en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales.

ANEXOS

Anexo A Determinación de sólidos totales

1. Sólidos totales

Figura 7 Estufa control de solidos totales

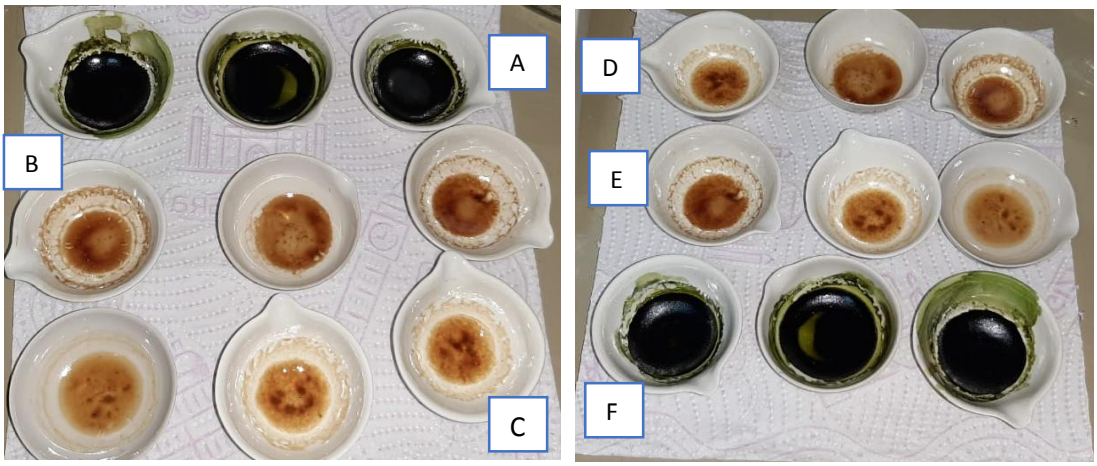


Figura 8 Solidos totales en muestras por triplicado

A. Extractos alcohólicos de hoja de insulina.
B. Extractos alcohólicos de quínoa comercial.
C. Extractos alcohólicos de quínoa con cáscara
D. Extractos acuosos de quínoa comercial
E. Extractos acuosos de quínoa con cáscara
F. Extractos acuosos de *Justicia secunda* Vahl

Detalle de las lecturas en determinación de solidos totales

Tabla 10 Determinación de solidos totales

Muestras	Peso cápsulas vacías (mg)	Peso capsulas con 2ml de muestra (mg)	Peso de residuo seco más capsula (mg)	Peso de residuo seco más cápsula (mg) (constante)
Extracto acuoso de la quínoa con cáscara				
1	27808.1	29763.4	27871.4	27872.4
2	33060.4	35017.7	33123.4	33126.2
3	21623.1	23595.5	21690.4	21690.0
Extracto acuoso de la quínoa sin cáscara				
4	23993.9	25958.8	24043.7	24042.6
5	30552.6	32586.5	30602.9	30602.4
6	34988.9	36973.0	35048.1	35047.4
Extracto acuoso de *Justicia secunda* Vahl				
7	30086.1	32080.8	30143.0	30147.9
8	20277.8	22264.9	20341.3	20345.2
9	33767.0	35756.5	33824.5	33821.1
Extracto alcohólico de la quínoa con cáscara				
10	30590.5	32565.1	30607.0	30606.6
11	20276.9	22039.6	20333.6	20333.4
12	33058.9	34899.3	33121.2	33120.9
Extracto alcohólico de la quínoa sin cáscara				
13	34987.9	36708.0	35025.4	35025.0
14	27807.0	29545.5	27846.3	27846.0
15	23993.3	25714.7	24036.8	24036.5
Extracto alcohólico de *Justicia secunda* Vahl				
16	33765.7	35356.4	33808.5	33808.0
17	21622.0	23214.2	21664.5	21664.2
18	30116.7	31718.8	30132.2	30132.0

III.9 Determinación de solidos totales (ST)

La determinación del contenido de ST se basó en la evaporación total de una muestra. Separando por filtración el material suspendido, se puede conocer por diferencia, el contenido de este último y del material disuelto (Toasa Llumigusin, 2012).

Materiales para determinación de solidos totales.

- ✓ Capsulas de porcelana
- ✓ Pipetas volumétricas de 2 ml

Equipos

- Estufa de secado con capacidad de 100 – 200°C
- Balanza analítica 200 g + 0.1 mg
- Desecador

Técnica

- ✓ Lavar las capsulas, rotularlas y llevarlas a secar en la estufa de secado para evitar algún tipo de humedad.
- ✓ Se procedió a pesar las capsulas vacías en la balanza analítica y se anotó cada peso.
- ✓ Luego se colocó 2 ml de muestra en cada capsula y se pesó nuevamente las capsulas con muestra.
- ✓ Luego llevar las capsulas al horno de secado a 105 °C durante dos horas.
- ✓ Enfriar en el desecador y pesar.

