



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E
INDUSTRIAS**

CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

**EFEECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 3-METIL-2-
PENTAFLUOROETILCROMONA**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA DE ALIMENTOS**

BARBARA BERENICE ACOSTA MEZA

DIRECTOR: DR. ALCÍVAR LEÓN CHRISTIAN DAVID

Quito, abril, 2018

© Universidad Tecnológica Equinoccial. 2018
Reservados todos los derechos de reproducción

DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1726923327
APELLIDO Y NOMBRES:	Acosta Meza Barbara Berenice
DIRECCIÓN:	N8 Manabí OE3-88 DP 4 OE4 Venezuela Edif. Ayala
EMAIL:	bbam-bere@hotmail.com
TELÉFONO FIJO:	02 315 1962
TELÉFONO MOVIL:	0996012025

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 3-METIL-2-PENTAFLUOROETILCROMONA
AUTORA:	Acosta Meza Barbara Berenice
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	1 de Abril del 2018
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Dr. Christian Alcivar
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	INGENIERA DE ALIMENTOS
RESUMEN:	<p>El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano y efectos aleloquímicos de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona gracias a la evaluación del potencial antimicrobiano <i>in vitro</i> de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona sobre <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Pseudomonas spp</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>. Además se evaluó las propiedades aleloquímicas (herbidas) de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona en semillas de quínoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd) y semillas de malezas de quínoa; Holco (<i>Holcus lanatus</i>) y Falsa quínoa (<i>Chenopodium álbum</i>).</p> <p>En el caso de la germinación se determinó los efectos aleloquímicos del compuesto (A) de las semillas de falsa quínoa (<i>C. album</i>) y holco (<i>H. lanatus</i>), y semillas de quínoa (<i>C.</i></p>

quinoa), esto gracias a que se midió la radícula de cada semilla y se determinó el porcentaje de germinación. Se utilizaron, soluciones de 2.209 mM, 1045 mM, 0.5522 mM y 0.02209 mM frente a un blanco.

Para determinar la actividad antimicrobiana se midió la longitud del halo de inhibición, utilizando como estándar gentamicina (10µg/ml) y tres niveles de concentración, 10 µg/ml, 0.33 µg/ml y 0.166 µg/ml en los tres compuestos.

Como resultado de la germinación se observó que los niveles de concentración utilizados no presentan un efecto de inhibición considerable. Asimismo, se observó una influencia similar del compuesto A, en el % de germinación y crecimiento radicular (mm) de falsa quinua y holco, resultando estadísticamente iguales.

El halo de inhibición de **B** con una concentración de 0.16 µg/ml, comparado con el estándar gentamicina (10 µg/ml) presentó un efecto antimicrobiano en dos de las cinco bacterias analizadas. A una concentración aproximadamente 60 veces inferior se observó un efecto antimicrobiano en las bacterias *E. coli* y *Salmonella spp*, que generalmente causan contaminación por contacto en alimentos.

PALABRAS CLAVES:

Cromonas, haloalquilcromonas, alelopatía, antibiograma.

ABSTRACT:

The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial effect and allelochemical effects of 3-methyl-2-pentafluoroethylchromone thanks to the evaluation of the in vitro antimicrobial potential of 3-methyl-2-pentafluoroethylchromone on *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp and *Staphylococcus aureus*. In addition, the allelochemical properties (herbicides) of 3-methyl-2-pentafluoroethylchromone in quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd) and quinoa weed seeds were evaluated; *Holco* (*Holcus lanatus*) and *Falsa quínua* (*Chenopodium album*).

In the case of germination, the allelochemical effects of the compound (A) of the seeds of false quinoa (*C. album*) and *holco* (*H. lanatus*), and seeds of quinoa (*C. quinoa*) were determined, this thanks to the fact that measured the radicle of each seed and determined the percentage of germination. Solutions of 2,209 mM, 1045 mM, 0.5522 mM and 0.02209 mM were used against a blank.

To determine the antimicrobial activity, the length of the inhibition halo was measured, using as a standard gentamicin (10 µg / ml) and three concentration levels, 10 µg / ml, 0.33 µg / ml and 0.166 µg / ml in the three compounds.

As a result of the germination, it was observed that the concentration levels used do not show a considerable

	<p>inhibition effect. Likewise, a similar influence of compound A was observed, in the% of germination and root growth (mm) of false quinoa and holco, being statistically equal.</p> <p>The halo inhibition of B with a concentration of 0.16 $\mu\text{g} / \text{ml}$, compared to the standard gentamicin (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) showed an antimicrobial effect in two of the five bacteria analyzed. At an approximately 60-fold lower concentration an antimicrobial effect was observed in E. coli and Salmonella spp. Bacteria, which generally cause contamination by contact in food.</p>
KEYWORDS	Chromones, haloalkylchromones, allelopathy, antibiogram.

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.



ACOSTA MEZA BARBARA BERENICE
172692332-7

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **ACOSTA MEZA BARBARA BERENICE**, CI 1726923327 autora del proyecto titulado: **Efecto Antimicrobiano y Aleloquímico de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona** previo a la obtención del título de **INGENIERA DE ALIMENTOS** en la Universidad Tecnológica Equinoccial.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad Tecnológica Equinoccial a tener una copia del referido trabajo de graduación con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, 4 de abril del 2018



ACOSTA MEZA BARBARA BERENICE
172692332-7

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **PABLO XAVIER ATAPUMA ACUÑA** con cédula de identidad N. 1717606287 en calidad de Responsable Técnico de Laboratorio de Semillas de Agrocalidad en Tumbaco autorizo a **BARBARA BERENICE ACOSTA MEZA**, realizar la investigación para la elaboración de su proyecto de titulación “**Efecto Antimicrobiano y Aleloquímico de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona**”, basada en la información proporcionada por la compañía.



ATAPUMA ACUÑA PABLO XAVIER
1717606287

DECLARACIÓN

Yo **ACOSTA MEZA BARBARA BERENICE**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Tecnológica Equinoccial puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.



BARBARA BERENICE ACOSTA MEZA
C.I. 172692332-7

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título “**EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 3-METIL-2-PENTAFLUOROETILCROMONA**”, que, para aspirar al título de **INGENIERA DE ALIMENTOS** fue desarrollado por **BARBARA BERENICE ACOSTA MEZA**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 19, 27 y 28.

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Christian Alcivar', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a horizontal line underneath it.

Dr. Christian Alcívar

DIRECTOR DEL TRABAJO

C.I. 171500842

DEDICATORIA

Dedico esta pequeña parte de mis metas a mi Dios y a la Virgencita en primer lugar. Me han dado toda la fuerza y sabiduría que no se ve pero la siente el corazón.

Quiero dedicar este logro además a mis dos madres, una que se convirtió en ángel en forma prematura y es que no puedes estar aquí compartiendo mi felicidad “mi Marianita” y la otra que me dio la vida y supo de forma acertada convertirme en una buena persona “Tanya”. Las amo.

Y pues me dedico este logro, como si fuera la mejor canción o como si fuera el mejor momento que uno consigue sin darse cuenta.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por darme siempre un vestigio de luz, lo que simbolizaba el camino correcto.

A mi Marianita bella, te amo y te extraño tanto, gracias por enseñarme que un abrazo te concilia el alma y una palabra tuya era como la mejor de las frases aún si no querías decir nada en concreto.

A mis padres Tanya y Edwin por apoyar en varios aspectos mis sueños de cambiar en forma positiva mi vida. En especial a ti madre mía por aceptarme como soy.

A mis hermanos Estefanía y René, cómplices de aventuras que nos obligamos a vivir sin querer o sin saber, pero que nos han hecho más fuertes, los amo, son la vida mía.

A mis tías, Lupita, Govita, Indirita y a mi prima Tamy.

A la Ing. Geovanna Martínez porque gracias a su apoyo pude continuar con mis estudios.

A mi tutor Christian Alcívar, por haberme tomado en cuenta para este proyecto y por todo ese apoyo y preocupación. Además a la Ing. Betty Hernández por su conocimiento y tiempo.

Finalmente a mis amigos, los que han estado toda la vida, Félix, Nathy, Kelly y Gia. Los que conocí en mi desarrollo universitario y laboral, Ramiro, Santi, Silvita, Verónica, Mari, a mi compañera de aventuras Sandy. A mi mejor amiga y cómplice Andrea. Gracias por cada consejo, palabra de aliento y risas. Siempre estarán en mi corazón.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. METODOLOGÍA	11
2.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE 3-METIL-2-PENTAFLUOROETILCROMONA	11
2.1.1 PREPARACIÓN DE CONCENTRACIONES MOLARES DEL COMPUESTO (A)	11
2.1.2 SOLUBILIDAD	11
2.2 ENSAYOS PREVIOS AL ANTIBIOGRAMA	11
2.2.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS	11
2.2.2 RESIEMBRA DE LAS CEPAS PURAS	11
2.3 GERMINACIÓN	12
2.4 ANTIBIOGRAMA	12
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1 GERMINACIÓN	15
3.1.1 RESULTADO DE CRECIMIENTO RADICULAR (mm)	15
3.1.2 RESULTADO DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN	16
3.2 ANTIBIOGRAMA	17
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	21
4.1 CONCLUSIONES	21
4.2 RECOMENDACIONES	22
5. BIBLIOGRAFÍA	24
6. ANEXOS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Resultado del crecimiento radicular de quinua, falsa quinua y holco en cuatro concentraciones y un blanco. El análisis estadístico muestra un valor de ($p > 0.05$), Tukey= 0.3055 en la interacción	15
Figura 2. Resultado del porcentaje (%) de germinación de quinua, falsa quinua y holco en cuatro concentraciones y un blanco. El análisis estadístico muestra un valor de ($p < 0.05$), Tukey= 0.1021 para la interacción	16
Figura 3. Resultado de antibiograma gentamicina versus 1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea	17

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS A, B Y C, ESTUDIADAS EN LA PRESENTE TESIS (Alcívar, et al. 2015)	29
ANEXO II. EJEMPLO DE MOLÉCULAS QUE PRESENTA ÁTOMOS DE FLÚOR EN SU ESTRUCTURA Y SUS ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS (Alcívar, et al. 2015)	30
ANEXO III. RESULTADO DEL EFECTO DE INHIBICIÓN DEL COMPUESTO B EN <i>Escherichia coli</i>	31
ANEXO IV. RESULTADO DEL EFECTO DE INHIBICIÓN DEL COMPUESTO B EN <i>Salmonella spp</i>	32
ANEXO V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE GERMINACIÓN EN LAS SEMILLAS DE QUINUA, FALSA QUINUA Y HOLCO	33
ANEXO VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE CRECIMIENTO RADICULAR EN LAS SEMILLAS DE QUINUA, FALSA QUINUA Y HOLCO	37
ANEXO VII. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA PRODUCCIÓN DE QUINUA EN AMÉRICA LATINA	42
ANEXO VIII. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE FALSA QUINUA (<i>Chenopodium album</i> L.)	43
ANEXO IX. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE HOLCO (<i>Holcus lanatus</i>)	44
ANEXO X. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE QUINUA (<i>Chenopodium quinoa willd</i>)	45

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano y efectos aleloquímicos de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona gracias a la evaluación del potencial antimicrobiano *in vitro* de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona sobre *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp* y *Staphylococcus aureus*. Además se evaluó las propiedades aleloquímicas (herbicidas) de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona en semillas de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd) y semillas de malezas de quínoa; Holco (*Holcus lanatus*) y Falsa quínoa (*Chenopodium álbum*).

