



UNIVERSIDAD UTE

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

CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

**EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 2-
DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA**

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

CATALINA ANGELICA LUNA TAPIA

DIRECTOR: Dr. CHRISTIAN DAVID ALCÍVAR LEÓN

Quito, Septiembre, 2018

© Universidad UTE. 2018

Reservados todos los derechos de reproducción

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

PROYECTO DE TITULACIÓN

DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	171198693-3
APELLIDO Y NOMBRES:	Luna Tapia Catalina Angélica
DIRECCIÓN:	Núñez de Balboa OE2-201 y Pedro Piñas
EMAIL:	moontapia1989@gmail.com
TELÉFONO FIJO:	2688-589
TELÉFONO MOVIL:	0989817582

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EFECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA
AUTOR O AUTORES:	Luna Tapia Catalina Angélica
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	18 de Septiembre del 2018
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Dr. Christian David Alcívar León
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera de Alimentos
RESUMEN: Mínimo 250 palabras	<p>Los cultivos de quinua se originan en la región Andina, su expansión depende de: cuidado en la tierra, en la siembra y un control eficiente de las posibles plagas que inducen un menor rendimiento en su producción e implica grandes pérdidas económicas.</p> <p>Dentro de la Industria alimentaria, se desarrolla el estudio de la actividad antimicrobiana de sustancias alternativas que permitan llevar un control en la inocuidad y calidad, los microorganismos muestran resistencia a varios compuestos. Por ello la presente investigación tuvo como finalidad evaluar el Efecto Antimicrobiano y Aleloquímico de 2-difluorometil-3-metilcromona.</p>

En la fase aleloquímica, se usó tres especies de semillas: quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), falsa quinua (*Chenopodium album*) y holco (*Holcus lanatus*). Se preparó soluciones del compuesto A en metanol obteniéndose concentraciones de: 3.29; 2.39; 1.198 y 0.5975 mM, se contrastó frente a un blanco (H₂O). Cabe reseñar que ensayos preliminares determinaron que el metanol inhibe el crecimiento de las semillas. Las variables de respuesta fueron: crecimiento radicular y porcentaje de germinación, los ensayos mostraron que los tratamientos más viables fueron: T2 (2.39 mM) y T3 (1.198 mM), por lo tanto se infiere que las concentraciones ensayadas muestran efecto aleloquímico. Las condiciones del ensayo de germinación fueron estandarizadas mediante el uso de una cámara germinadora, que controla las variables de humedad relativa y temperatura, esta investigación fue realizada en la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario AGROCALIDAD.

Para la etapa antimicrobiana se evaluó la medición de un halo de inhibición, utilizando como estándar gentamicina (10 µg/ml) y tres niveles de concentraciones (100, 10, 1 µg/ml) del compuesto A. Adicionalmente se realizó el ensayo en dos componentes más: 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (compuesto B), 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (compuesto C), que guardan estrecha relación estructural con el compuesto A. Además se usó cuatro tipos de bacterias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* Los resultados mostraron, el compuesto C no ejerció inhibición en ninguna de las bacterias, los compuestos A con una

	<p>concentración de 100 µg/ml y B con concentraciones de: 10 y 1 µg/ml, ejercieron efecto en <i>Escherichia coli</i>.</p>
<p>PALABRAS CLAVES:</p>	<p>2-difluorometil-3-metilcromona, efecto aleloquímico, actividad antimicrobiana.</p>
<p>ABSTRACT:</p>	<p>Quinoa crops originate in the Andean region, its expansion depends on: care in the soil, sowing and efficient control of the possible pests that induce a lower yield in their production and implies great economic losses.</p> <p>Within the food industry, the study of the antimicrobial activity of alternative substances that allow controlling the safety and quality, the microorganisms show resistance to several compounds is developed. Therefore, the purpose of the present investigation was to evaluate the Antimicrobial and Alelochemical Effect of 2-difluoromethyl-3-methylchromone.</p> <p>In the allelochemical phase, three species of seeds were used: quinoa (<i>Chenopodium quinoa willd</i>), false quinoa (<i>Chenopodium album</i>) and holco (<i>Holcus lanatus</i>). Solutions of compound A in methanol were prepared obtaining concentrations of: 3.29; 2.39; 1198 and 0.5975 mM, it was contrasted against a blank (H₂O). Should be noted that preliminary trials determined that methanol inhibits the growth of seeds. The response variables were: root growth and percentage of germination, the trials showed that the most viable treatments were: T2 (2.39 mM) and T3 (1198 mM), therefore it is inferred that the concentrations tested show allelochemical effect. The conditions of the germination test were standardized by the use of a germination chamber, which controls the variables of relative humidity and temperature, this research was carried out</p>

	<p>in the Agency of Regulation and Control Phyto and Zoosanitary AGROCALIDAD.</p> <p>For the antimicrobial stage, the measurement of an inhibition halo was evaluated, using as a standard gentamicin (10 µg / ml) and three levels of concentrations (100, 10, 1 µg / ml) of compound A. Additionally, the test was carried out in two further components: 3-azidomethyl-2-trifluoromethyl-chromone (compound B), 6-chloro-3-methyl-2-trifluoromethyl-chromone (compound C), which have a close structural relationship with compound A. In addition four types of bacteria were used: Escherichia coli, Pseudomonas aureginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella spp. The results showed that compound C did not exert inhibition in any of the bacteria, compounds A with a concentration of 100 µg / ml and B with concentrations of: 10 and 1 µg / ml, exerted an effect in Escherichia coli.</p>
<p>KEYWORDS</p>	<p>2-difluoromethyl-3-methylchromone, allelochemical effect, antimicrobial activity.</p>

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

Luna Catalina

LUNA TAPIA CATALINA ANGÉLICA

171198693-3

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo **Catalina Angélica Luna Tapia**, con CI. **171198693-3** autora del proyecto titulado: **EFEECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA** previo a la obtención del título de **INGENIERA DE ALIMENTOS**, en la Universidad UTE.

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 UTE 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, 18 de Septiembre del 2018



LUNA TAPIA CATALINA ANGÉLICA

CI. 171198693-3



CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo **Pablo Xavier Atapuma Acuña** con cédula de identidad N. **171760628-7**, en calidad de Responsable Técnico de Laboratorio de Control de Calidad de semillas de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario **AGROCALIDAD** ubicada en Tumbaco. Autorizo a la Srta. **Catalina Angélica Luna Tapia**, realizar la investigación para la elaboración de su proyecto de titulación **“EFECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA”**, basada en la información proporcionada por la compañía.



AGROCALIDAD
AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO
**CONTROL DE CALIDAD
DE SEMILLAS**
TUMBAACO - ECUADOR

Ing. Pablo Xavier Atapuma Acuña
Responsable Técnico
Laboratorio Control de Calidad de semillas
C.I 171760628-7

DECLARACIÓN

Yo **CATALINA ANGÉLICA LUNA TAPIA**, 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 UTE 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.

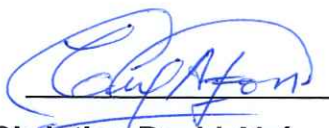
Luna Catalina

LUNA TAPIA CATALINA ANGÉLICA

C.I. 171198693-3

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título “**EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ALELOQUÍMICO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA**”, que para aspirar al título de **INGENIERA DE ALIMENTOS** fue desarrollado por **CATALINA ANGÉLICA LUNA TAPIA**, 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.



Dr. Christian David Alcívar León

DIRECTOR DEL TRABAJO

C.I. 171500842-9

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme culminar esta pequeña parte de mis metas, por guiar mis pasos y darme la oportunidad de estudiar.

A mis padres Judith y Luis, a quienes admiro por su sacrificio y amor incondicional. Han inculcado en mi su ejemplo de constancia y superación "LOS AMO".

A mis padres de crianza Luz María y José, por siempre estar a mi lado, por su amor incondicional, su apoyo. Papi José te fuiste de forma prematura, pero sé que desde el cielo me brindas tu bendición, siempre te extraño. "DIOS LE PAGUE"

También dedico este trabajo a mi pequeño hombrecito, mi sobrino Dominick, eres el mejor regalo que Dios me dio, desde el día que naciste te convertiste en mi amor por siempre y mi razón de vivir. "TE AMO"

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por bendecirme rodeándome de personas que han sido como ángeles en mi vida y que me apoyaron durante todo este trayecto.

A mis Padres, por el apoyo que me brindaron, nunca olvidare su sacrificio de haber migrado, para brindarme un mejor futuro y dejarme su mejor legado “MI EDUCACIÓN”.

A mis padres de crianza, por siempre cuidar de mí, les estaré eternamente agradecida por considerarme una hija más.

A mis hermanas Josselyn y Adriana, por siempre creer en mí, por apoyarme y nunca dejarme sola.

A quien se convirtió en alguien muy especial en mi vida, Pablo gracias por ese amor sincero y apoyo incondicional.

A mi tutor Dr. Christian Alcívar, por haberme tomado en cuenta para este proyecto, por su confianza, paciencia, enseñanza y amistad.

A la Ing. Betty Hernández, por su valiosa colaboración para el desarrollo de esta investigación.

Al personal técnico del Laboratorio de semillas de AGROCALIDAD, por facilitarnos las instalaciones, equipos y materiales para realizar esta investigación.

A la MSc. Gabriela Maldonado, por su valiosa colaboración para los ensayos microbiológicos.