Para determinar los sólidos totales se aplica la siguiente ecuación 1.

$$\frac{mg}{ml}\ ST = \frac{(A - B)}{Volumen\ de\ muestra\ ml}\ x\ 100$$

29

Ecuación 1

Donde:

A = Peso de la capsula más el residuo (mg).

B= Peso de la capsula vacía (mg) (Pulla Marca, 2014).

Figura 9 Protocolo de Determinación de Solidos totales.

Anexo B Dilución de los extractos para el MIC y antibiograma

2. Análisis microbiológico

Figura 10 Preparación de materiales para los análisis microbiológicos

Figura 11 Prueba de Difusión (Kirby Bauer en agar)

Figura 12 Prueba de Dilución (Concentración Mínima Inhibitoria-CMI)

Análisis microbiológico

Materiales y Equipos

- Cepas ATCC *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli BLEE* ATCC 35218.
- Extractos (Acuosos-Alcohólicos de quínoa comercial, quínoa con cáscara, hoja de insulina (*Justicia secunda* Vahl)).
- Pipetas volumétricas de 10 mL.
- Agar (Müller Hinton).
- Agua destilada.
- Solución salina estéril 0,9%.
- Pinzas.
- Azas.
- Tubos de ensayos.
- Discos blancos.
- Malla plástica.
- Pipetas automáticas 10-100 uL.
- Puntas amarillas 10-100 uL.
- Guantes, coffea, mandil, mascarilla.
- Caja bipetri y cajas monopetri.
- Alcohol diluido 1%.

Equipos:

- Incubadora.
- Cabina de bioseguridad tipo 2.

Se tomó de a 1 a 3 colonias de un cultivo previamente incubado a 35°C por 18 a 24 h, se suspende en 5 ml de solución salina estéril. Se agita por unos 15 segundos y se ajusta la densidad de la suspensión equivalente a McFarland 0,5 (1,5 x 108 UFC/ml).

Preparación de discos

Se colocó discos de papel filtro en una malla plástica y luego se colocó 30 µL de la solución acuosa y alcohólica de los extractos.

Método modificado de Kirby Bauer en agar

Se preparó las placas en agar Müller Hinton, mediante un hisopo estéril se introdujo en el inóculo exprimiendo el hisopo contra las paredes del tubo para evitar el excedente de muestra. Se inóculo la placa de agar Müller Hinton desplazando el hisopo en tres direcciones diferentes; en cada repetición, se giró la placa y dejamos reposar por unos 15 minutos.

Se colocó los discos con las concentraciones establecidas por duplicado y finalmente se incubo con la caja invertida a 35±2°C por 24 h (Montero, Vayas, Avile, Pazmiño, & Erazo, 2018).

Lectura

Se procedió a leer el diámetro de cada halo de inhibición con ayuda de una regla. Según los criterios que han sido emitidos por la Sociedad Latinoamericana de Fitomedicina, un halo mayor de 9 mm indica que le resultado es positivo, es decir el microorganismo es susceptible al material de ensayo, si el halo tiene un tamaño entre 6-9 mm se considera que la actividad es intermedia dependiendo de las concentraciones establecidas de los extractos, y si el halo es inferior a 6 mm se considera negativo o llamado también resistente; estos valores se aplican para los extractos de origen vegetal (Espinosa, 2017).

Método de dilución del (MIC)

Preparación del inóculo

Se colocó en un tubo 9,9 ml del caldo Müller Hinton (MHSC Ph7, 3), se añadió 100 µL de la suspensión bacteriana McFarland 0,5 (1,5 x 10^8 UFC/ml) y luego se agito suavemente para mezclar.

Método de Dilución (Concentración Mínima Inhibitoria-CMI)

Se colocó en cada pocillo 50 µL de los extractos acuosos y alcohólicos, después se colocó 50 µL del caldo en el pocillo para control de crecimiento, luego se adiciona 50 µl de la suspensión bacteriana en cada pocillo, se añadió 100 µL del caldo en el pocillo para control de esterilidad y por último se mezcla e incubar a 35±2°C por 24 h (Quintana H. , Diaz, Taboada, & Ortiz, 2005).

Lectura

Se procedió a leer el crecimiento bacteriano con la presencia o la usencia de turbidez en las placas que se dejaron incubar a 35°C por 24 h (Quintana et al., 2005).