En el caso de la germinación se determinó los efectos aleloquímicos del compuesto (A) de las semillas de falsa quínoa (*C. album*) y holco (*H. lanatus*), y semillas de quínoa (*C. quinoa*), esto gracias a que se midió la radícula de cada semilla y se determinó el porcentaje de germinación. Se utilizaron, soluciones de 2.209 mM, 1045 mM, 0.5522 mM y 0.02209 mM frente a un blanco.

Para determinar la actividad antimicrobiana se midió la longitud del halo de inhibición, utilizando como estándar gentamicina (10µg/ml) y tres niveles de concentración, 10 µg/ml, 0.33 µg/ml y 0.166 µg/ml en los tres compuestos.

Como resultado de la germinación se observó que los niveles de concentración utilizados no presentan un efecto de inhibición considerable. Asimismo, se observó una influencia similar del compuesto A, en el % de germinación y crecimiento radicular (mm) de falsa quínoa y holco, resultando estadísticamente iguales.

El halo de inhibición de **B** con una concentración de 0.16 µg/ml, comparado con el estándar gentamicina (10 µg/ml) presentó un efecto antimicrobiano en dos de las cinco bacterias analizadas. A una concentración aproximadamente 60 veces inferior se observó un efecto antimicrobiano en las bacterias *E. coli* y *Salmonella spp*, que generalmente causan contaminación por contacto en alimentos.

Palabras claves: Cromonas, haloalquilcromonas, alelopatía, antibiograma.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial effect and allelochemical effects of 3-methyl-2-pentafluoroethylchromone thanks to the evaluation of the *in vitro* antimicrobial potential of 3-methyl-2-pentafluoroethylchromone on *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp and *Staphylococcus aureus*. In addition, the allelochemical properties (herbicides) of 3-methyl-2-pentafluoroethylchromone in quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd) and quinoa weed seeds were evaluated; Holco (*Holcus lanatus*) and Falsa quínea (*Chenopodium album*).

In the case of germination, the allelochemical effects of the compound (A) of the seeds of false quinoa (*C. album*) and holco (*H. lanatus*), and seeds of quinoa (*C. quinoa*) were determined, this thanks to the fact that measured the radicle of each seed and determined the percentage of germination. Solutions of 2,209 mM, 1045 mM, 0.5522 mM and 0.02209 mM were used against a blank.

To determine the antimicrobial activity, the length of the inhibition halo was measured, using as a standard gentamicin (10 µg / ml) and three concentration levels, 10 µg / ml, 0.33 µg / ml and 0.166 µg / ml in the three compounds.

As a result of the germination, it was observed that the concentration levels used do not show a considerable inhibition effect. Likewise, a similar influence of compound A was observed, in the % of germination and root growth (mm) of false quinoa and holco, being statistically equal.

The halo inhibition of B with a concentration of 0.16 µg / ml, compared to the standard gentamicin (10 µg / ml) showed an antimicrobial effect in two of the five bacteria analyzed. At an approximately 60-fold lower concentration an antimicrobial effect was observed in *E. coli* and *Salmonella* spp. Bacteria, which generally cause contamination by contact in food.

Keywords: Chromones, haloalkylchromones, allelopathy, antibiogram.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La quinua forma parte de la historia cultural de Ecuador desde la época aborigen, pueblos originarios como los cañaris los utilizaban en su dieta diaria resultando inclusive un alimento importante para los colonizadores que a finales del siglo XVI, la seguían consumiendo. Asimismo, registros de esta época (1605) mencionan que los indígenas ambateños tenían como su principal actividad el labrado de tierra en donde cosechaban productos andinos como el maíz, frijoles y quinua (Peralta, 2009).

En cuanto, a la producción de quinua en Ecuador, se siembra y cosecha en zonas andinas, como las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo y Loja. Además, especies de grano chico y también amargo son cosechadas en Latacunga, Ambato, Riobamba y Cuenca (Peralta, 2009).

Respecto a las características nutricionales, la quinua es un pseudocereal con un valor proteico elevado entre un 14 y 20 % comparable incluso con proteínas de origen animal, superando a la soya y el chocho ampliamente consumidos en la dieta de la zona andina del país. Asimismo, la quinua presenta cantidades importantes de minerales como el calcio, hierro y fósforo. Inclusive, aprovechando las hojas que son consumidas en algunos países como verduras (Peralta, 1985).

La quinua es capaz de adaptarse a diferentes pisos agroecológicos, climas desérticos, calurosos y secos, su crecimiento puede darse en humedades relativas de 40 a 88 % y además soporta temperaturas desde -4 °C hasta 38 °C. Se considera una planta eficiente ya que optimiza el uso del agua, siendo resistente a la falta de humedad del suelo (Bojanic, 2011).

Ecuador es considerado como uno de los pioneros en producción y exportación de quinua. En 2009 la producción de este cereal se capitalizaba por Perú y Bolivia con 78.000 t producidas y un aporte de 746 t de Ecuador para consumo interno y exportación generando un ingreso de \$ 557mil para el país. El Anexo 6 muestra la distribución de quinua en América Latina (Bohórquez et al., 2009).

La demanda de este cereal en Ecuador incrementó en recientes años, debido a que se implementó el Programa Mundial de Alimentos de las Naciones Unidas incluyendo a la quinua como parte de la dieta escolar (Jacobsen & Sherwood, 2002).

Por otra parte, cualquier tipo de cultivos indeseables, generalmente llamadas malezas disminuyen la producción. En el caso de la quinua, malezas como

Holco y Falsa quinua disminuyen el nivel de producción de cultivos de quinua hasta en un 10 %. La presencia de estas especies indeseadas no resulta favorable en el desarrollo de la planta, donde la competencia afecta principalmente el correcto desarrollo radicular (Hernández, 2015).

Así como existen microorganismos responsables del cambio deseado de un alimento como microorganismos fermentadores, existen aquellos que son responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Las ETA se producen por la ingesta de alimentos o bebidas contaminados con microorganismos, entre las bacterias comúnmente conocidas encontramos a especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como cepas de O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli* (Flores & Herrera, 2005).

En la actualidad una gran variedad de sustancias naturales o moléculas obtenidas por síntesis, son investigadas para ser utilizadas como potenciales moléculas con efecto antimicrobiano. De estas, una pequeña cantidad de moléculas con potencial actividad biológica, llega a la fase de desarrollo y se convierte en un fármaco que será utilizado para tratar una enfermedad. Por otra parte, existen algunos tipos de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus suis*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* entre otros, que muestran cierta resistencia a sustancias de desinfección comúnmente usadas como el hipoclorito de sodio (NaOCl) empleado como antiséptico frente a ciertos microorganismos (Carballo Guerra et al., 2002). Las características de resistencia a los desinfectantes transcurre por la formación de biopelículas, que vuelven a los microorganismos difíciles de erradicar (Vanegas et al., 2009).

Particularmente, el área de producción de alimentos adolece del efecto de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Estas bacterias revisten importancia debido a su patogenicidad, y además resultan tolerantes o resistentes a sustancias de desinfección con moléculas bioactivas (Basile et al., 2000).

La resistencia de algunas bacterias se ha convertido en un problema de salud pública, debido a que, desde el descubrimiento de los primeros antibióticos, algunos microorganismos han sido capaces de evadir su acción. Un ejemplo de bacteria que muestra evolución en su resistencia a través de los años es *Staphylococcus aureus*, que en 1946 presentaba la mayoría de sus cepas sensibles a la penicilina. Sin embargo, en la actualidad casi todas las cepas hospitalarias presentan resistencia a antibióticos de amplio espectro como la bencilpenicilina, meticilina, gentamicina o vancomicina (Cabrera, et al. 2007).

Por otra parte, el uso no controlado de sustancias como antibióticos en la agricultura y acuicultura ha ocasionado que restos de estas sustancias estén presentes en la carne de los animales y plantas, exponiendo a los consumidores a un contacto residual con diversos fármacos, lo cual incrementa la probabilidad de resistencia de las bacterias. La resistencia que presentan ciertas bacterias puede deberse a algunas variables como son las propiedades naturales de un organismo (intrínseca), propiedad por mutación o adquisición de plásmidos (autorreplicación ADN extracromosómico), o también propiedad de transposones (cromosomal o integrado en plásmidos, ADN transmisibles o secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula) (Cabrera, et al. 2007).

El método que se utiliza para reconocer la sensibilidad bacteriana ante antibióticos es el antibiograma, técnica que consisten en depositar en la superficie de agar de una placa Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos (Picazo, 2000).

El antibiograma tiene como parte de su proceso el uso de un estándar de McFarland, que es una suspensión de sulfato de bario que permiten comparar la turbidez bacteriana (densidad) de manera visual. El estándar de McFarland es equivalente a una suspensión bacteriana que contiene entre 1×10^8 y 2×10^8 UFC/ml de *E. coli* (Hudzicki, 2009).

Las plantas han co-evolucionado exponiéndose a factores bióticos y abióticos que a lo largo de los años han generado una presión de selección evolutiva provocando un correcto desarrollo de vegetación y cumpliendo procesos de síntesis que acumularon una variedad de metabolitos secundarios responsables de las interacciones complejas entre organismos vivos. Entre estos metabolitos secundarios existen sustancias producidas por las plantas, que se consideran compuestos aleloquímicos (Sampietro, 2001).

Sampietro (2001), define a la alelopatía como “los efectos perjudiciales o benéficos que son directa o indirectamente el resultado de la acción de compuestos químicos que, liberados por una planta, ejercen su acción en otra”.

Las cromonas son compuestos heterocíclicos oxigenados y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza específicamente en plantas. El núcleo estructural es un bicíclico formado por un anillo benceno y 4-pirano. El mismo, presenta características estructurales relevantes en el andamiaje y descubrimiento de fármacos, agroquímicos o como precursores de nuevos

materiales (Alcívar, et al. 2015). El Anexo 1, muestra el núcleo cromona numerado y las nuevas estructuras estudiadas en la presente tesis.