Finalmente a mis amigas Sofía, Andrea y María José, gracias por no dejarme sola, por sus consejos, regaños, palabras de aliento. Juntas en los buenos y malos momentos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.INTRODUCCIÓN	3
1.1 FLUOROQUINOLONAS	3
1.2 CROMONAS	3
1.3 LA PRODUCCIÓN DE QUINUA EN ECUADOR	4
1.4 GERMINACIÓN DE LA QUINUA	6
1.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS MALEZAS	6
1.6 MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA	7
1.6.1 BIOLOGÍA DE MICROORGANISMOS	8
1.6.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	8
1.6.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA	9
2. METODOLOGÍA	11
2.1 MATERIALES (Ensayo Aleloquímico)	11
2.1.1 MATERIAL EXPERIMENTAL	11
2.1.2 INSTRUMENTOS, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO	11
2.1.2.1 Instrumentos	11
2.1.2.2 Reactivos	11
2.1.2.3 Equipos de Laboratorio	11
2.2 MATERIALES (Actividad Antimicrobiana)	11
2.2.1 MATERIAL EXPERIMENTAL	11
2.2.2 INSTRUMENTOS, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO	12
2.2.2.1 Instrumentos	12
2.2.2.2 Reactivos	12
2.2.2.3 Equipos de Laboratorio	12
2.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ALELOQUÍMICO	12
2.3.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES	12
2.3.2 ENSAYO DE GERMINACIÓN	12
2.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO	13
2.4.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES	13
2.4.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS	13
2.4.2.1 Solución Salina	13
2.4.2.2 Caldo Nutritivo	13
2.4.2.3 Agar Mueller Hinton	13
2.4.3 ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES	13
2.4.4 RESIEMBRA DE CEPAS PURAS	13
2.4.5 EFECTO ANTIMICROBIANO (MÉTODO KIRBY-BAUER)	14

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1 EFECTO ALELOQUÍMICO	15
3.1.1 RESULTADOS DE CRECIMIENTO RADICULAR	15
3.1.2 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN	18
3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	22
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
4.1 CONCLUSIONES	25
4.2 RECOMENDACIONES	26
5. BIBLIOGRAFÍA	27
6. ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA 1. Descripción general de la clasificación de las Fluoroquinolonas	3
TABLA 2. Enfermedades transmitidas por alimentos	7
TABLA 3. Ejemplos de bacterias que presentan resistencia innata a antibióticos	9
TABLA 4. ANOVA arreglo factorial para evaluar crecimiento radicular en semillas de Quinoa (<i>Chenopodium quinoa willd</i>), aplicando 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y el blanco. Tumbaco-Pichincha 2017.	15
TABLA 5. ANOVA arreglo factorial para evaluar crecimiento radicular en semillas de falsa quinua (<i>Chenopodium álbum</i>), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y el blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.	16
TABLA 6. ANOVA arreglo factorial para evaluar crecimiento radicular en semillas de Holco (<i>Holco lanatus</i>), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y el blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.	17
TABLA 7. ANOVA arreglo factorial para evaluar porcentaje de germinación en semillas de quinua (<i>Chenopodium quinoa willd</i>), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y un blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.	18
TABLA 8. ANOVA arreglo factorial para evaluar porcentaje de germinación en semillas de falsa quinua (<i>Chenopodium álbum</i>), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y un blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.	19
TABLA 9. ANOVA arreglo factorial para evaluar porcentaje de germinación en semillas de Holco (<i>Holcus lanatus</i>), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y un blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

- FIGURA 1.** Estructura general de los tres compuestos usados en la investigación: 2-difluorometil-3-metilcromona (compuesto A), 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (compuesto B) y 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (compuesto C). 4
- FIGURA 2.** Fotografía cultivo de Quinoa (*Chenopodium quinoa* willd), variedad Tunkahuan, Ecuador. (Gandarillas, Rojas, Bonifacio, & Ojeda, 2013) 5
- FIGURA 3.** Descripción geográfica de cultivos de quinoa (*Chenopodium quinoa* willd) en el Ecuador (Gandarillas et al., 2013). 5
- FIGURA 4.** Fotografías de malezas holco (*Holcus lanatus*) y falsa quinoa (*Chenopodium álbum*) (Cualchi, 2015). 6
- FIGURA 5.** Crecimiento radicular de la especie de semilla quinoa, variedad TUNKAHUAN. 15
- FIGURA 6.** Crecimiento radicular de la especie de semilla falsa quinoa (*Chenopodium album*). 16
- FIGURA 7.** Crecimiento radicular de la especie de semilla holco (*Holcus lanatus*). 17
- FIGURA 8.** Porcentaje de germinación de la especie de semilla Quinoa, variedad Tunkahuan 19
- FIGURA 9.** Porcentaje de germinación de la especie de semilla falsa quinoa (*Chenopodium album*) 20
- FIGURA 10.** Porcentaje de germinación de la especie de semilla holco (*Holcus lanatus*) 21
- FIGURA 11.** Distancia (mm) de halo de inhibición de 2-difluorometil-3-metilcromona a una concentración de 100 ug/ml, comparado con el estándar gentamicina de 10 µg/ml. 22
- FIGURA 12.** Distancia (mm) de halo de inhibición de 6-cloro-3-metil-2trifluorometilcromona a una concentración de (10 ug/ml), comparado con el estándar gentamicina (10 µg/ml). 23
- FIGURA 13.** Distancia (mm) de halo de inhibición de 6-cloro-3- metil-2trifluorometilcromona a una concentración de (1 ug/ml), comparado con el estándar gentamicina (10 µg/ml). 23

ÍNDICE DE ANEXOS

PÁGINA

ANEXO I. RESULTADO EFECTO ALELOQUÍMICO EN SEMILLAS DE QUINUA (<i>Chenopodium quinoa Willd</i>)	29
ANEXO II. RESULTADO EFECTO ALELOQUÍMICO EN SEMILLAS DE FALSA QUINUA (<i>Chenopodium álbum</i>)	30
ANEXO III. RESULTADO EFECTO ALELOQUÍMICO EN SEMILLAS DE HOLCO (<i>Holcos lanatus</i>)	31
ANEXO IV. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA (<i>Salmonella spp.</i>)	32
ANEXO V. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA (<i>Staphylococcus aureus</i>)	33
ANEXO VI. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA (<i>Escherichia coli</i>)	34
ANEXO VII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA (<i>Pseudomona aureginosa</i>)	35
ANEXO VIII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (<i>Salmonella spp.</i>)	36
ANEXO IX. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (<i>Staphylococcus aureus</i>)	37
ANEXO X. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (<i>Escherichia coli</i>)	38
ANEXO XI. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (<i>Pseudomona aureginosa</i>)	39
ANEXO XII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (<i>Escherichia coli</i>)	40
ANEXO XIII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (<i>Staphylococcus aureus</i>)	41
ANEXO XIV. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (<i>Salmonella spp.</i>)	42
ANEXO XV. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (<i>Pseudomona aureginosa</i>)	43

RESUMEN

Los cultivos de quinua se originan en la región Andina, su expansión depende de: cuidado en la tierra, en la siembra y un control eficiente de las posibles plagas que inducen un menor rendimiento en su producción e implica grandes pérdidas económicas.

Dentro de la Industria alimentaria, se desarrolla el estudio de la actividad antimicrobiana de sustancias alternativas que permitan llevar un control en la inocuidad y calidad, los microorganismos muestran resistencia a varios compuestos. Por ello la presente investigación tuvo como finalidad evaluar el Efecto Antimicrobiano y Aleloquímico de 2-difluorometil-3-metilcromona.

En la fase aleloquímica, se uso tres especies de semillas: quinua (*Chenopodium quinoa* willd), falsa quinua (*Chenopodium álbum*) y holco (*Holcus lanatus*). Se preparó soluciones del compuesto A en metanol obteniéndose concentraciones de: 3.29; 2.39; 1.198 y 0.5975 mM, se contrastó frente a un blanco (H₂O). Cabe reseñar que ensayos preliminares determinaron que el metanol inhibe el crecimiento de las semillas. Las variables de respuesta fueron: crecimiento radicular y porcentaje de germinación, los ensayos mostraron que los tratamientos más viables fueron: T2 (2.39 mM) y T3 (1.198 mM), por lo tanto se infiere que las concentraciones ensayadas muestran efecto aleloquímico. Las condiciones del ensayo de germinación fueron estandarizadas mediante el uso de una cámara germinadora, que controla las variables de humedad relativa y temperatura, esta investigación fue realizada en la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario AGROCALIDAD.

Para la etapa antimicrobiana se evaluó la medición de un halo de inhibición, utilizando como estándar gentamicina (10 µg/ml) y tres niveles de concentraciones (100, 10, 1 µg/ml) del compuesto A. Adicionalmente se realizó el ensayo en dos componentes más: 3-azidometil -2-trifluorometilcromona (compuesto B), 6-cloro- 3-metil-2-trifluorometilcromona (compuesto C), que guardan estrecha relación estructural con el compuesto A. Además se uso cuatro tipos de bacterias: *Escherichia coli*, *Pseudomona aureginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* Los resultados mostraron, el compuesto C no ejerció inhibición en ninguna de las bacterias, los compuestos A con una concentración de 100 µg/ml y B con concentraciones de: 10 y 1 µg/ml, ejercieron efecto en *Escherichia coli*.

Palabras clave: 2-difluorometil-3-metilcromona, efecto aleloquímico, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Quinoa crops originate in the Andean region, its expansion depends on: care in the soil, sowing and efficient control of the possible pests that induce a lower yield in their production and implies great economic losses.

Within the food industry, the study of the antimicrobial activity of alternative substances that allow controlling the safety and quality, the microorganisms show resistance to several compounds is developed. Therefore, the purpose of the present investigation was to evaluate the Antimicrobial and Allelochemical Effect of 2-difluoromethyl-3-methylchromone.

In the allelochemical phase, three species of seeds were used: quinoa (*Chenopodium quinoa* willd), false quinoa (*Chenopodium album*) and holco (*Holcus lanatus*). Solutions of compound A in methanol were prepared obtaining concentrations of: 3.29; 2.39; 1198 and 0.5975 mM, it was contrasted against a blank (H₂O). Should be noted that preliminary trials determined that methanol inhibits the growth of seeds. The response variables were: root growth and percentage of germination, the trials showed that the most viable treatments were: T2 (2.39 mM) and T3 (1198 mM), therefore it is inferred that the concentrations tested show allelochemical effect. The conditions of the germination test were standardized by the use of a germination chamber, which controls the variables of relative humidity and temperature, this research was carried out in the Agency of Regulation and Control Phyto and Zoosanitary AGROCALIDAD.

For the antimicrobial stage, the measurement of an inhibition halo was evaluated, using as a standard gentamicin (10 µg / ml) and three levels of concentrations (100, 10, 1 µg / ml) of compound A. Additionally, the test was carried out in two further components: 3-azidomethyl-2-trifluoromethyl-chromone (compound B), 6-chloro-3-methyl-2-trifluoromethyl-chromone (compound C), which have a close structural relationship with compound A. In addition four types of bacteria were used: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. The results showed that compound C did not exert inhibition in any of the bacteria, compounds A with a concentration of 100 µg / ml and B with concentrations of: 10 and 1 µg / ml, exerted an effect in *Escherichia coli*.