Figura 13 Protocolo de Análisis microbiológico

Anexo C Fenoles totales

Figura 14 Preparación de la curva patrón del Ácido Gálico

Figura 15 Fenoles totales en muestras por triplicado

Determinación de fenoles totales (FT)

La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteau. Esta prueba se basa en hacer pasar los fenoles frente a agentes oxidantes. La lectura de la absorbancia del complejo es de 765 nm en un espectrómetro ultravioleta – visible, se realizara una curva de calibración con ácido gálico (patrón); y los resultados son expresados en mg del ácido gálico equivalentes por el gramo del extracto de quínoa y hoja de insulina (Rioja Antezana, y otros, 2018).

Reactivos

- ✓ Solución patrón: Acido gálico.
- ✓ Solución de carbonato de sodio anhidro.
- ✓ Reactivo Folin – Ciocalteau.
- ✓ Agua destilada

Materiales

- ✓ Pipetas automáticas 10-100 uL
- ✓ Puntas amarrillas 10-100 uL
- ✓ Matraz aforado de 50 ml
- ✓ Alícuotas de 1-10 ml
- ✓ Matraz aforado de 100 ml

Equipos

- ✓ Espectrofotómetro UV-VIS

Se prepara con anticipación:

- ✓ La solución diluida de Follin-Ciocalteu: Tomar 10 ml del reactivo Follin-Ciocalteu y diluir a 100 ml con agua destilada

Curva patrón

Se pesara 500 mg de ácido gálico y disolver en 20-30 mL de etanol al 96%, transferir cuantitativamente a matraz aforado de 50 mL y enrasar con agua destilada. De esta solución concentrada de ácido gálico tomar alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 mL y diluirlas a 100 mL. Estas diluciones corresponden a las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 70 y 100 mg/L de ácido gálico. El contenido de fenoles totales se expresó en mg de ácido gálico/L de extracto.

Tabla IV Curva de calibración de ácido gálico utilizando como patrón

Concentración de ácido gálico (mg/ml)	Absorbancias
10	0,01
20	0,038
30	0,07
40	0,109
50	0,17
70	0,23
100	0,375

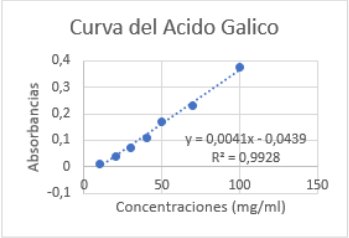


Gráfico 1 Curva de calibración de ácido gálico utilizando como patrón

Técnica

En matraces aforados de 50 ml de capacidad se adicionaron 200 µL de extracto de la muestra o de la solución diluida de ácido gálico, 10 mL de solución diluida de Folin-Ciocalteu, 1,8 mL de agua destilada; se agitara y dejar reposar por cinco minutos, pasado de ese tiempo adicionar 8 mL de solución 7,5 % de Na_2CO_3 y homogenizar nuevamente, dejar en reposo durante dos horas y leer la absorbancia a 765 nm. El blanco es agua destilada.

Figura 16 Protocolo de Determinación de Fenoles totales

Anexo D Obtención de los extractos

Extracto alcohólico de quínoa comercial y quínoa con cáscara (*Chenopodium quínoa*).

Se pesó 25 g del grano de quínoa pulverizado, se agregó 100 ml de alcohol absoluto hasta cubrir completamente el material vegetal, se agitó y se tapó. Se dejó reposar por un período de 24 horas. Transcurrido este tiempo se filtra el producto y se almacenó el extracto

Extracto acuoso de quínoa comercial y quínoa con cáscara (*Chenopodium quínoa*).

Se trabajó con 25 g de muestra, pulverizada, se agregó 100 ml agua destilada en un recipiente limpio y seco, se dejó macerar por 24 horas y luego se filtró (Suscal & Vite, 2018).

Maceración acuosa de las hojas de insulina (Justicia secunda *Vahl)*

Se pesó 40 g del polvo de las hojas secas, después se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se agregó 250 ml de agua destilada. Se dejó reposar por 48 horas en refrigeración, posteriormente se procedió a filtrar el extracto. El filtrado obtenido se conservó en un recipiente de vidrio con tapa rosca a 4°C (Chicaiza G, 2014).

III.8.1 Extracto etanoico de las hojas de insulina (*Justicia secunda* Vahl)

Se pesó en balanza analítica 40 g de las hojas pulverizadas de *Justicia secunda* Valh luego se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se adicionó 150 ml de etanol al 96%. Luego de 48 horas, se filtró y se conservó en un recipiente de vidrio en refrigeración.

Figura 17 Protocolo de Obtención de los extractos