Las nuevas moléculas estudiadas, 3-metil-2-pentafluoroetilcromona (A), 1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea (B) y 1.1-bis-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil urea (C), presentan grupos pentafluoroetil [$-\text{CF}_2\text{CF}_3$], tiourea [$\text{R-NHC(S)NHR}'$] y urea [$\text{R-N(R}')C(O)NH}_2$] como sustituyentes distintivos en el anillo cromona, respectivamente (Alcívar, et al. 2015).

Estos nuevos compuestos se caracterizaron y estudiaron completamente, por técnicas de Espectroscopia electrónica UV-Visible, Espectroscopia infrarroja y Raman, Espectroscopia de masas, Espectroscopia de resonancia magnética nuclear y Difracción de rayos X (Alcívar, et al. 2015).

Como característica distintiva, los compuestos **A**, **B** y **C** presentan como sustituto del anillo cromona átomos de fluor. Las características que brindan los átomos de flúor, como la alta electronegatividad y el pequeño tamaño del flúor, así como su reactividad química muy diferente con respecto al hidrógeno, le confieren mejores propiedades farmacocinéticas y de liposolubilidad, que son valoradas por la industria farmacéutica y que mejoran variadas propiedades biológicas (Martínez, s.f). El Anexo 1, ilustra algunas moléculas con sustituyentes trifluorometilo y átomos de fluor y sus propiedades farmacológicas.

Investigaciones que han aportado el desarrollo de este estudio muestran los efectos de alelopatía por el uso de extractos de especies de leguminosas haba (*Vicia faba* L.) y calliandra (*Calliandra carbonaria*), en semillas de dos malezas, *Chenopodium album* L. (falsa quinua) y *Holcus lanatus* L. (Holco) y en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), este efecto varía dependiendo del órgano vegetativo de la planta del que se obtuvo el extracto y del tipo de semilla en los que se probaron los extractos (Hernández, 2015).

El mezquite (*Prosopis juliflora*) es una planta abundante en muchas regiones áridas de América y con frecuencia constituyen el único elemento arbóreo de vegetación, su extracto fue usado para el estudio de efectos alelopáticos dejando como resultado la afectación de la germinación de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), suponiendo que no es una buena alternativa en este escenario, por otro lado es una buena alternativa para acelerar germinación de maíz (*Zea mays*) sin dañar su calidad, llegando a obtener plantas más vigorosas (Vargas, 2013).

Cazón y colaboradores en 2002 realizaron la comparación del efecto fitotóxico de aleloquímicos de *Baccharis boliviensis* (Asteraceae) en la germinación de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae), dando como resultado que el efecto

inhibidor solo se presentó en el extracto clorofórmico, lo que puede deberse a un efecto sinérgico de los compuestos contenidos en este extracto. Este estudio concluyó en que el ácido ferrúlico es aquel que posee el efecto inhibidor y además los autores sugieren que estos compuestos podrían ser desarrollados como herbicidas naturales o bien como estimulantes del crecimiento.

Las quinolonas constituyen un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo, contiene un residuo N en la posición uno y actúan inhibiendo el ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico que asegura una adecuada división celular. Diferentes sustituciones, abarcando la inclusión de residuos de fluor, han derivado desde el Ácido Nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas o de "segunda generación" (Quintana, 2013).

Campylobacter spp es una bacteria capaz de causar diarreas en el hombre. La infección en el hombre se produce principalmente a través de alimentos, sobre todo de pollos. En Holanda se observó entre 1982 y 1989 un incremento notable de la resistencia a fluoroquinolonas en estas bacterias tanto aisladas de pollos (de 0 a 14 %) como de humanos (de 0 a 11 %). Aunque es difícil demostrar la transferencia de bacterias resistentes a antimicrobianos desde los animales al hombre, el amplio uso de fluoroquinolonas en pollos (utilizadas en el agua de forma profiláctica) y la casi exclusiva ruta de transmisión de *Campylobacter spp* de pollos al hombre sugiere que dicha resistencia es debida al uso de enrofloxacin en los pollos (Orden, 2001).

Algunas estirpes de *E. coli* son capaces de producir enfermedades en el hombre. Dentro de ellas se encuentran los *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) los cuales producen unas citotoxinas denominadas verotoxinas y se aíslan de diversas especies animales sobre todo de rumiantes. Dentro de estos ECVT hay que destacar sobre todo a *E. coli* O157, el cual ha originado graves brotes en todo el mundo. Además, los *E. coli* enteropatogénicos (ECEP) son capaces de producir diarreas en el hombre y se aíslan también de diversas especies animales. Hasta la fecha se ha investigado la resistencia a quinolonas sobre todo en *E. coli* O157 y muy poco en otros ECVT o en los ECEP y, que sepamos, no se ha encontrado ninguna cepa de *E. coli* O157 resistente a fluoroquinolonas (Orden, 2001).

Por lo tanto la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano y aleloquímico de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona. Para cumplir con el objetivo principal se han establecido los siguientes objetivos específicos:

Evaluar el efecto inhibitorio en la germinación y crecimiento de la radícula utilizando 3-metil-2-pentafluoroetilcromona (**A**) en semillas de quinua, holco (maleza) y falsa quinua (maleza). Con la finalidad de contribuir al control de

malezas y mejorar la producción de cultivos alimenticios andinos como la quinua.

Evaluar el potencial antimicrobiano in vitro de tres nuevas moléculas 3-metil-2-pentafluoroetilcromona (**A**), 1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea (**B**), 1.1-bis- (2-trifluorometilcromon-3-il) metil urea (**C**) en microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

2. METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE 3-METIL-2-PENTAFLUOROETILCROMONA

2.1.1 PREPARACIÓN DE CONCENTRACIONES MOLARES DEL COMPUESTO (A)

Se pesó 0.0154 g de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona (**A**) en un balón volumétrico de 100 ml y se aforó con metanol. La concentración obtenida fue de 2.209 mM (100 %). A partir, de esta solución patrón, se diluyó hasta conseguir tres concentraciones de 1.1045 mM (50 %), 0.5522 mM (25 %) y 0.02209 mM (1 %). Asimismo, se preparó un blanco de metanol.

2.1.2 SOLUBILIDAD

Se solubilizó previo al antibiograma, los compuestos 1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea (**B**) y 1.1-bis- (2-trifluorometilcromon-3-il) metil urea (**C**), utilizando DMSO como disolvente, se pesó en un balón de 10 ml cantidades de 16 µg y 12 µg, respectivamente. Se utilizó discos de gentamicina (10 µg/ml) como estándar.

2.2 ENSAYOS PREVIOS AL ANTIBIOGRAMA

2.2.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS

La preparación de medios se la realizó en un mismo día. Se preparó 200 ml caldo nutritivo que fueron dispensados en 10 tubos de 20 ml. Luego 300 ml de solución salina al 9 % con cloruro de sodio puro que fueron vertidos en 15 tubos, 200 ml de agar standard se agregaron en 10 cajas Petri. Finalmente 500 ml de agar Mueller Hinton fueron dosificadas en 30 cajas Petri.

2.2.2 RESIEMBRA DE LAS CEPAS PURAS

Se tuvieron cinco cepas en estado puro, se procedió a hacer una resiembra. Se desinfectó el área de laboratorio a usar. Se esterilizó estas utilizando la flama de un mechero de Bunsen. Se inoculó la cepa pura de cada bacteria y se sembró por depósito en 15 ml de caldo nutritivo. Se dejó incubar a 37 °C.

2.3 GERMINACIÓN

Las soluciones de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona en concentración 1.1045 mM, 0.5522 mM y 0.02209 mM, fueron dosificadas en cajas Petri que contenían un disco de papel filtro del mismo diámetro interno. Se dejó evaporar el metanol en una cámara de flujo laminar. Este procedimiento busca impregnar de manera homogénea dosis de diferente concentración del compuesto (**A**) en el papel filtro. En cada caja Petri se agregó 20 semillas de falsa quinua (*C. album*) y Holco (*H. lanatus*), y semillas de quinua (*C. quinoa*). Se utilizaron, soluciones de 2.209 mM, 1.045 mM, 0.5522 mM y 0.02209 mM. Se agregó 2.5 ml de agua destilada en cada caja Petri y se introdujeron las cajas en una germinadora a 25 °C y 70-80 % de humedad relativa por 7 días las semillas de quinua y 14 días sus malezas, de esta manera se logró determinar el porcentaje de germinación de las tres especies de semillas y el crecimiento radicular.

La cámara germinadora marca LabTech Modelo LGC -5201 posee las siguientes características, dimensiones internas: 600 mm x 600 mm x 1200 mm, dimensiones externas: 825 mm x 940 mm x 1965 mm, capacidad: 432 litros posee un rango de temperatura 0 °C a 60 °C, Humedad: Rango 30 % a 98 % de HR y un sistema de evaporación por ventilador. Este equipo da condiciones ideales para el proceso de germinación de semillas. Gracias a este proceso se logró determinar el porcentaje de germinación de las tres especies de semillas y el crecimiento radicular

2.4 ANTIBIOGRAMA

Para identificar el efecto de 3-metil-2-pentafluoroetilcromona en *Listeria monocytogenes* (cepa identificada y donada por el Instituto Nacional de Investigación de Salud Pública (INSPI) y la Universidad San Francisco de Quito), *Escherichia coli* (25922), *Pseudomonas spp* (27853), *Staphylococcus aureus* (292103) y *Salmonella spp* (14028) se emplearon las técnicas descritas en el Protocolo de Prueba para la Difusión de Susceptibilidad de Disco basado en el método Kirby-Bauer según Cona en 2002, en donde se comprobó la sensibilidad bacteriana de estas cepas mediante el depósito en la superficie de agar de una placa Petri con agar Mueller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con el compuesto B y C. Se realizó un triplicado de cada cepa inoculada versus gentamicina. Se incubó a 37 °C por 24 horas a excepción de *Listeria monocytogenes* que por ser psicrófila se incubó a 25 °C por 24 horas.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tomando en cuenta las dos variables independientes, concentración y especie de semilla, se escogió un diseño a x b que permitió el análisis de los factores % de germinación y crecimiento radicular (mm), aplicando la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95% gracias al programa Statgraphics.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 GERMINACIÓN

3.1.1 RESULTADO DE CRECIMIENTO RADICULAR (mm)

La Figura 1 muestra el resultado de crecimiento radicular (mm) de las semillas de quinua, falsa quinua y holco. Asimismo las cuatro concentraciones estudiadas y el blanco.