Keywords: 2-difluoromethyl-3-methylchromones, antimicrobial activity, allelochemical effect.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FLUOROQUINOLONAS

Considerados como antimicrobianos sintéticos de amplio espectro, ejercen efecto contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, están constituidos por un ácido 1-sustituido-1,4-dihidro-4-oxopiridin-3-carboxílico. A estos compuestos se les introdujo un átomo de flúor en la posición 6, que permitió mejoras en su estructura, propiedades biológicas y farmacocinéticas (Leyva & Leyva, 2008).

El efecto que ejercen contra bacterias se debe a la inhibición de enzimas encargadas de la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN bacteriano (Leyva & Leyva, 2008). En la Tabla 1 se describe la clasificación de los compuestos mencionados.

TABLA 1. Descripción general de la clasificación de las Fluoroquinolonas

Generación	Fluoroquinolona	Actividad Microbiológica
Primera	Ácido nalidíxico	Enterobacterias
Segunda	Lomefloxacino Norfloxacino	Enterobacterias y gram negativos
Tercera	Levofloxacino, gemifloxacino, gatifloxacino	Enterobacterias, estreptococos, patógenos atípicos.
Cuarta	Moxifloxacino trovafloxacino	Enterobacterias, estreptococos, patógenos atípicos, Staphylococcus aureus meticilino susceptibles, anaerobios.

(Álvarez, Garza, & Vázquez, 2015)

1.2 CROMONAS

Son metabolitos presentes en gran variedad de especies vegetales, están constituidos por un anillo de benceno fusionado a un grupo de 4-pirona, poseen actividad antioxidante y antimicrobiana, debido a enlaces de carbono- fosforo presentes en su estructura. Además la modificación del anillo pirano o furano por un anillo de azol incrementa su actividad biológica La presencia de oxígeno o nitrógeno en su estructura le proporciona características antivirales, antimicrobianas, insecticida y antifungica

(Martínez & López, 2016). En la Figura 1 muestra la estructura general de los tres compuestos utilizados para esta investigación.

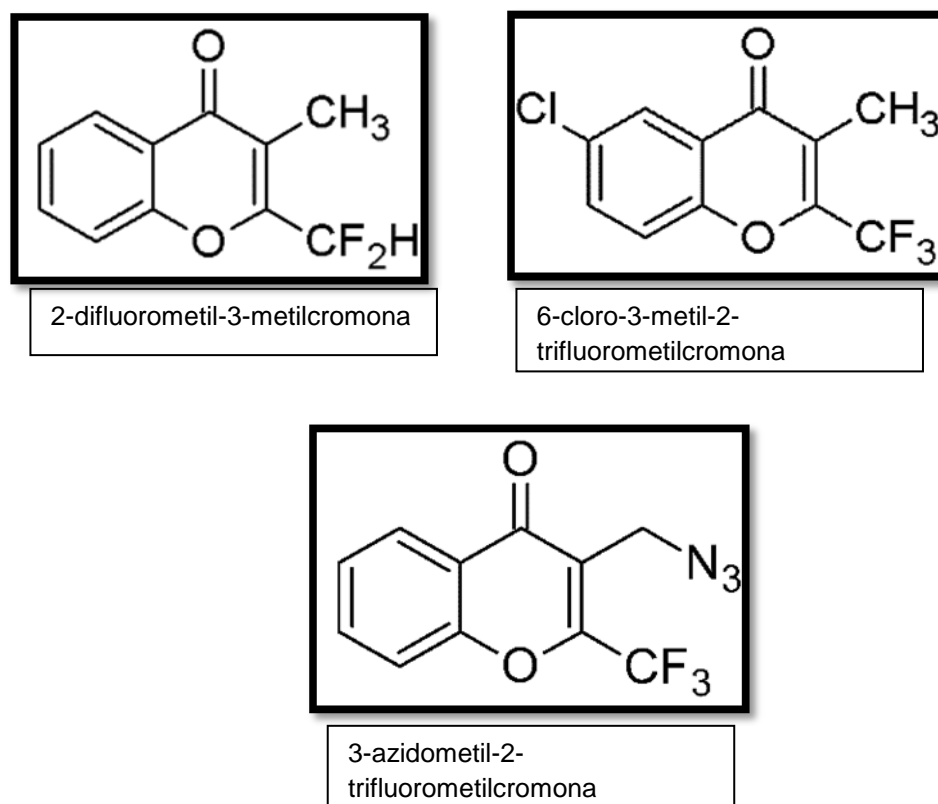


FIGURA 1. Estructura general de los tres compuestos usados en la investigación: 2-difluorometil-3-metilcromona (compuesto A), 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (compuesto B) y 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (compuesto C).

1.3 LA PRODUCCIÓN DE QUINUA EN ECUADOR

La quinua es utilizada desde la época preincaica, denominado grano de oro en la actualidad forma parte de la canasta familiar de las poblaciones rurales de la Cordillera de los Andes. Como característica nutricional relevante está constituido por aminoácidos esenciales, oligoelementos y no contiene gluten, es rico en proteínas, grasas, minerales y carbohidratos, siendo considerado como un alimento completo (Romo, Rosero, Forero, & Céron, 2006).

Ecuador es considerado como un país agrícola, posee gran variedad de cultivos debido a sus variadas características de clima, suelo y ubicación geográfica. Las provincias con mayor producción de este pseudocereal son: Imbabura, Carchi, Cotopaxi y Chimborazo (Basantes, 2015). Además se cuenta con 673 accesiones de quinua en el banco de germoplasma ubicado en la estación experimental Santa Catalina INIAP (Toapanta, 2016). La Figura 2 muestra una fotografía de un cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa willd*), variedad Tunkahuan.



FIGURA 2. Fotografía cultivo de Quinoa (*Chenopodium quinoa* willd), variedad Tunkahuan, Ecuador. (Gandarillas, Rojas, Bonifacio, & Ojeda, 2013)

Sin embargo la quinoa de origen ecuatoriano no es competitiva en cuanto a costos debido a: maquinaria especializada para procesamiento del grano, materiales, insumos agrícolas y mano de obra (Basantes, 2015).

Por otra parte, la disminución en el rendimiento de cultivos de quinoa, afectados por diversas malezas produce pérdidas de hasta el 10 % en el rendimiento (Peralta & Mazón, 2014). Tomando en cuenta, su alto valor nutricional el aumento de su producción y exportación en recientes años, resulta relevante el control de malezas a través de agroquímicos o moléculas selectivas (Basantes, 2015). El estudio del efecto aleloquímico de un nuevo derivado de cromona (2-difluorometil-3-metilcromona), en semillas de quinoa, falsa quinoa y holco busca brindar un primer paso en la evaluación de un potencial agente alelopático para malezas presentes en sus cultivos, con la finalidad de mejorar el rendimiento de los cultivos de quinoa y la calidad del producto. La Figura 3 muestra la descripción geográfica de cultivos de quinoa en el Ecuador.



FIGURA 3. Descripción geográfica de cultivos de quinoa (*Chenopodium quinoa* willd) en el Ecuador (Gandarillas et al., 2013).

1.4 GERMINACIÓN DE LA QUINUA

La semilla de quinua en óptimas condiciones de humedad, oxígeno y temperatura, así como sus propiedades intrínsecas en cuanto a tamaño, contenido de compuestos hidratables y permeabilidad de la cubierta al agua y oxígeno, permiten que germine rápidamente, siendo el agua el principal componente de iniciación para este proceso (Carciochi & Manrique, 2014).

En cuanto al proceso de germinación, la radícula es la primera en brotar, esta se alarga dentro del suelo permitiendo la formación del sistema radicular, el tiempo de germinación es de 3 a 8 días (Carciochi & Manrique, 2014)

1.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS MALEZAS

La falsa quinua (*Chenopodium álbum*), considerada como maleza resistente, invade todo tipo de cultivo, tiene un sistema radicular profundo y transpira en contraste más agua que la quinua, provocando que el suelo quede seco, justo en el momento que la quinua necesita agua para su proceso de crecimiento (Cualchi, 2015). Esta planta germina bajo condiciones ambientales y produce gran cantidad de semillas que se almacenan en el suelo.

Por otra parte, el holco (*Holcus lanatus*), es una hierba que crece en suelos con pH bajo y húmedos, es considerada una especie de bajo valor nutritivo y poco apetecida, su periodo de vida es corto, tiene la capacidad de crecer en estaciones de frío y calor, permaneciendo como planta o semilla, ya que posee un sistema radicular agresivo que le permite adaptarse a todo tipo de suelo y aprovechar los nutrientes (Cualchi, 2015). La Figura 4 ilustra fotografías de las malezas descritas anteriormente.



Holco (*Holcus lanatus*)



Falsa quinua (*Chenopodium álbum*)

Figura 4. Fotografías de malezas holco (*Holcus lanatus*) y falsa quinua (*Chenopodium álbum*) (Cualchi, 2015).

1.6 MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

En la industria alimentaria pueden darse enormes pérdidas económicas debido a la presencia de microorganismos, que no solo deterioran el producto sino que causan enfermedades en el consumidor. Los alimentos durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o consumo, pueden contaminarse de algún patógeno. Entre los más vulnerables tenemos pescados y mariscos, productos cárnicos y avícolas, productos lácteos, vegetales, huevos frescos (Rojas & González, 2006).

Los microorganismos se clasifican como benéficos y patógenos, se considera como benéfico al responsable de un cambio deseado en cuanto a características organolépticas, aporte nutricional y composición química, mientras que un patógeno es causante de transmitir enfermedades por la ingesta de alimentos contaminados (Enfermedad Transmitida por Alimentos: ETA). (Salcido & Corona, 2010).

Existen dos tipos de ETA: aquellas que producen una infección alimentaria producida por la ingesta de alimentos o agua contaminados con agentes infecciosos como: bacterias, virus, hongos y parásitos, que generan toxinas dentro del organismo, o aquellas que producen una intoxicación alimentaria causada por la ingesta de toxinas formadas por plantas, animales o producidas por microorganismos que se mezclan de manera accidental durante su proceso de producción hasta su consumo.

Entre las bacterias patógenas más comunes tenemos *Escherichia coli*, *Salmonella typhymurium* y *Campylobacter jejuni*. (Rojas & González, 2006). En este sentido, en la presente tesis se evaluó el efecto antimicrobiano de tres compuestos **A**, **B** y **C** que no se han reportado en la literatura, experimentados en cuatro tipos de bacterias mencionadas. La Tabla 2 detalla algunas enfermedades comunes transmitidas por microorganismos.

TABLA 2. Enfermedades transmitidas por alimentos

Microorganismo	Enfermedad	Alimentos
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Toxico infección Alimentaria	Carne picada
<i>Listeria monocytogenes</i>	Infección Alimentaria	Carne y lácteos
<i>Salmonella spp.</i>	Infección Alimentaria	Aves, carnes, lácteos y huevos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicación Alimentaria	Carnes y postres
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Infección Alimentaria	Vegetales,

(Madigan et al., 2009)

1.6.1 BIOLOGÍA DE MICROORGANISMOS

Staphylococcus aureus son cocos pequeños, gram positivos considerados como patógenos oportunistas, este microorganismo se asocia con una intoxicación alimentaria y produce siete enterotoxinas diferentes. Al hablar de una Salmonelosis nos referimos a una enfermedad gastrointestinal provocada por *Salmonella spp.*, es una bacteria gram negativa aeróbica facultativa, su hábitat es el intestino de los animales y aguas residuales (Madigan et al., 2009). La *Escherichia coli*, es una bacteria pequeña, alargada, Gram negativa, existen 200 cepas patógenas conocidas clasificadas de acuerdo a la toxina que producen y a la enfermedad que causan. De igual manera la Listeriosis es una infección gastrointestinal causada por la *Listeria monocytogenes*, es una bacteria ácido tolerante a sales, criotolerante y anaeróbica facultativa, bacilo gram positivo, pequeño, alargado (Madigan et al., 2009).

En cuanto a la *Pseudomona aureginosa* es una bacteria gram negativa con un tamaño de 2 - 4 x 0.5 - 1 micras, considerada aerobio (pero puede desarrollarse en condiciones anaerobias en presencia de nitrato). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, puede tolerar de 45 a 50 °C, presenta resistencia a: cloro, cloraminas y yodo; para el caso de antimicrobianos penicilina de amplio espectro (ticarcilina, azlocina, piperacilina), aminoglucocidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas (Madigan et al., 2009).

1.6.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Los microorganismos pueden sobrevivir y adaptarse a varias condiciones adversas como temperatura, oxígeno, presencia de luz, siendo su tiempo de reproducción más rápido que la del humano (González, 2013).

Además tienen gran capacidad de resistencia a cualquier antibiótico, está puede desarrollarse durante el uso de un fármaco, la bacteria podrá desarrollar resistencia antimicrobiana debido a su variación genética y se basa en tres niveles: fase microevolucionario (mutación en pares de nucleótidos), fase macroevolucionario (variabilidad genómica) y una adquisición de ADN de otra bacteria. Una vez que se presente una cepa con resistencia antimicrobiana esta se esparce a las demás bacterias a través de: transformación, transducción, conjugación o transposición (Martin, 2002).

A partir del descubrimiento de los antibióticos, varios microorganismos han sido capaces de eludir la acción destructiva, por ejemplo: las cepas de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, reflejándose un incremento en la resistencia antimicrobiana, por tanto se ha desarrollado varias estrategias para prevenir o sostener este incremento, entre estas

tenemos métodos microbiológicos que permiten identificar la sensibilidad antimicrobiana como lo es el método de difusión en agar. Este consiste en el uso de discos de antibióticos (Padgett et al., 2011)., esto permite mejores diagnósticos y la administración de drogas específicas para el tratamiento de enfermedades.

Por otra parte, *Escherichia coli*, es la bacteria más representativa de la microbiota del intestino humano y animal, considerada como un microorganismo identificador de la seguridad e higiene alimentaria, sus cepas de origen humano y animal reflejan resistencia antimicrobiana a varios antibióticos como: ampicilina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, tetraciclina y estreptomina (Puig, Espino, & Leyva, 2011).

1.6.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Se ha demostrado avances considerables que permiten comprender la evolución en cuanto a resistencia de microorganismos a fármacos, en el caso de bacterias gram negativas, esporas bacterianas, mico bacterias su resistencia es intrínseca, es decir es una propiedad natural del organismo. Son resistentes a antisépticos y desinfectantes, poseen una membrana externa que restringe el paso de varios agentes antibacterianos (Cabrera, Gómez, & Zúñiga, 2007). En la Tabla 3 se detalla varios ejemplos de bacterias que muestran resistencia innata a antibióticos.

TABLA 3. Ejemplos de bacterias que presentan resistencia innata a antibióticos

ANTIBIÓTICO	CEPA CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
Penicilina	<i>Pseudomonas spp.</i> (excepto ureidopenicilina)
Cefalosporinas	<i>Enterococcus spp.</i>
Carbapenemes	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Aztreonam	<i>Bacterias gram positivas</i>
Aminoglicósidos	<i>Bacterias anaeróbicas, Enterococcus spp.</i>
Macrólidos	<i>Enterobacteriaceae</i>
Tetraciclinas	<i>Pseudomona spp.</i>
Glicopéptidos	<i>Bacterias Gram negativas</i>

(Cabrera et al., 2007)

Un microorganismo puede presentar resistencia inherente al antibiótico si el organismo carece de la estructura como es el caso de las micoplasmas que

muestran resistencia a la penicilina, también el organismo puede presentar impermeabilidad o pueden alterar el antibiótico inactivándolo mediante sus enzimas presentes. Las bacterias poseen enzimas betaláctamicas las cuales actúan como mecanismo de defensa ante un antibiótico y estas son: penicilinasas, betalactamasas, cefalosporinasas, oxacilinasas. A medida que un antibiótico evoluciona con rapidez de la misma manera lo hacen las bacterias, incrementando su mecanismo de resistencia (Cabrera et al., 2007).

Dentro del procesado de alimentos, se debe tener control desde la producción primaria de animales, las fases de tratamiento y preparación de los mismos, una inadecuada administración en la dosis de antibióticos, pueden generar que los microorganismos presentes desarrollen resistencia al mismo. El presente trabajo de investigación tiene como finalidad evaluar el efecto antimicrobiano de tres compuestos (**A**, **B** y **C**), a través de ensayos de actividad antimicrobiana, en contra de bacterias indicadoras de calidad sanitaria o que son transferidas en la manipulación de alimentos, como *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureginosa*.

El objetivo general del presente trabajo experimental fue:

- Determinar el efecto antimicrobiano y aleloquímico de 2-difluorometil-3-metilcromona (**A**)

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Evaluar el potencial antimicrobiano in vitro de 2-difluorometil-3-metilcromona (**A**), 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (**B**) y 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (**C**). en contra de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureginosa*.
- Evaluar las propiedades aleloquímicas de 2-difluorometil-3-metilcromona (A) en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa willd*), falsa quinua (*Chenopodium album*) y holco (*Holcus lanatus*).

2. METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES (Ensayo Aleloquímico)

2.1.1 MATERIAL EXPERIMENTAL

Para el ensayo aleloquímico se usaron tres tipos de semillas: falsa quinua (*Chenopodium, álbum*), holco (*Holcus lanatus*), estas fueron recolectadas en un lote de quinua, en el cantón Mejía, provincia Pichincha y la quinua certificada (*Chenopodium quinoa willd*), variedad TUNKAHUAN, fueron proporcionadas por el INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, sector Cutuglagua, cantón Mejía, provincia Pichincha. Además de 2-difluorometil-3-metilcromona (**compuesto A**).

2.1.2 INSTRUMENTOS, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

2.1.2.1 Instrumentos

Para el proceso experimental se utilizó: pinzas metálicas, pipetas (5 ml), balanza analítica, papel filtro cualitativo, cajas petri, lupa, cinta Parafilm, vasos de precipitación (10, 25 ml) y balones volumétricos (50, 25 ml).

2.1.2.2 Reactivos

Utilizamos tres reactivos: DMSO (Dimetilsulfoxido), metanol y agua destilada (tipo 2).

2.1.2.3 Equipos de Laboratorio

Se requirió el uso de: Sorbona de Extracción, Cámara de flujo laminar y Cámara germinadora.

2.2 MATERIALES (Actividad Antimicrobiana)

2.2.1 MATERIAL EXPERIMENTAL

En cuanto a esta fase experimental se utilizó cuatro tipos de bacterias: *Escherichia coli* (25922), *Pseudomonas spp.* (27853), *Staphylococcus aureus* (29213) y *Salmonella spp.* (14028). Además de los compuestos: 2-difluorometil-3-metilcromona (**compuesto A**), 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (**compuesto B**) y 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (**compuesto C**).

2.2.2 INSTRUMENTOS, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

2.2.2.1 Instrumentos

Balanza, mechero bunsen, gradillas, cajas petri, frascos Autoclavables, cinta Parafilm, refrigerador, discos sin antibiótico, escala McFarland (0.5), cocineta, pinzas, tubos de ensayo (20 ml), vasos de precipitación (10, 25, 50 ml), Micropipetas, hisopos, marcadores, discos de gentamicina (10 mg), paletas y guantes de calor.

2.2.2.2 Reactivos

Agar Mueller Hinton, DMSO (Dimetilsulfóxido), agua destilada (tipo 2) y cloruro de sodio (pureza 99.5 %).

2.2.2.3 Equipos de Laboratorio

Cámara de Flujo Laminar, estufa de Incubación y autoclave.

2.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ALELOQUÍMICO

2.3.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Se pesó 0.0126 g de 2-difluorometil-3-metilcromona, en un balón volumétrico de 100 ml y se aforó con metanol. Para solubilizar el compuesto se utilizó ultrasonido por un período de 10 a 15 min. La solución resultante dio una concentración de 3.29 mM. A partir de esta solución patrón se realizó tres diluciones para llegar a concentraciones de 2.39 mM, 1.19 mM y 0.59 mM. Además se preparó un blanco de metanol.

2.3.2 ENSAYO DE GERMINACIÓN

Las soluciones de concentración 3.29; 2.39; 1.198 y 0.597 mM, fueron dosificadas en cajas petri que contenían un disco de papel filtro del diámetro interno de la caja petri. Se evaporó el metanol con la asistencia de una cámara de flujo laminar durante una hora. El procedimiento tuvo como finalidad impregnar de manera homogénea dosis de diferente concentración del compuesto **(A)** en el papel filtro. Posterior a este procedimiento en cada caja petri se agregó 20 semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), falsa quinua (*Chenopodium*, álbum) y holco (*Holcus lanatus*). Luego, se agregó 2.5 ml de agua destilada tipo 2 en cada caja Petri y se colocó las cajas en una cámara germinadora. El tiempo de germinación para las semillas de quinua fue de siete días y para el holco y falsa quinua de quince días.