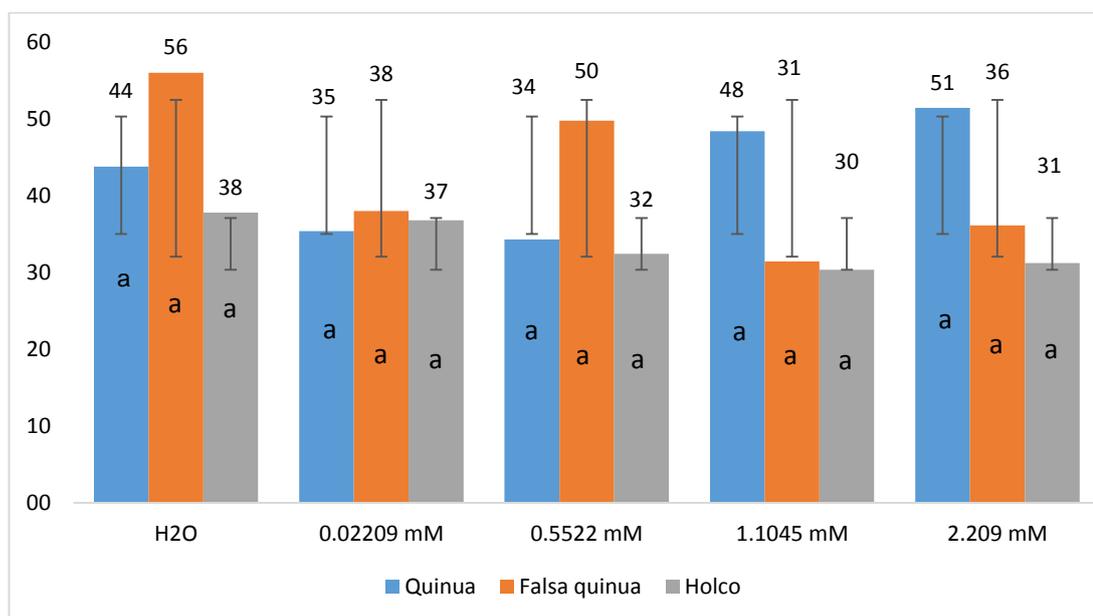


Figura 1. Resultado del crecimiento radicular de quinua, falsa quinua y holco en cuatro concentraciones y un blanco. El análisis estadístico muestra un valor de ($p > 0.05$), Tukey= 0.3055 en la interacción.

El Anexo 5 y 6 muestran el análisis estadístico con respecto al crecimiento radicular y porcentaje de germinación en donde se demuestra que no existe diferencia significativa entre la especie de semilla y las concentraciones aplicadas.

El compuesto **A** (3-metil-2-pentafluoroetilcromona), utilizado para estudiar el efecto aleloquímico presenta el núcleo estructural cromona, y una porción aromática que se encuentra presente en una gran cantidad de agentes alelopáticos, siendo representativos, los fenoles, derivados del ácido benzoico, derivados del ácido cinámico, quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos, la germinación de la quinua podría no presentar efectos ante esta estructura debido a que se diluyó previamente con un compuesto orgánico de características volátiles como es el metanol (Guerra, 2014).

El efecto en el crecimiento según Guerra y colaboradores (2014) se debe a un mecanismo secundario del modo de acción de los inhibidores alelopáticos, que tienen relación directa con la interferencia en el crecimiento y germinación de las plantas. Estos modos o mecanismos de acción de dichos compuestos químicos están involucrados por ejemplo con el caso de uno de los grupos importantes de herbicidas, las acetanilidas, que actúan directamente en la síntesis de proteínas de las especies susceptibles a este fenómeno, entonces podríamos decir que el compuesto **A** no posee estos mecanismos de acción inhibitoria (Zamorano, 2006).

3.1.2 RESULTADO DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

La Figura 2, corresponde al resultado del porcentaje (%) de germinación de las semillas de quinua, falsa quinua y holco aplicadas las cuatro concentraciones a estudiar, comparadas con un blanco.

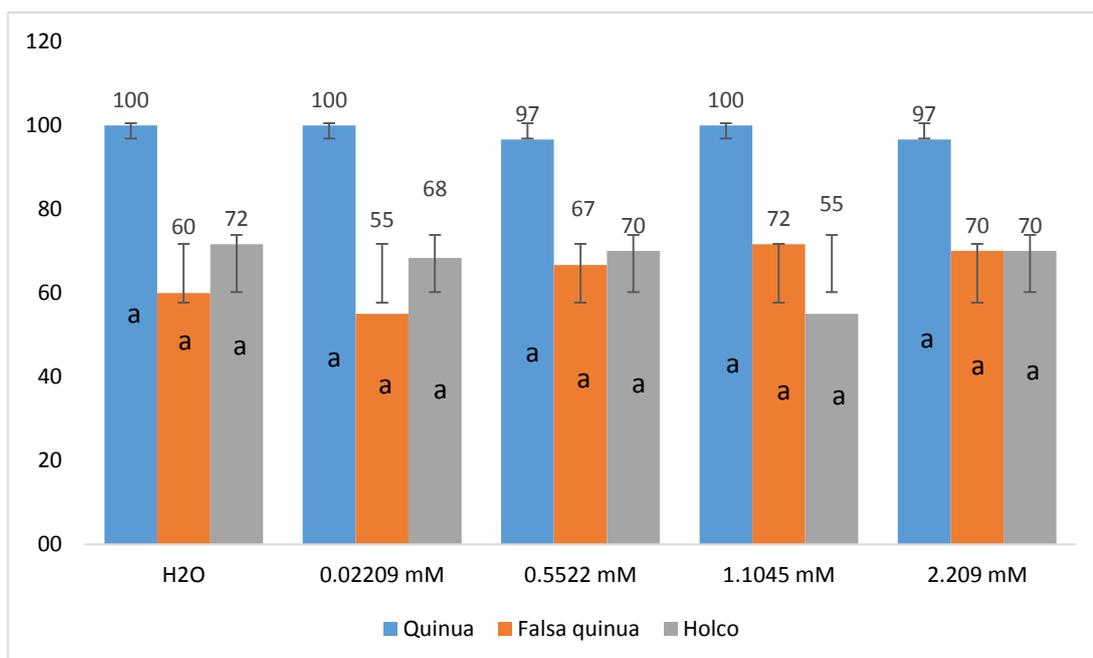


Figura 2. Resultado del porcentaje (%) de germinación de quinua, falsa quinua y holco en cuatro concentraciones y un blanco. El análisis estadístico muestra un valor de ($p < 0.05$), Tukey= 0.1021 para la interacción.

El compuesto **A** no tuvo un importante efecto sobre el porcentaje de germinación de la quinua y sus malezas, y esto posiblemente se debería a que el compuesto posee un alto peso molecular y gracias a que no se encuentra de forma natural en el sistema de estas plantas, no presenta un efecto en el ritmo de biosíntesis, almacenamiento y degradación de los tejidos de la quinua y sus malezas (Sampietro, 2001).

Los efectos de germinación con respecto al blanco reflejan que el compuesto no interviene en el correcto desarrollo de estas semillas. No se puede descartar que el método utilizado sea efectivo para este ensayo, ya que el compuesto podría haber perdido las características de inhibición que poseen los alcoholes fenólicos considerados como fuertes inhibidores de los procesos enzimáticos en la naturaleza de las plantas, en el momento de la evaporación con metanol en placas (Montes-Belmont, 2009).

Cabe recalcar la diferencia entre germinación y crecimiento radicular en plantas, en donde se entiende que una semilla germinada es aquella cuya raíz se ha desarrollado, es decir, desde el brote de la radícula, mientras que el crecimiento depende del aumento gradual del tamaño, en este estudio la germinación de las tres especies de semillas fue exitosa, con una ventaja muy clara de la quinua respecto a sus competidoras gracias a sus características de viabilidad física y esto podría deberse a la correcta recolección de las semillas realizada en el INIAP (Cardona & Salazar, 2012).

3.2 ANTIBIOGRAMA

Esta investigación mostró que no existe efecto antimicrobiano de los compuestos **A** y **C** en ninguna de las bacterias estudiadas. *Pseudomona spp* resultó resistente al compuesto **A**, **B** y **C** en las tres concentraciones estudiadas, al igual que *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Solamente, el compuesto **B** mostró actividad antimicrobiana, en contra de *E. coli* y *Salmonella spp*.

La Figura 3, muestra la distancia (mm) de halo de inhibición de 1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea (**B**) a una concentración de 0.16 µg/ml, comparado con el estándar gentamicina (10 µg/ml).

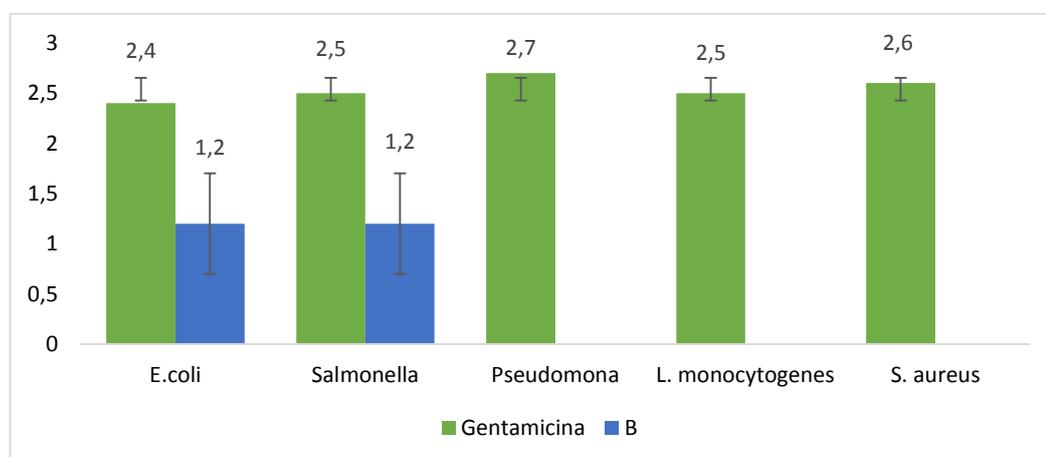


Figura 3. Resultado de antibiograma gentamicina versus 1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea

El compuesto **B** presentó un efecto antimicrobiano en dos de las cinco bacterias analizadas (*E. coli* y *salmonella spp*) a una concentración aproximadamente 60 veces inferior, respecto al estándar gentamicina. Tomando en cuenta, la resistencia de *E. coli* a ampicilina, cefalosporinas de primera generación y cotrimoxazol, asimismo sensibilidad a ciprofloxacina y fluorquinolonas, el compuesto **B** presenta una actividad antimicrobiana relevante (Sangrador, et al. 2005). El Anexo 3 muestra el resultado del efecto de inhibición del compuesto **B** en *E. coli*.

La resistencia de *Salmonella spp* se da en antibióticos betalactámicos, incluyendo derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactámicos, carbacefem, carbapenems e inhibidores de la betalactamasa, los mismos que comúnmente son utilizados en diversos tratamientos infecciosos. El compuesto **B** presentó actividad en contra de *Salmonella spp* que generalmente es responsable de la contaminación en alimentos. El efecto de inhibición que se observó en estas bacterias podría deberse a que el compuesto **B** presenta un grupo trifluorometilo (-CF₃) en su estructura, siendo conocidos los efectos que producen la introducción de átomos de flúor, como en los observados en fluoroquinolonas (Leyva & Leyva, 2008). El Anexo 4 muestra el resultado del efecto de inhibición del compuesto **B** en *Salmonella spp*.