2.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO

2.4.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Se solubilizó previo al ensayo de actividad antimicrobiana los compuestos: 2-difluorometil-3-metilcromona (**A**), 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (**B**) y 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona (**C**), utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como disolvente. Se pesó 0.0100 g de los compuestos (**A**, **B** y **C**) respectivamente en un balón volumétrico de 10 ml, se aforó con DMSO y se utilizó ultrasonido de 10 a 15 min para ayudar en el proceso desolubilización. Se obtuvo concentraciones de (100, 10 y 1 µg/ml), además se usó discos de gentamicina (10 µg/ml) como estándar, este antibiótico fue utilizado por su composición química y uso para combatir infecciones producidas por cepas de microorganismos.

2.4.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS

2.4.2.1 Solución Salina

Se pesó 0.9 g de cloruro de sodio (pureza 99.5 %) en 100 ml de agua destilada (tipo 2), se dosificó 9 ml de solución en 20 tubos de ensayo y se esterilizó.

2.4.2.2 Caldo Nutritivo

Se pesó 1.6 g en 200 ml de agua destilada (tipo 2), se calentó hasta disolver y se vertió en 10 tubos de ensayo de 20 ml.

2.4.2.3 Agar Mueller Hinton

Se pesó 22.8 g de agar en 600 ml de agua destilada (tipo 2), se calentó con agitación constante durante un minuto, se esterilizó y dosificó en 30 cajas Petri.

2.4.3 ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES

Utilizando un autoclave se esterilizó por una hora a 15 PSI, el material que se usó en el antibiograma: 30 cajas petri, medios de cultivo, solución salina, hisopos, instrumentos, tips y discos de papel de 1 cm de diámetro para dosificar las concentraciones de los compuestos A, B y C.

2.4.4 RESIEMBRA DE CEPAS PURAS

Para este ensayo se contó con cuatro tipos de cepas en estado puro, se efectuó una resiembra para ello, se desinfectó el área de trabajo a utilizar, se

tomó un asa de siembra, previamente esterilizada en un mechero Bunsen, se inoculó la cepa pura de cada bacteria y se sembró por depósito en 15 ml de caldo nutritivo. Todo este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar y se incubó a una temperatura de 37 °C, por 24 h.

2.4.5 EFECTO ANTIMICROBIANO (MÉTODO KIRBY-BAUER)

Para identificar el efecto de los tres componentes (A, B y C) en *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp*, se emplearon las técnicas descritas en el protocolo de prueba para la difusión de susceptibilidad de disco, basado en el Método Kirby Bauer (método de difusión en agar) (Ramirez & Castaño, 2009). Se evidenció la sensibilidad bacteriana, a través del depósito de discos de papel secante impregnados con concentraciones (100, 10 y 1 µg/ml) de los compuestos (A, B y C) respectivamente, en la superficie de agar de una caja Petri previamente lista con agar Mueller Hinton e inoculada con el microorganismo. Se realizó un triplicado de cada cepa inoculada versus los discos de Gentamicina (10 µg/ml), se incubó a 37 °C por 24 horas.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la influencia alelopática del compuesto 2-difluorometil-3-metilcromona, en la germinación y crecimiento radicular de las semillas de quinua, falsa quinua y holco; se determinó las variables de diseño: como variable independiente se tomó los cuatro tipos de concentraciones de la solución y la especie de semilla y como variable dependiente o respuesta está el porcentaje de germinación y crecimiento radicular. Se eligió un diseño factorial dos factores (axb).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EFECTO ALELOQUÍMICO

3.1.1 RESULTADOS DE CRECIMIENTO RADICULAR

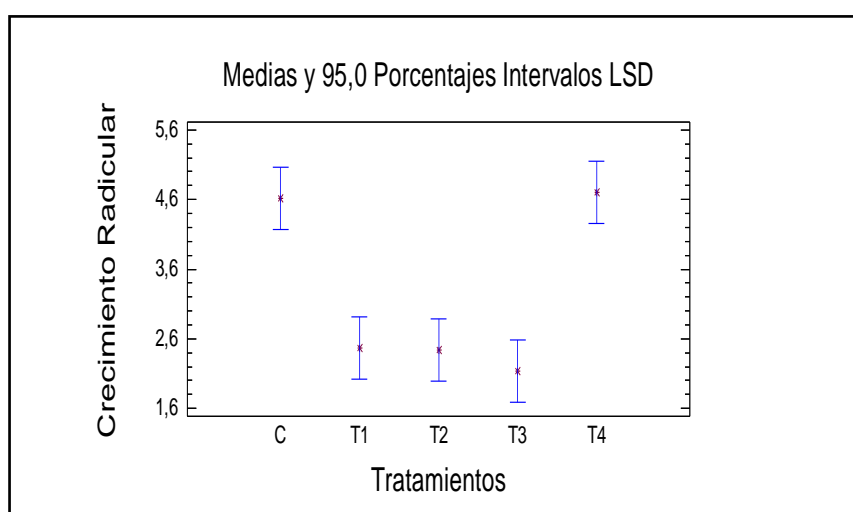
De acuerdo al diseño experimental (axb) utilizado, los resultados muestran que los factores analizados manifestaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta (crecimiento radicular), con un $P < 0.05$. Es decir que las tres concentraciones del compuesto **A** frente al blanco muestran un efecto estadístico diferente sobre las tres semillas estudiadas. La Tabla 4 detalla resultados obtenidos de acuerdo al diseño experimental (a x b) aplicado.

TABLA 4. ANOVA arreglo factorial para evaluar crecimiento radicular en semillas de Quinoa (*Chenopodium quinoa willd*), aplicando 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y el blanco. Tumbaco-Pichincha 2017.

Fuente de Variabilidad	SC	GL	Cuadrado medio	Cociente F	P-Valor
Entre grupos	193.817	4	48.4543	15,73	0.0000
Intra grupos	446.585	145	3.0799		
Total	640.402	149			

Diferencia estadística al 5%
Nivel de confianza 95%

La Figura 5 muestra el gráfico de medias y 95% de Fisher LSD, de la semilla de quinua (*Chenopodium quinoa willd*) aplicado el compuesto **A**.



(*) C (blanco); T1 (3.29 mM); T2 (2.39 mM); T3 (1.198 mM); T4 (0.597 mM)

FIGURA 5. Crecimiento radicular de la especie de semilla quinua, variedad TUNKAHUAN.

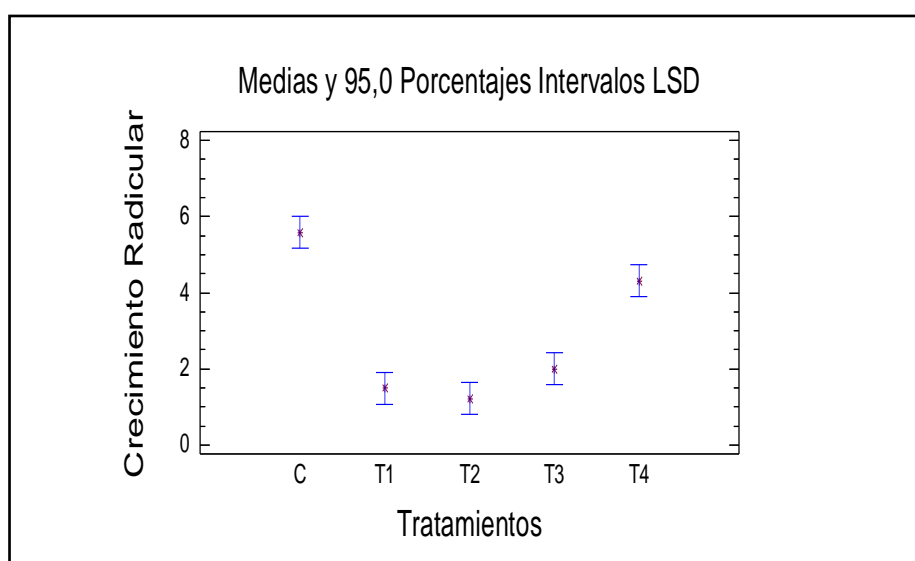
La Tabla 5 detalla resultados del diseño experimental (a x b) utilizado.

TABLA 5. ANOVA arreglo factorial para evaluar crecimiento radicular en semillas de falsa quinua (*Chenopodium álbum*), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y el blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.

Fuente de Variabilidad	SC	GL	Cuadrado medio	Cociente F	P-Valor
Entre grupos	443.934	4	110.983	40.96	0.0000
Intra grupos	392.924	145	2.70982		
Total	836.857	149			

Diferencia estadística al 5%
Nivel de confianza 95%

La Figura 6 muestra gráfico de medias y 95% de Fisher LSD, de la semilla de falsa quinua (*Chenopodium album*) aplicado el compuesto A.



(*) C (blanco); T1 (3.29 mM); T2 (2.39 mM); T3 (1.198 mM); T4 (0.597 mM)

FIGURA 6. Crecimiento radicular de la especie de semilla falsa quinua (*Chenopodium album*).

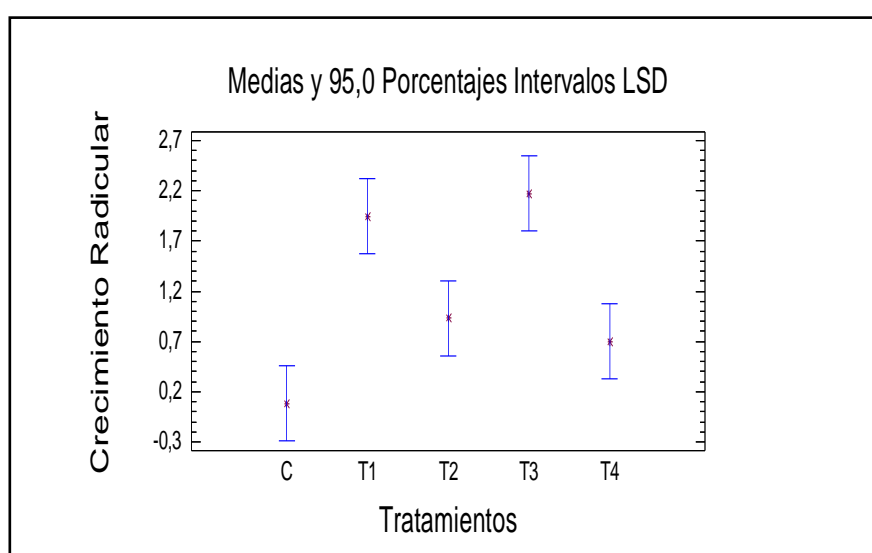
La Tabla 6 detalla resultados del diseño experimental (a x b) utilizado.