Asimismo, en las demás bacterias donde no se observó actividad antimicrobiana, la literatura revisada menciona los siguientes aspectos respecto a la resistencia microbiana.

En el caso de *Pseudomonas spp* al presentar cápsula, posee un medio de defensa y de protección que inhibe la acción bactericida de los algunos antibióticos, pero es sensible a Gentamicina, Amikacina, Carbenicilina y Tobramicina. Los compuestos estudiados **A**, **B** y **C** que presentan el anillo estructural cromona podrían no poseer características estructurales para inhibir el proceso de desarrollo de la bacteria (Molina & Uribarren, 2018).

L. monocytogenes es resistente a los mecanismos bactericidas de muchos antibióticos, porque es intracelular (estilo de vida de esta bacteria para usar proteínas que degradan la membrana fagosomal, proliferando posteriormente en el citosol de la célula infectada) y usa este mecanismo para multiplicarse y protegerse de los antibióticos que se encuentran en el fluido extracelular; por ende se considera que sólo pocos agentes físicos o químicos pueden penetrar, almacenar y llegar al citosol de las células que hospedan este microorganismo (Villalobos & Martínez, 2006).

Los aminoglicósidos son antibióticos bactericidas que detienen el desarrollo microbiano actuando directamente en el ribosoma, se registra su resistencia entre 10 y 35 %, tomando gentamicina como el valor más alto. La resistencia se debe a que estos antimicrobianos son sintetizados por medio de

acetilación, adenilación o fosforilación lo que dificulta que se unan de forma adecuada a los ribosomas de la célula y desde allí se impida la biosíntesis normal de proteínas de *Staphylococcus aureus*. Los procesos de síntesis del compuesto **A**, **B** y **C** son acilación y enolización pudiendo tener un mismo mecanismo de acción limitado. A esta característica se le podría atribuir la resistencia de esta bacteria en los diferentes niveles de concentración y la actividad bacteriana no observada (Mamani, et al. 2006).

El comportamiento de las bacterias frente a las concentraciones altas de los compuestos **A**, **B** y **C**, en las cuales no se observó actividad antimicrobiana, podrían deberse a mutaciones deficientes en sistemas autolíticos. Posiblemente, se reduce la selección de subpoblaciones por el incremento de la dosis del antibiótico, buscando que se supere las concentraciones mínimas inhibitorias y cuando se sospecha la existencia de ésta es necesario prolongar el tiempo de duración del tratamiento (Sauceda, 2011).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- De acuerdo con los datos obtenidos en esta investigación, se pudo determinar la capacidad que posee el compuesto **B** (1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea), para actuar como un inhibidor de bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, que crean problemas de salud pública.
- El compuesto **A** (3-metil-2-pentafluoretilcromona) no mostró un efecto de aleloquímico en las semillas de falsa quinua (*C. album*), holco (*H. lanatus*) y semillas de quinua (*C. quinoa*), a pesar de haberse utilizado diversos niveles de concentración y condiciones de germinación ideales. El tratamiento estadístico de los datos no evidenció una diferencia de germinación en ninguna concentración, con respecto al blanco.
- Se observó una mayor viabilidad en el crecimiento radicular de las semillas de quinua, respecto a las semillas de malezas. Este resultado podría deberse a la correcta recolección de las semillas, realizada en el INIAP, debido a que estas recibieron un tratamiento y condiciones ideales de recolección, mientras que las malezas se encuentran de forma original en la naturaleza como competidoras y muchas veces son más resistentes que la planta ideal.
- Los compuesto estudiados poseen un grupo trifluorometilo (-CF₃) en su estructura, siendo conocidos los efectos que produce la introducción de átomos de flúor en algunos fármacos para la formación de antibióticos y al que podríamos atribuir el efecto de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* frente al compuesto B 1-etil-3-(2-trifluorometilcromon-3-il) metil tiourea).

4.2 RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar un estudio de la solubilidad de los compuestos A, B y C para mejorar la interacción de las semillas con los compuestos estudiados. Se debe considerar que determinados solventes pueden interferir en la inhibición de la germinación de diversas especies. En el presente estudio se realizó pruebas de solubilidad utilizando DMSO como disolvente para los ensayos de germinación. Sin embargo, se observó inhibición del crecimiento radicular en las semillas blanco donde se utilizó DMSO.
- Uno de los puntos importantes, a tomar en cuenta para el desarrollo adecuado del ensayo de germinación es obtener semillas que se encuentren en condiciones de viabilidad física (estructura, color, tamaño) y por otra parte, tener el acondicionamiento apropiado de temperatura, humedad relativa y luz, siendo recomendable utilizar una cámara germinadora.
- Pruebas iniciales del antibiograma fueron desarrolladas con gentamicina de 10 µg y amoxicilina de 25 µg, pero se evidenció que el segundo antibiótico a pesar de su alta concentración no tiene efecto en algunas de las cepas usadas, probablemente por efectos de resistencia, por lo que se sugiere que se utilice gentamicina en futuras investigaciones relacionadas.
- Se sugiere realizar estudios de toxicidad del compuesto B, en vista de que se demostró que pueden ser inhibidores de crecimiento de bacterias como *E. coli* y *Salmonella spp.* Mismas que producen contaminación por contacto en alimentos, siendo bacterias comunes que producen problemas de salud pública.

5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alcívar, C.D., Echeverría, G.A., Piro, O.E., Ulic, S.E., Jios, J.L. (2015). A detailed experimental and theoretical study of two novel substituted trifluoromethoxychromones. The influence of the bulky bromine atom on the crystal packing. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, 47 esq 115, 1900 La Plata Argentina.
- Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*. (71), págs. 110-116.
- Bohórquez, P., Riofrío, H., Francisco, H., & Romero, M. E. (2009). *Producción y comercialización de quinua en el Ecuador* (Doctoral dissertation, Tesis Ingeniería Comercial. Guayaquil, EC, Escuela Superior Politécnica del Litoral).
- Bojanic, A. (2011). La quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. D-FAO.
- Cabrera, C. E., et al. (2007). "La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación." *Colombia médica* 38(2).
- Carballo Guerra, C., Alfaro López, T., Palazón López, Z., Ramos Gálves, R., Rodríguez Ferrada, C. A., Cabezas Landrian, C., Reyes Arias, M. (2002). Desinfección química de plantas medicinales II: *Plantago lanceolata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(3), 0-0.
- Cardona, C. N., & Salazar, O. M. (2012). Actividad Alelopática y antibacteriana de fracciones polares F1-C, F1-DY F1-F obtenidas de *Henriettella trachyphylla* Triana (melastomataceae). Trabajo de grado. Requisito parcial para optar al título de Tecnólogo Químico.
- Cazón, A., de Viana, M. L., & Gianello, J. C. (2002). Comparación del efecto fitotóxico de aleloquímicos de *Baccharis boliviensis* (Asteraceae) en la germinación de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae). *Ecología austral*, 12(1), 73-78.
- Cona, T. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología*, 19, 77-81.
- Delatorre-Herrera, J., Sánchez, M., Delfino, I., & Oliva, M. I. (2013). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), un tesoro andino para el mundo. *Idesia (Arica)*, 31(2), 111-114.

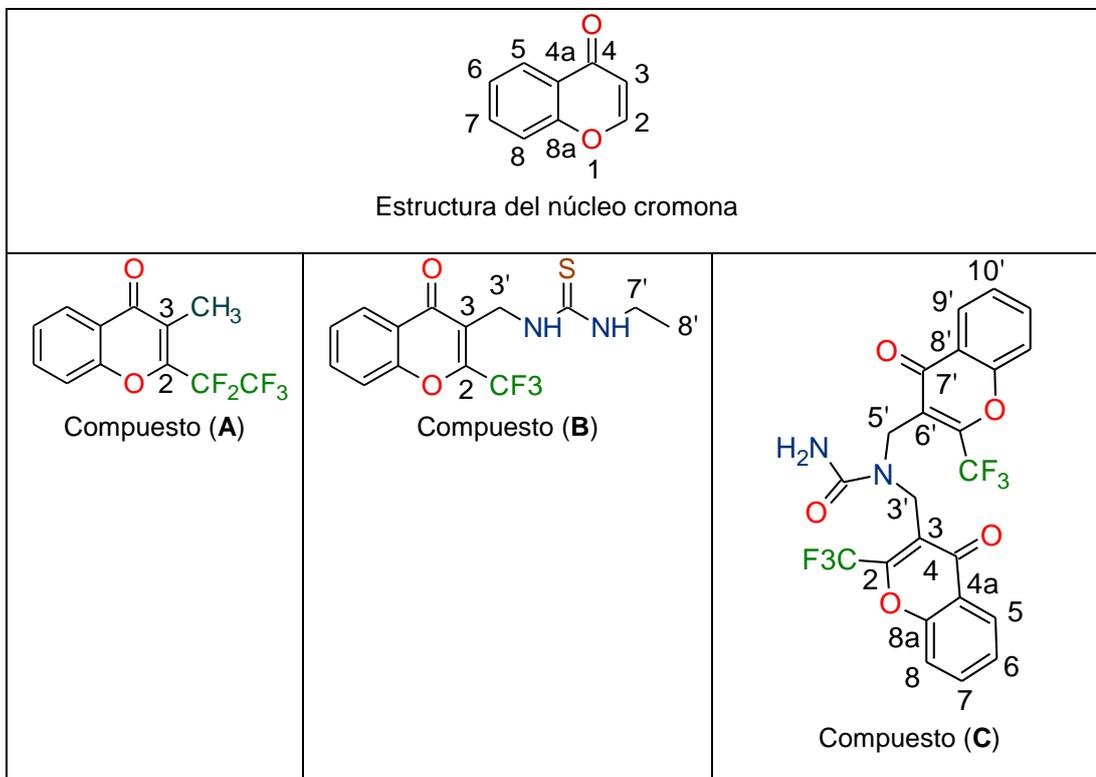
- Flores, T. G. and R. A. R. Herrera (2005). "Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico." *Salud pública de México* 47(5): 388-390.
- Fuentes, F., Maughan, P. J., & Jellen, E. N. (2009). Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Revista geográfica de Valparaíso*, 42, 20-33.
- García, D., Medina, M. (2006). Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Venezuela: Zootecnia Tropical*, 24(3), pp. 233-250
- GUERRA TRUJILLO, J. U. A. N. (2014). EFECTO ALELOPATICO DE (TIMOL) Y (CARVACROL) EN LA GERMINACION DE CHILE Y TOMATE, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.
- Hernández, B. (2015). INVESTIGACIÓN DE POTENCIALES PROPIEDADES ALELOPÁTICAS DE DOS ESPECIES DE LEGUMINOSAS (*Calliandra carbonaria*) y (*Vicia faba* L.) SOBRE MALEZAS DEL CULTIVO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd). (Investigación), Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6440/1/T-UCE-0004-28.pdf>
- Hudzicki, J. (2009). Protocolo de Prueba de Susceptibilidad de Difusión de Disco Kirby-Bauer. American Society for Microbiology.
- Jacobsen, S. E. and S. Sherwood. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador. Informe sobre los rubros de quinua, chocho y amaranto. CIP y FAO Global IPM Facility. Editorial Abya Yala. Quito, Ecuador.
- Jean-Yves, A., Jacques, F., Turati, R., Epos, S., Viamonte, M. (2006). Para comprender las plantas y la diversidad del mundo vegetal. Bogotá: Panamericana editorial.
- Leyva, S., & Leyva, E. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Soc. Quím. Méx*, 2(1), 1-13.
- Mamani, E., Luján, D., & Pajuelo, G. (2006, June). Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*: Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 67, No. 2, pp. 120-124). UNMSM. Facultad de Medicina.
- Martínez, M. A. O. Síntesis de análogos fluorados de Papaverina.
- Molina, J. & Uribarren, T. (2018) "Generalidades de Bacterias". Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

- Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología*, 29, 73-82.
- Orden Gutiérrez, J. A. (2001). Implications on public health of quinolone resistance in bacteria of animal origin. *Revista Española de Salud Pública*, 75(4), 313-320.
- Peralta, I. (1985). La quinua: un gran alimento y su utilización.
- Peralta, I. (2009). La quinua en Ecuador." Estado del arte".
- Picazo, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recuperado el 10 de noviembre de 2017, disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf
- Quintana, A. (2013). Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689-1699.
- Ruiz, G. D. and C. W. Rodarte (2003). "Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados." *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45(1-2): 30-40
- Sampietro, D. A. (2001). Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. línea). Fac. de Bioquím., Quím. y Farm. Un. Nac. de Tucumán, Arg. <http://www.mdp.edu.ar/illia/nueva/Alelopatia/Alelopatia>.
- Sánchez Márquez, M. S. (2009). Estudio de la microbiota endofítica asociada a las gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*.
- Sangrador, C. O., Bouza, J. E., Mendez, C. P., Galiana, L. I., & Grupo de Estudio de los Tratamientos Antibióticos. (2005). Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap*, 18(2), 124-135.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7(1), 153-170.
- Vanegas, M., Correa, N., Morales, A., Martínez, A., Rúgeles, L., & Jiménez, F. (2009). Resistencia a Antibióticos de Bacterias Aisladas de Biopelúclas en una Planta de Alimentos. *Rev. MVZ Córdoba*, 14, 1677-1683.

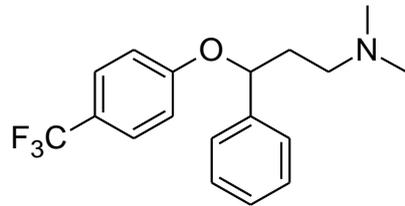
- VARGAS MARTÍNEZ, F. R. A. N. C. I. S. C. O. (2013). EFECTO ALELOPÁTICO DEL EXTRACTO DE MEZQUITE (*Prosopis juliflora*), SOBRE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ (*Zea mays*) Y AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.
- Villalobos de Bastardo, L. B., & Martínez Nazaret, R. E. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26(1).
- Zamora, J. M., Chaves, C., & Arias, M. L. (2006). Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 56(2), 171-174.
- Zamora-Natera, F., García-López, P., Ruiz-López, M., & Salcedo-Pérez, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia*, 42(2), 185-192.
- Zamorano, C. (2006). Alelopatía: un nuevo reto en la ciencia de las arvenses en el trópico. *Agron*, 14(1), 7-15.

6. ANEXOS

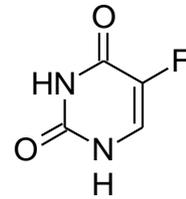
ANEXO I ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS A, B Y C, ESTUDIADAS EN LA PRESENTE TESIS (Alcívar, et al. 2015)



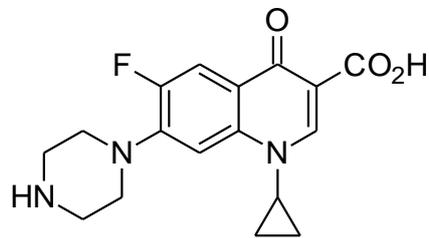
**ANEXO II EJEMPLO DE MOLÉCULAS QUE
PRESENTA ÁTOMOS DE FLÚOR EN SU
ESTRUCTURA Y SUS ACTIVIDADES
FARMACOLÓGICAS (Alcívar, et al. 2015)**



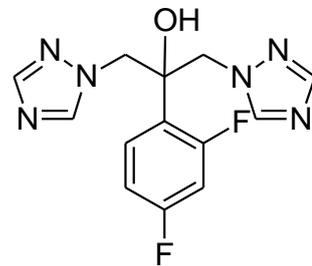
Prozac (antidepresivo)



5-Fluorouracilo (anticancerígeno)



Ciprofloxacina (antibiótico)



Fluconazole (antifúngico)

ANEXO III RESULTADO DEL EFECTO DE INHIBICIÓN DEL COMPUESTO B EN *Escherichia coli*



**ANEXO IV RESULTADO DEL EFECTO DE INHIBICIÓN
DEL COMPUESTO B EN Salmonella spp**



ANEXO V ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE GERMINACIÓN EN LAS SEMILLAS DE QUINUA, FALSA QUINUA Y HOLCO

ANOVA Multifactorial - GERMINACIÓN (%)

Variable dependiente: GERMINACIÓN (%)

Factores: ESPECIE DE SEMILLA Y CONCENTRACIÓN

Número de casos completos: 45

Análisis de Varianza para GERMINACIÓN (%) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:ESPECIE DE SEMILLA	10821,1	2	5410,56	75,50	0,0000
B:CONCENTRACIÓN	113,333	4	28,3333	0,40	0,8103
INTERACCIONES					
AB	1073,33	8	134,167	1,87	0,1022
RESIDUOS	2150,0	30	71,6667		
TOTAL (CORREGIDO)	14157,8	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para GERMINACION (%) por ESPECIE DE SEMILLA

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ESPECIE DE SEMILLA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A2	15	64,6667	2,18581	X
A3	15	67,0	2,18581	X
A1	15	98,6667	2,18581	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
A1 - A2	*	34,0	7,62244
A1 - A3	*	31,6667	7,62244
A2 - A3		-2,33333	7,62244

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para GERMINACIÓN (%) con intervalos de confianza del 95,0%

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	45	76,7778			
ESPECIE DE SEMILLA					
A1	15	98,6667	2,18581	94,2026	103,131
A2	15	64,6667	2,18581	60,2026	69,1307
A3	15	67,0	2,18581	62,536	71,464
CONCENTRACIÓN					
C0	9	77,2222	2,82187	71,4592	82,9853
C1	9	74,4444	2,82187	68,6814	80,2075
C2	9	77,7778	2,82187	72,0147	83,5408
C3	9	75,5556	2,82187	69,7925	81,3186
C4	9	78,8889	2,82187	73,1258	84,6519
ESPECIE DE SEMILLA por CONCENTRACIÓN					
A1,C0	3	100,0	4,88763	90,0181	109,982
A1,C1	3	100,0	4,88763	90,0181	109,982
A1,C2	3	96,6667	4,88763	86,6848	106,649
A1,C3	3	100,0	4,88763	90,0181	109,982
A1,C4	3	96,6667	4,88763	86,6848	106,649
A2,C0	3	60,0	4,88763	50,0181	69,9819
A2,C1	3	55,0	4,88763	45,0181	64,9819
A2,C2	3	66,6667	4,88763	56,6848	76,6486
A2,C3	3	71,6667	4,88763	61,6848	81,6486
A2,C4	3	70,0	4,88763	60,0181	79,9819
A3,C0	3	71,6667	4,88763	61,6848	81,6486
A3,C1	3	68,3333	4,88763	58,3514	78,3152
A3,C2	3	70,0	4,88763	60,0181	79,9819
A3,C3	3	55,0	4,88763	45,0181	64,9819
A3,C4	3	70,0	4,88763	60,0181	79,9819

Pruebas de Múltiple Rangos para GERMINACIÓN (%) por CONCENTRACIÓN

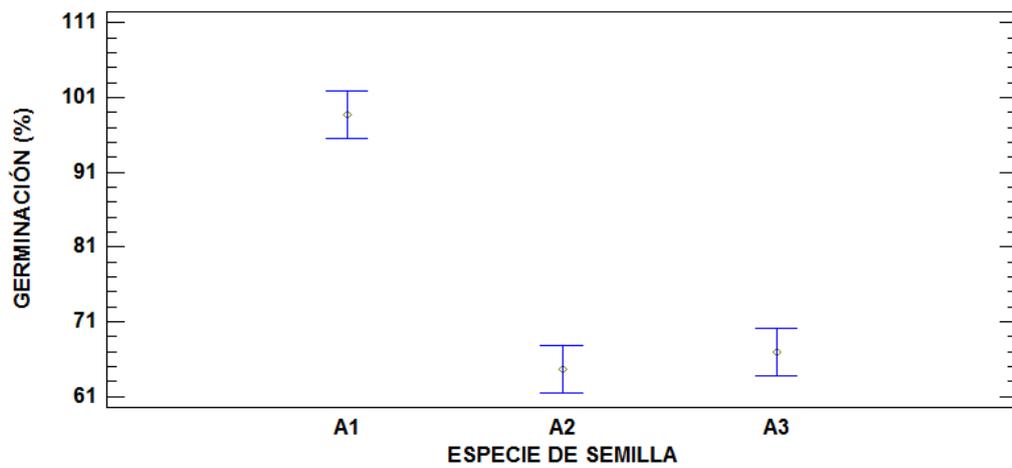
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C1	9	74,4444	2,82187	X
C3	9	75,5556	2,82187	X
C0	9	77,2222	2,82187	X
C2	9	77,7778	2,82187	X
C4	9	78,8889	2,82187	X

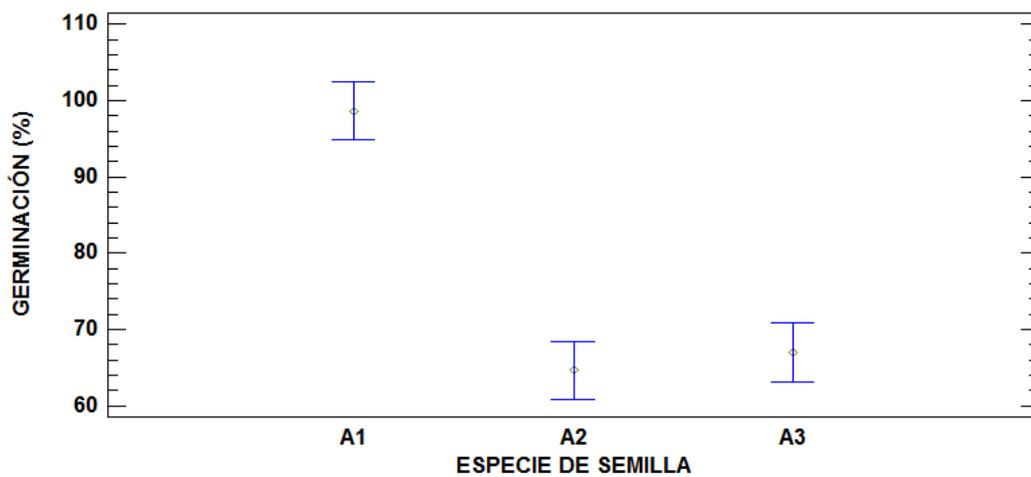
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
C0 - C1		2,77778	11,5774
C0 - C2		-0,555556	11,5774
C0 - C3		1,66667	11,5774
C0 - C4		-1,66667	11,5774
C1 - C2		-3,33333	11,5774
C1 - C3		-1,11111	11,5774
C1 - C4		-4,44444	11,5774
C2 - C3		2,22222	11,5774
C2 - C4		-1,11111	11,5774
C3 - C4		-3,33333	11,5774

* indica una diferencia significativa.