TABLA 6. ANOVA arreglo factorial para evaluar crecimiento radicular en semillas de Holco (*Holco lanatus*), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y el blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.

Fuente de Variabilidad	SC	GL	Cuadrado medio	Cociente F	P-Valor
Entre grupos	91.7184	4	22.9296	10.75	0.0000
Intra grupos	309.341	145	2.13339		
Total	401.06	149			

Diferencia estadística al 5%
Nivel de confianza 95%

La Figura 7 muestra el gráfico de medias y 95% de Fisher LSD, de la semilla de holco (*Holcus lanatus*) aplicado el compuesto **A**.



(*) C (blanco); T1 (3.29 mM); T2 (2.39 mM); T3 (1.198 mM); T4 (0.597 mM)

FIGURA 7. Crecimiento radicular de la especie de semilla holco (*Holcus lanatus*).

Los resultados muestran que las concentraciones T1 (3.29 mM), T2 (2.39 mM), y T3 (1.198 mM) ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento radicular en quinua y falsa quinua (Figura 5 y 6), respectivamente.

Por otra parte en holco (Figura 7) se observa que los tratamientos T2 (2.39 mM) y T4 (0.597 mM) muestran disminución del crecimiento radicular. Sin embargo no se observó ningún efecto en el blanco, como se menciona en la literatura revisada, las semillas deben cumplir con un 100 % de viabilidad,

esto permitirá que la semilla germine y por ende se dé un crecimiento radicular adecuado.

En este sentido disminuir específicamente el crecimiento de las malezas ayudaría al agricultor a realizar un uso racional y eficiente del agua durante su cultivo, evitando que posibles malezas como: falsa quinua y holco invadan y absorban de manera rápida el agua debido a su sistema radicular (Toapanta, 2016).

Pero este factor (crecimiento radicular) no solo depende de la cantidad de agua sino también de los nutrientes del suelo y de las condiciones climáticas, por ejemplo en el caso de sequía el desarrollo radicular es a más profundidad pero si existe humedad la radícula se acercará a la superficie del cultivo (Toapanta, 2016).

3.1.2 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

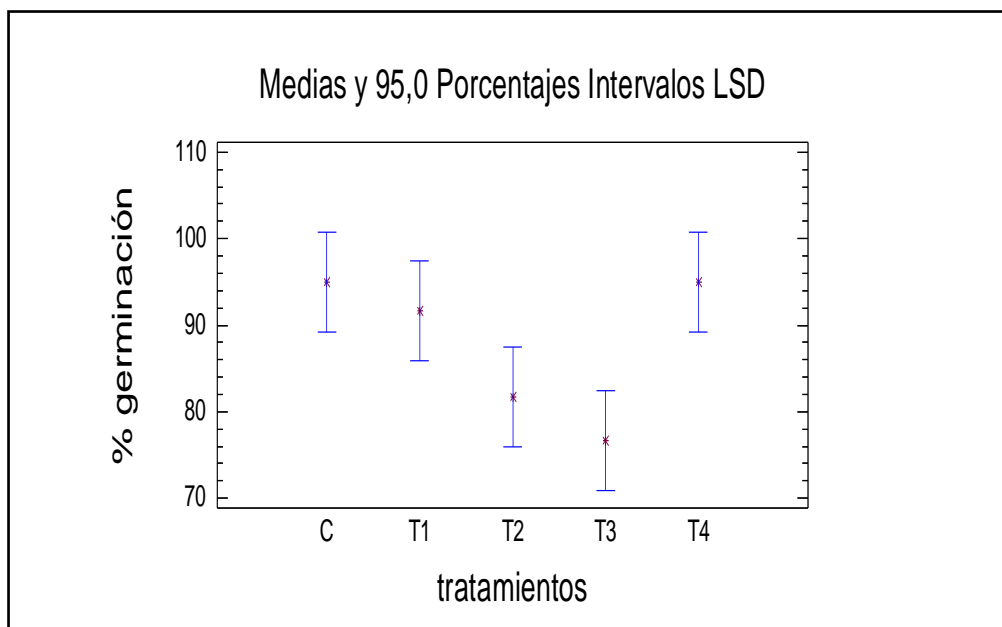
El diseño experimental (axb) utilizado, mostró que los factores analizados manifestaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta (porcentaje de germinación), con un $P < 0.05$. Es decir que las tres concentraciones distintas del compuesto **A** y blanco ejercen un efecto estadísticamente diferente sobre las tres semillas. La Tabla 7 detalla resultados obtenidos de acuerdo al diseño experimental (a x b) aplicado.

TABLA 7. ANOVA arreglo factorial para evaluar porcentaje de germinación en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* willd), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y un blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.

Fuente de Variabilidad	SC	GL	Cuadrado medio	Cociente F	P-Valor
Entre grupos	840.0	4	210.0	5.25	0.0153
Intra grupos	400.0	10	40.0		
Total	1240.0	14			

Diferencia estadística al 5%
Nivel de confianza 95%

La Figura 8 muestra gráfico de medias y 95.0 porcentajes de Intervalos LSD, en semillas de quinua, variedad Tunkahuan aplicado el compuesto A.



(*) C (blanco); T1 (3.29 mM); T2 (2.39 mM); T3 (1.198 mM); T4 (0.597 mM)

FIGURA 8. Porcentaje de germinación de la especie de semilla Quinua, variedad Tunkahuan

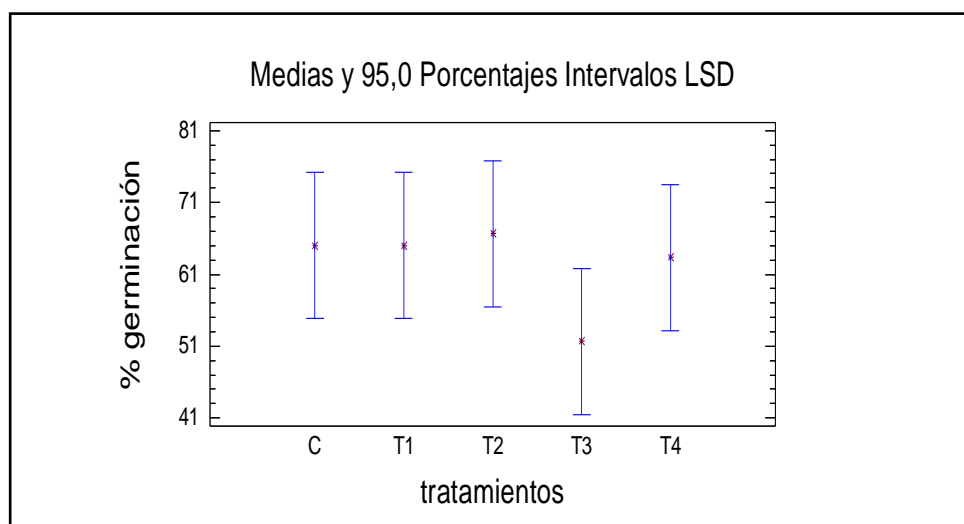
La Tabla 8 detalla resultados obtenidos de acuerdo al diseño experimental (a x b) aplicado.

TABLA 8. ANOVA arreglo factorial para evaluar porcentaje de germinación en semillas de falsa quinua (*Chenopodium álbum*), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y un blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.

Fuente de Variabilidad	SC	GL	Cuadrado medio	Cociente F	P-Valor
Entre grupos	10.1333	2	5.06667	1.06	0.3782
Intra grupos	57.6	12	4.8		
Total	67.7333	14			

No existe diferencia estadística al 5%

La Figura 9 muestra gráfico de medias y 95.0 porcentajes de Intervalos LSD, en semillas de falsa quinua (*Chenopodium album*) aplicado el compuesto A.



(*) C (blanco); T1 (3.29 mM); T2 (2.39 mM); T3 (1.198 mM); T4 (0.597 mM)

FIGURA 9. Porcentaje de germinación de la especie de semilla falsa quinua (*Chenopodium album*)

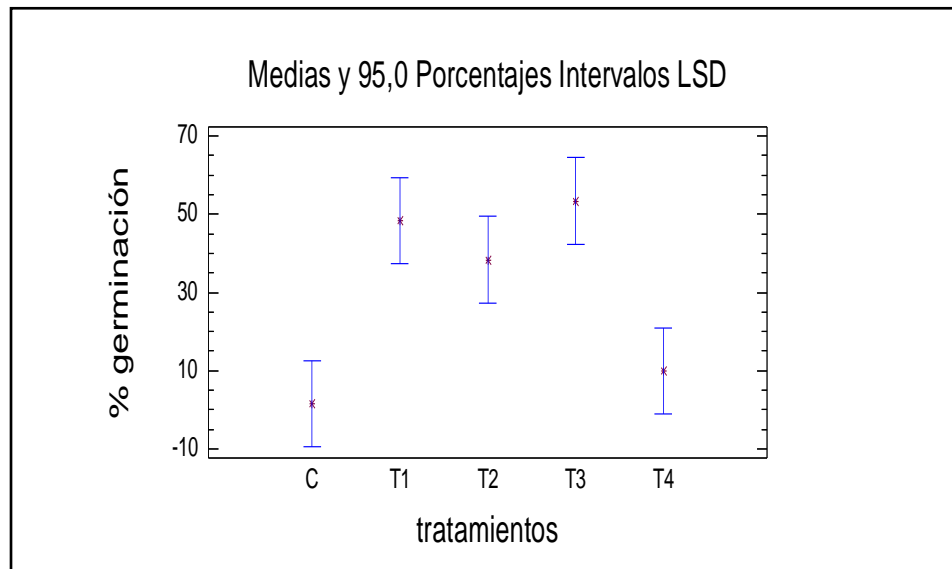
La Tabla 9 detalla resultados obtenidos de acuerdo al diseño experimental (a x b) aplicado.

TABLA 9. ANOVA arreglo factorial para evaluar porcentaje de germinación en semillas de Holco (*Holcus lanatus*), aplicando el compuesto (A) 2-difluorometil-3-metilcromona en tres concentraciones diferentes y un blanco. Tumbaco – Pichincha 2017.

Fuente de Variabilidad	SC	GL	Cuadrado medio	Cociente F	P-Valor
Entre grupos	6456.67	4	1614.17	11.01	0.0011
Intra grupos	1466.67	10	146.667		
Total	7923.33	14			

Diferencia estadística al 5%
Nivel de confianza 95%

La Figura 10 muestra gráfico de medias y 95.0 porcentajes de Intervalos LSD, en semillas de holco (*Holcus lanatus*) aplicado el compuesto A.



(*) C (blanco); T1 (3.29 mM); T2 (2.39 mM); T3 (1.198 mM); T4 (0.59 mM)

FIGURA 10. Porcentaje de germinación de la especie de semilla holco (*Holcus lanatus*)

De acuerdo a los gráficos expuestos muestran una relación entre las dos variables, de acuerdo a la literatura revisada indica que una planta primero germina para empezar a denotar un crecimiento en su sistema radicular. Por ende los tratamientos T2 (2.39 mM) y T3 (1.198 mM) son los más óptimos con un 51 y 75 % de disminución en quinua y falsa quinua.

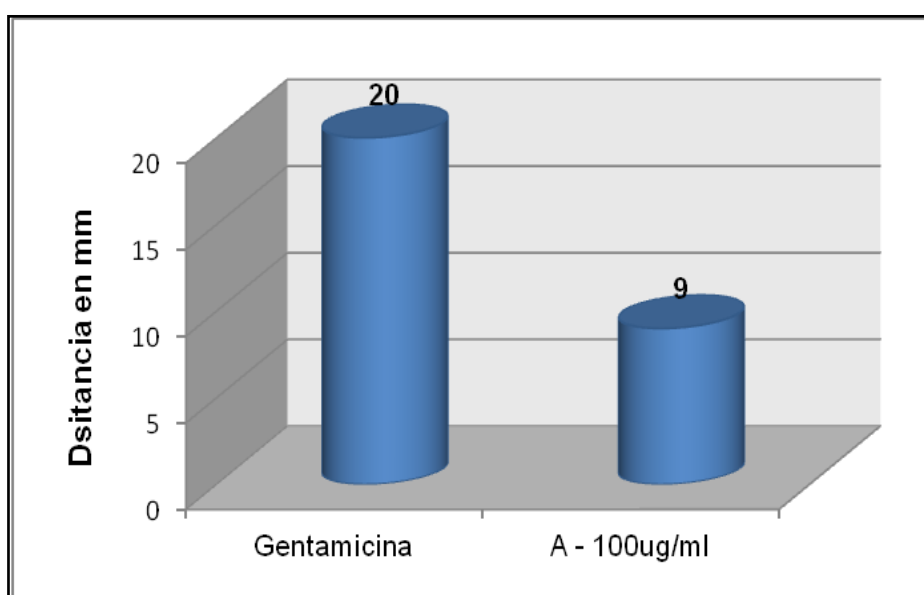
En cuanto a la semilla de holco de acuerdo (Figura 10), el tratamiento T4 (0.597 mM) refleja una disminución del 10 % en el porcentaje de germinación; sin embargo nótese que el blanco no mostro resultado es decir las semillas no cumplen con una viabilidad acorde a la investigación.

Para alcanzar una germinación adecuada, es indispensable contar con condiciones ambientales favorables como: un sustrato húmedo, disponibilidad de oxígeno (respiración aerobia) y una temperatura adecuada (Ramos, 2010). Además una semilla debe cumplir con factores internos como: madurez, viabilidad y condición genética y factores externos como: humedad, temperatura.

Cabe señalar que los ensayos se realizaron en una cámara germinadora, por ello los resultados expuestos se atribuye a que las semillas de holco recolectadas no cumplieron con un 100 % de viabilidad.

3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

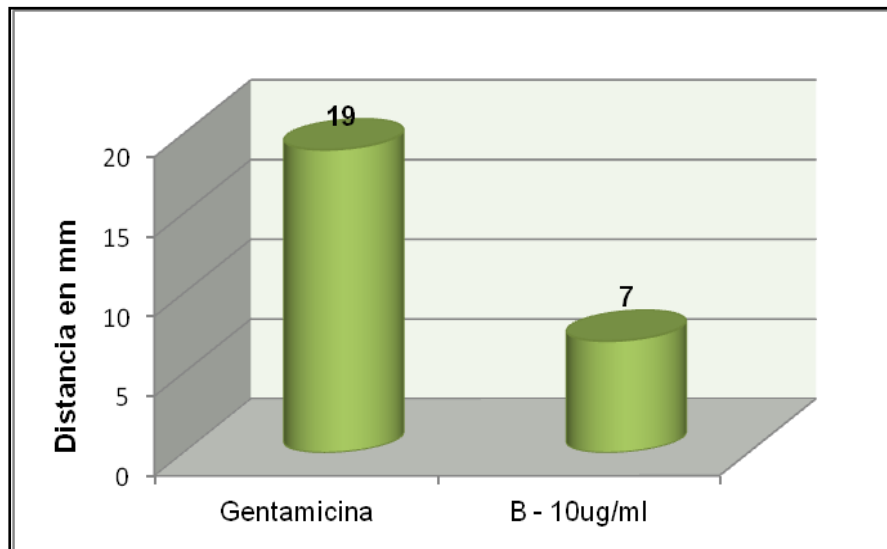
El estudio de actividad antimicrobiana mostró que el compuesto **C** (3-azidometil-2-trifluorometilcromona) no tuvo un efecto antimicrobiano en ninguna de las cuatro bacterias estudiadas. Respecto al compuesto **A** (2-difluorometil-3-metilcromona) y **B** (6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona), las concentraciones demostraron inhibición en *Escherichia coli*. Para el compuesto **A** (2-difluorometil-3-metilcromona), la concentración que tuvo efecto fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ y para el compuesto **B** (6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona), las concentraciones 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$ muestran inhibición, observándose halos con una medida de 9 y 7 mm. La Figura 11 muestra grafico del análisis estadístico aplicado en datos obtenidos en fase antimicrobiana.



(*) Desviación Estándar: gentamicina (0.55); compuesto A (0.32)

FIGURA 11. Distancia (mm) de halo de inhibición de 2-difluorometil-3-metilcromona a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, comparado con el estándar gentamicina de 10 $\mu\text{g/ml}$.

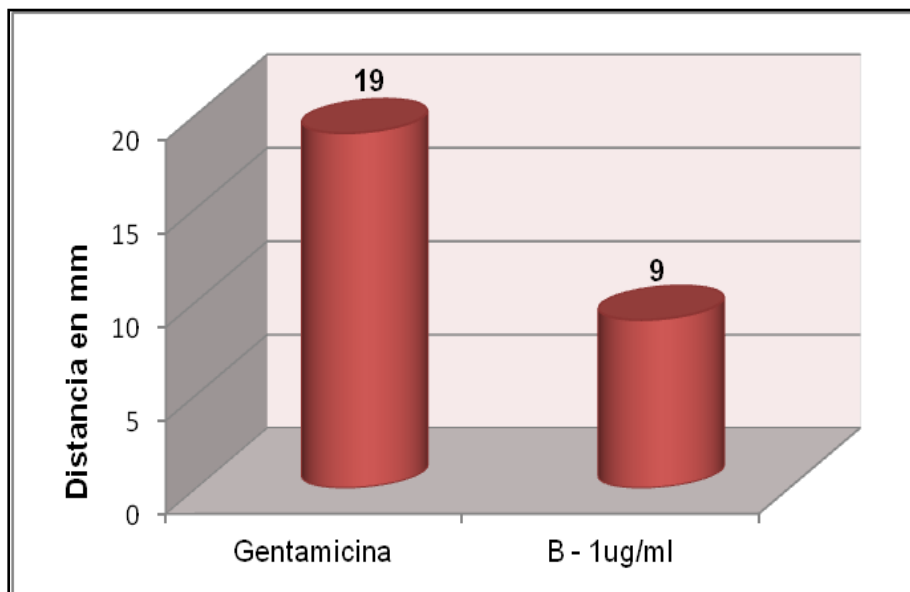
La Figura 12 muestra grafico del análisis estadístico aplicado en datos obtenidos en fase antimicrobiana.



(*) Desviación Estándar: gentamicina (0.55), compuesto B (0.27).

FIGURA 12. Distancia (mm) de halo de inhibición de 6-cloro-3-metil-2trifluorometilcromona a una concentración de (10 ug/ml), comparado con el estándar gentamicina (10 µg/ml).

La Figura 13 muestra grafico del análisis estadístico aplicado en datos obtenidos en fase antimicrobiana.



(*) Desviación Estándar: gentamicina (0.57), compuesto B (0.37)

FIGURA 13. Distancia (mm) de halo de inhibición de 6-cloro-3- metil-2trifluorometilcromona a una concentración de (1 ug/ml), comparado con el estándar gentamicina (10 µg/ml).

La *Escherichia coli*, es considerada como la bacteria representativa en el campo alimenticio, por ser una de las más resistentes a desinfectantes, detergentes y antibióticos (González, 2013). Tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas hasta los 50 °C, son termoresistentes pero a través de un tratamiento térmico a 65 °C se las puede eliminar en su totalidad.

La Figura 12 muestra inhibición del compuesto **B** en contra de *Escherichia coli* a una concentración 10 veces inferior respecto al estándar de gentamicina. Tomando en cuenta que esta bacteria presenta resistencia a antibióticos como: ampicilina, cefalosporinas de primera generación, cotrimoxazol, ciprofloxacina, el compuesto presenta un resultado interesante de actividad antimicrobiana. La inhibición podría atribuirse a los sustituyentes difluorometilo (-CF₂) y trifluorometilo (-CF₃). Por ello es conocido el efecto que produce introducir átomos de flúor en la estructura como el caso de la fluoroquinolonas (Álvarez et al., 2015). Estos compuestos presentan mejores propiedades farmacocinéticas, al inhibir las enzimas encargadas de la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN bacteriano.