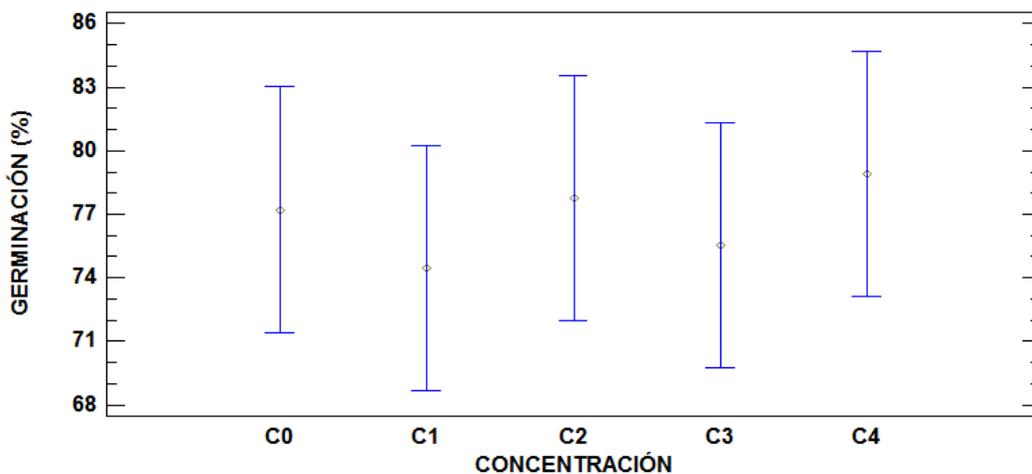
Medias y 95,0% de Fisher LSD



Medias y 95,0% de Tukey HSD



Medias y 95,0% de Tukey HSD



Interacciones y 95,0% de Tukey HSD

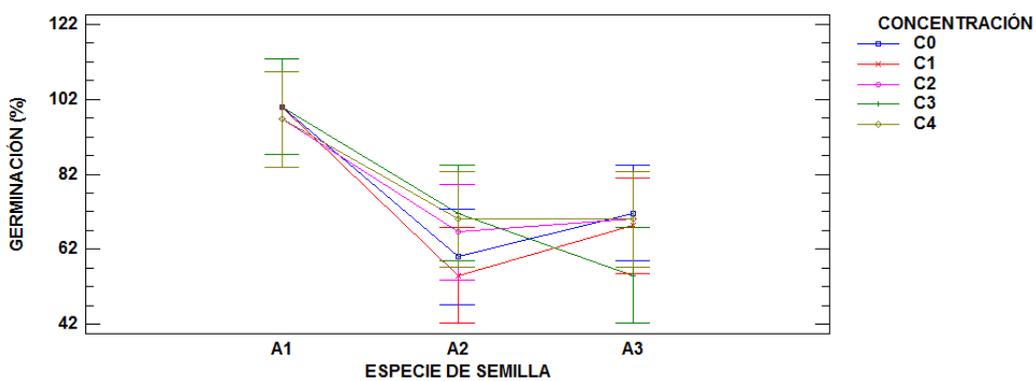
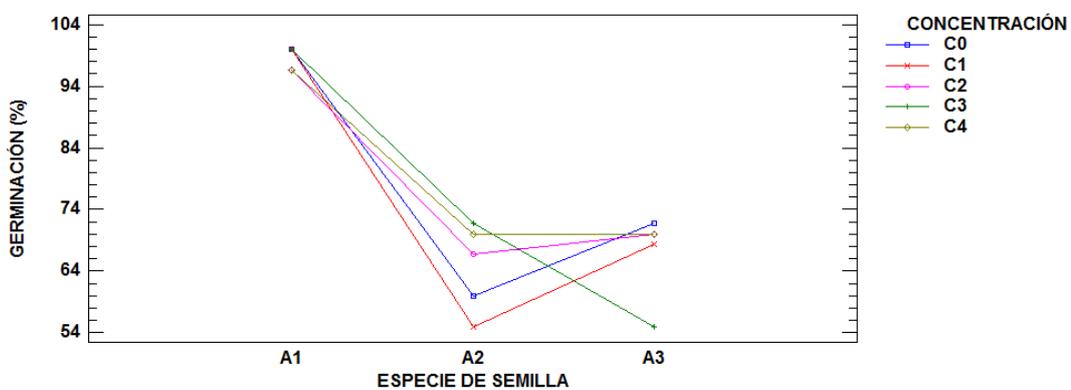


Gráfico de Interacciones



ANEXO VI ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE CRECIMIENTO RADICULAR EN LAS SEMILLAS DE QUINUA, FALSA QUINUA Y HOLCO

ANOVA Multifactorial - CRECIMIENTO RADICULAR (mm)

Variable dependiente: CRECIMIENTO RADICULAR (mm)

Factores: ESPECIE DE SEMILLA Y CONCENTRACIÓN

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para CRECIMIENTO RADICULAR (mm) con intervalos de confianza del 95,0%

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	45	27,5089			
ESPECIE DE SEMILLA					
A1	15	36,3767	1,89619	32,5041	40,2492
A2	15	25,4	1,89619	21,5275	29,2725
A3	15	20,75	1,89619	16,8775	24,6225
CONCENTRACIÓN					
C0	9	32,4778	2,44797	27,4783	37,4772
C1	9	24,3667	2,44797	19,3672	29,3661
C2	9	27,2167	2,44797	22,2172	32,2161
C3	9	25,1833	2,44797	20,1839	30,1828
C4	9	28,3	2,44797	23,3006	33,2994
ESPECIE DE SEMILLA por CONCENTRACIÓN					
A1,C0	3	39,45	4,24001	30,7907	48,1093
A1,C1	3	29,6167	4,24001	20,9574	38,2759
A1,C2	3	31,7667	4,24001	23,1074	40,4259
A1,C3	3	39,7167	4,24001	31,0574	48,3759
A1,C4	3	41,3333	4,24001	32,6741	49,9926
A2,C0	3	33,9667	4,24001	25,3074	42,6259
A2,C1	3	20,2333	4,24001	11,5741	28,8926
A2,C2	3	29,3	4,24001	20,6407	37,9593
A2,C3	3	19,5667	4,24001	10,9074	28,2259
A2,C4	3	23,9333	4,24001	15,2741	32,5926
A3,C0	3	24,0167	4,24001	15,3574	32,6759
A3,C1	3	23,25	4,24001	14,5907	31,9093
A3,C2	3	20,5833	4,24001	11,9241	29,2426
A3,C3	3	16,2667	4,24001	7,6074	24,9259
A3,C4	3	19,6333	4,24001	10,9741	28,2926

Pruebas de Múltiple Rangos para CRECIMIENTO RADICULAR (mm) por ESPECIE DE SEMILLA

Método: 95,0 porcentaje LSD

ESPECIE DE SEMILLA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A3	15	20,75	1,89619	X
A2	15	25,4	1,89619	X
A1	15	36,3767	1,89619	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	10,9767	5,4766
A1 - A3	*	15,6267	5,4766
A2 - A3		4,65	5,4766

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CRECIMIENTO RADICULAR (mm) por CONCENTRACIÓN

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1	9	24,3667	2,44797	X
C3	9	25,1833	2,44797	X
C2	9	27,2167	2,44797	X
C4	9	28,3	2,44797	X
C0	9	32,4778	2,44797	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
C0 - C1		8,11111	10,0434
C0 - C2		5,26111	10,0434
C0 - C3		7,29444	10,0434
C0 - C4		4,17778	10,0434
C1 - C2		-2,85	10,0434
C1 - C3		-0,816667	10,0434
C1 - C4		-3,93333	10,0434
C2 - C3		2,03333	10,0434
C2 - C4		-1,08333	10,0434
C3 - C4		-3,11667	10,0434

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CRECIMIENTO RADICULAR (mm) por ESPECIE DE SEMILLA

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ESPECIE DE SEMILLA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A3	15	20,75	1,89619	X
A2	15	25,4	1,89619	X
A1	15	36,3767	1,89619	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	10,9767	6,61246
A1 - A3	*	15,6267	6,61246
A2 - A3		4,65	6,61246

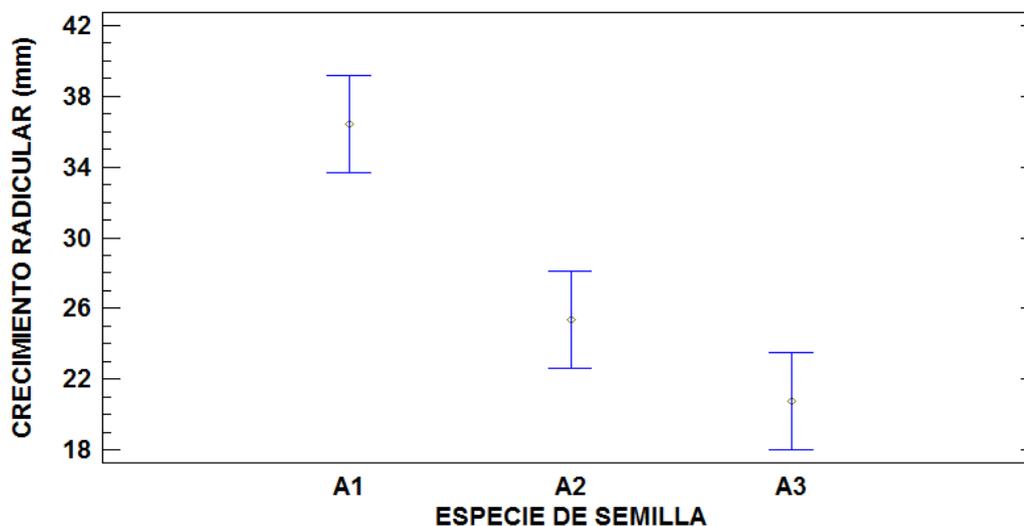
* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza para CRECIMIENTO RADICULAR (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

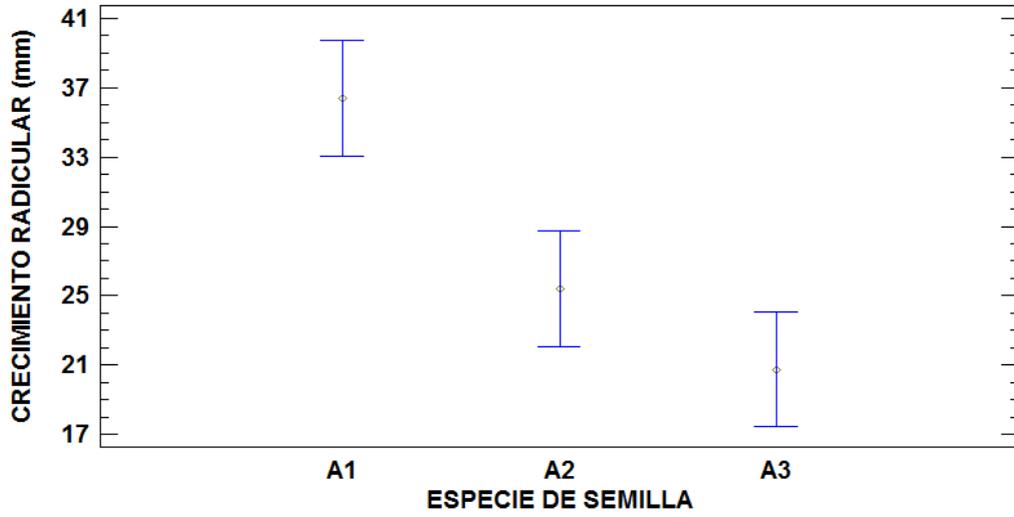
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:ESPECIE DE SEMILLA	1931,51	2	965,756	17,91	0,0000
B:CONCENTRACIÓN	366,146	4	91,5365	1,70	0,1767
INTERACCIONES					
AB	539,513	8	67,4392	1,25	0,3055
RESIDUOS	1617,99	30	53,933		
TOTAL (CORREGIDO)	4455,16	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Medias y 95,0% de Tukey HSD



Medias y 95,0% de Tukey HSD

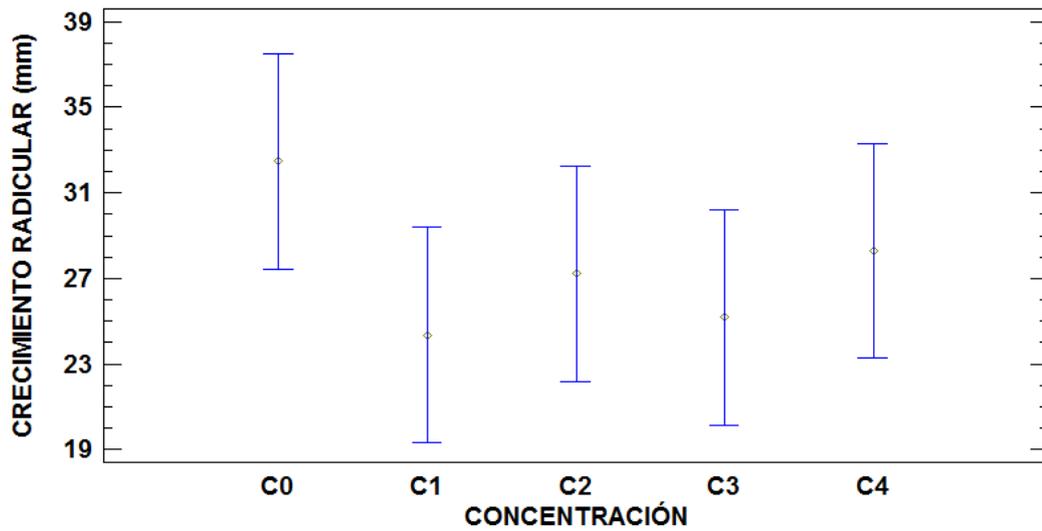
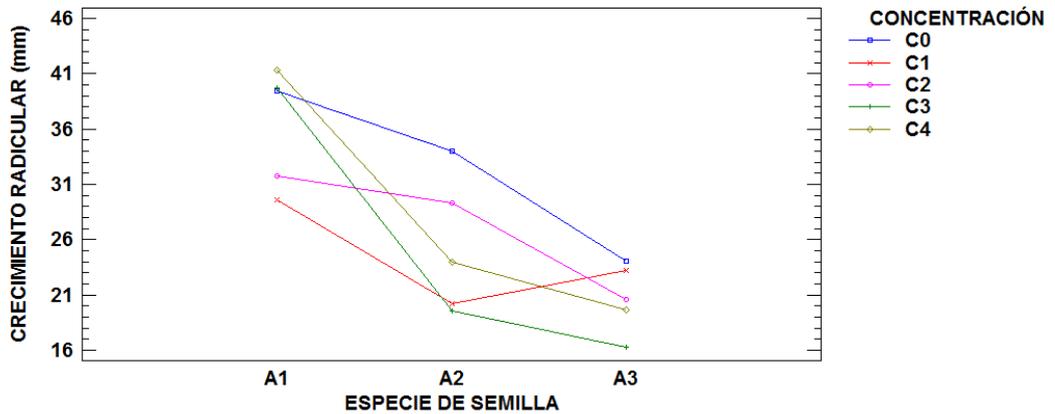
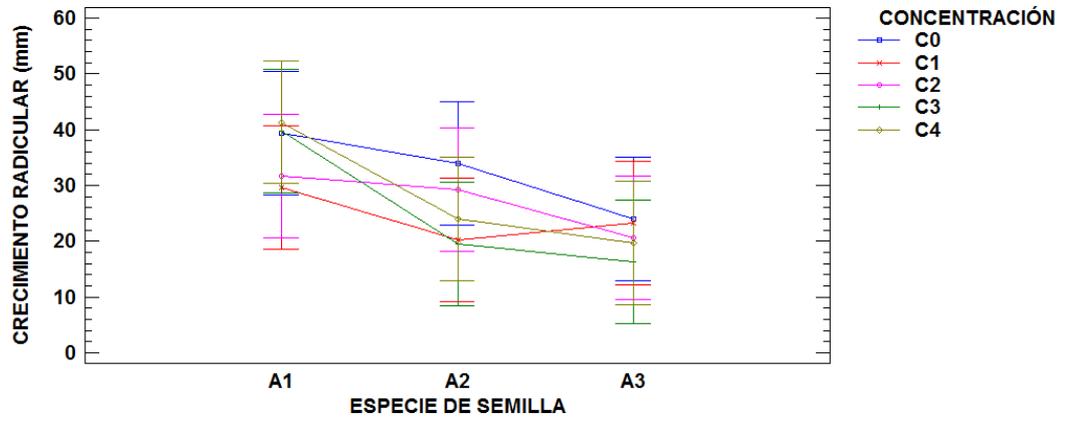


Gráfico de Interacciones

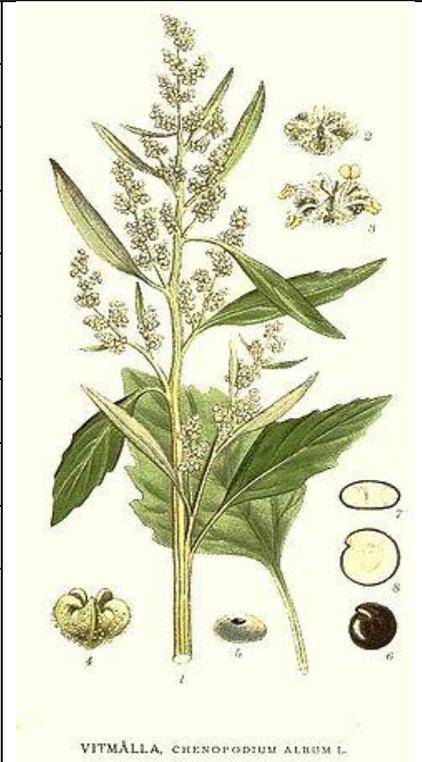


Interacciones y 95,0% de Tukey HSD



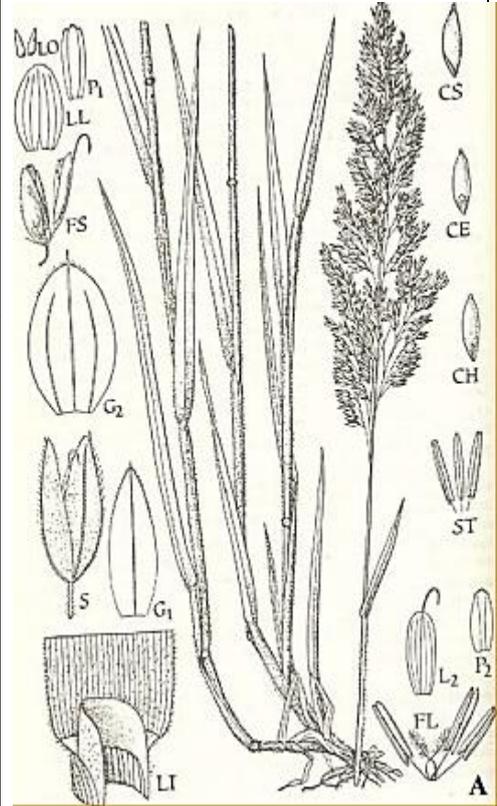
ANEXO VIII CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE FALSA QUINUA (*Chenopodium album* L.)

Descripción Especie Planta	
Reino:	Plantae
División :	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Amaranthaceae
Subfamilia:	Chenopodioideae
Género:	<i>Chenopodium</i>
Sección:	Chenopodia
Especie:	<i>Chenopodium album</i> L.



ANEXO IX CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE HOLCO (*Holcus lanatus*)

Descripción Especie Planta	
Reino:	Plantae
División :	Magnoliophyta
Clase:	Liliópsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Poaceae
Especie:	<i>Holcus lanatus</i> L.



ANEXO X CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa willd*)

Descripción Especie Planta	
Reino:	Vegetal
División :	Fenerógamas
Clase:	Dicotiledoneas
Sub clase	Angiosperma
Orden:	Centrospermales
Familia:	Chenopodioideae
Género:	<i>Chenopodium</i>
Sección:	Chenopodia
Especie:	<i>Chenopodium quinoa willd</i>



Quinoa
Chenopodium quinoa Willd.