Para el caso de las bacterias que no presentaron inhibición, frente a los compuestos **A**, **B** y **C**, la literatura revisada acerca de la resistencia microbiana menciona que la *Pseudomona aureginosa*, es una bacteria que posee una cápsula como medio de defensa ante un antibiótico, pero es muy sensible a penicilinas de amplio espectro (ticarcilina, azlocilina y piperacilina), aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, polimixinas, monobactámicos. En cuanto a *Staphylococcus aureus* es considerado como un anaerobio facultativo, posee gran capacidad de sobrevivencia debido a su cápsula polisacarida y a la producción de enzimas coagulasa, catalasa e hialurodinasa, esta bacteria es sensible a fluoroquinolonas de cuarta generación como: moxifloxacino y trowafloxacino (Carrillo, Flores, & Rodríguez, 2018).

Para finalizar la *Salmonella*, posee un mecanismo de resistencia, debido a dos factores: captación del nuevo material genético y mutaciones en el cromosoma bacteriano; son microorganismo resistentes a cloranfenicol, ampicilina, trimetropima-sulfametoxazol y fluoroquinolonas. Suelen presentar sensibilidad, pero sus cepas adquieren multiresistencia a estos compuestos debido al uso de los mismos en animales de consumo (Junod, López, & Gädicke, 2013).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- El compuesto **A** (2-difluorometil-3-metilcromona) presentó un efecto alelopático de disminución en el crecimiento radicular y porcentaje de germinación en dos especies de semillas, quinua y holco. Las concentraciones más óptimas fueron T2 (2,39 mM) y T3 (1,198mM).
- Las dos variables de respuesta (crecimiento radicular y porcentaje de germinación) de acuerdo al diseño experimental expresaron variación en sus resultados. Para el crecimiento radicular las tres semillas tuvieron inhibición pero en cuanto al porcentaje de germinación solo se obtuvo un efecto alelopático en las semillas de quinua y holco, mostrando que la falsa quinua considerada como la maleza más destructiva de los cultivos es resistente al las concentraciones ensayadas del compuesto **A**.
- De las tres semillas estudiadas y de acuerdo a los resultados obtenidos por el análisis de la varianza (ANOVA), la quinua variedad Tunkahuan, denoto más viabilidad en la germinación, por sus propiedades físicas y químicas. Estas semillas fueron recolectadas de forma correcta en el INIAP, mientras las malezas expresaron variación debido a su genética, a su lugar de recolección y además porque suelen ser más resistentes que la planta original al encontrarse en un ambiente natural en donde suelen competir por sobrevivir.
- Los tres compuestos estudiados poseen en su estructura un átomo de flúor que les atribuye la capacidad de inhibición de bacterias patógenas por ello se refleja una inhibición en *E. coli*, dada que esta bacteria presenta una fenotipo sensible a todos los betalactámicos.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa antimicrobiana, se pudo determinar la capacidad que poseen los compuestos (**A** y **B**), para actuar como un inhibidor de bacterias Gram negativas y representativa en la inocuidad en el manejo y procesamiento de alimentos como lo es la *Escherichia coli*.

4.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda tomar en cuenta la viabilidad (estructura, color, tamaño) y madurez de las semillas estudiadas, en vista que el hábitat y la forma de recolección pueden afectar a la viabilidad normal en la germinación de las semillas. Asimismo, es importante contar con los parámetros óptimos de crecimiento como temperatura, humedad relativa y luz.
- Previo al ensayo aleloquímico se debe realizar pruebas de solubilidad, para encontrar el disolvente adecuado. Para nuestro estudio se realizaron ensayos iniciales de solubilidad con DMSO, este solvente produjo inhibición en las semillas de blanco, por ello se recomienda estudiar la solubilidad de los compuestos A, B y C, con la finalidad de mejorar la interacción en el ensayo entre la semilla y el compuesto solubilizado en un solvente polar como el agua.
- Realizar una resiembra previa, para garantizar que la bacteria a utilizarse sea óptima para el ensayo que se vaya a efectuar.

5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, Garza, & Vázquez. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de infectología*, 32(5), 499-504.
- Basantes. (2015). Manejo de cultivos andinos del Ecuador
- Cabrera, Cristina Eugenia, Gómez, Rommel Fabián, & Zúñiga, Andrés Edmundo. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia médica*, 38(2).
- Carciochi, Ramiro Ariel, & Manrique, D. (2014). Obtención de ingredientes alimenticios con capacidad antioxidante mejorada por aplicación de distintos procesos a semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Buenos Aires: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica*.
- Carrillo, Flores, & Rodríguez. (2018). Actualización en la prescripción de fluoroquinolonas. *Medicina Interna de México*, 34(1), 89-105.
- Cualchi. (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)*. Quito: UCE.
- Gandarillas, A, Rojas, W, Bonifacio, A, & Ojeda, N. (2013). La quinua en Bolivia: perspectiva de la Fundación PROINPA. *Estado del arte de la quinua en el mundo en*, 410-431.
- González. (2013). Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial. *Revista Cubana de Pediatría*, 85(4), 414-417.
- Junod, López, & Gädicke. (2013). Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica en muestras de origen animal y alimentario. *Revista médica de Chile*, 141(3), 298-304.
- Leyva, & Leyva. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Boletín de la Sociedad Química de México*, 2(1), 1-13.
- Madigan, Martinko, Barrachina, Berlanga, Diaz, Gacto, . . . Berraquero, Ruiz. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*: Pearson Educación.
- Martin, N. (2002). Resistencia bacteriana a β -lactámicos: Evolución y mecanismos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 21(1), 107-116.

- Martínez, & López. (2016). Síntesis de Derivados de Flavonoides y Cromonas y Exploración de Nuevas Aplicaciones de la Química de Radicales para la Síntesis de Compuestos Heterocíclicos Nitrogenados.
- Padgett, Denis, Luque, Marco Tulio, Rivera, Doris Maribel, Galindo, Celeste, Zepeda, L, & Hernández, A. (2011). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas en el Instituto Hondureño de Seguridad Social. *Rev Med Hondur*, 79(3), 117-121.
- Peralta, I, & Mazón, Nelson. (2014). La quinua en Ecuador.
- Puig, Yamila, Espino, María, & Leyva, Viriginia. (2011). Resistencia antimicrobiana en Salmonella y E. coli aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y salud*, 6(1).
- Ramirez, Luz Stella, & Castaño, Darwin Marin. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, 2(42).
- Ramos. (2010). *Reinventario y Determinación de la Calidad Físico Químico y Biológica del Germoplasma Forrajero del Banco Activo de la Facultad de Ciencias Pecuarias*.
- Rojas, R, & González, Tania. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 31(2), 69-76.
- Romo, Sandra, Rosero, Aura, Forero, Clara, & Céron, Edmundo. (2006). Potencial nutricional de harinas de Quinoa (*Chenopodium Quinoa W*) variedad piartal en los Andes colombianos primera parte. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 4(1), 112-125.
- Salcido, De la Fuente, & Corona. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta universitaria*, 20(1), 43-52.
- Toapanta, Irene Del Pilar. (2016). *Duración de las etapas fenológicas y profundidad radicular del cultivo de quinua (Chenopodium quinoa), var. Tunkahuán en el sector Querochaca, catón Cevallos, provincia Tungurahua*.

6. ANEXOS

ANEXO I. RESULTADO EFECTO ALELOQUÍMICO EN SEMILLAS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd*)

2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA

SEMILLA QUINUA



3,29 mM



Blanco



2,39 mM



1,198 mM



0,5975mM

ANEXO II. RESULTADO EFECTO ALELOQUÍMICO EN SEMILLAS DE FALSA QUINUA (*Chenopodium álbum*)

2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA

SEMILLA FALSA QUINUA



3,29 mM



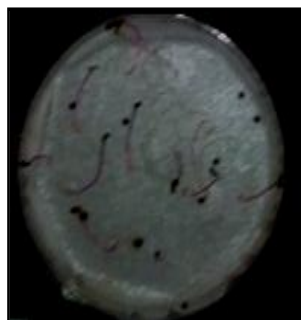
Blanco



2,39 mM



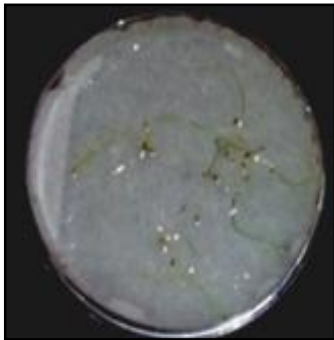
1,198 mM



0,5975mM

ANEXO III. RESULTADO EFECTO ALELOQUÍMICO EN SEMILLAS DE HOLCO (*Holcos lanatus*)

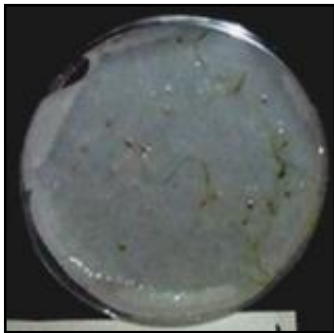
**2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA
SEMILLA DE HOLCO**



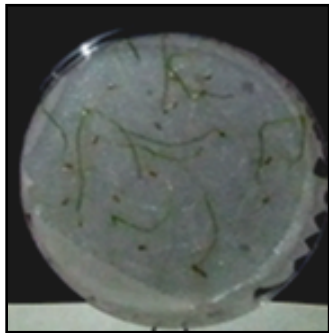
3,29 mM



Blanco



2,39 mM

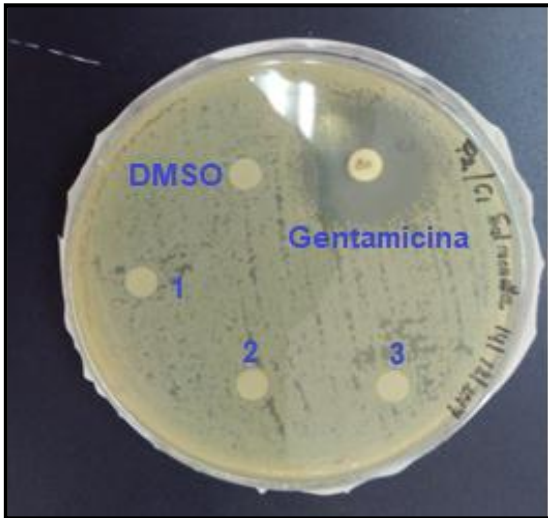


1,198 mM

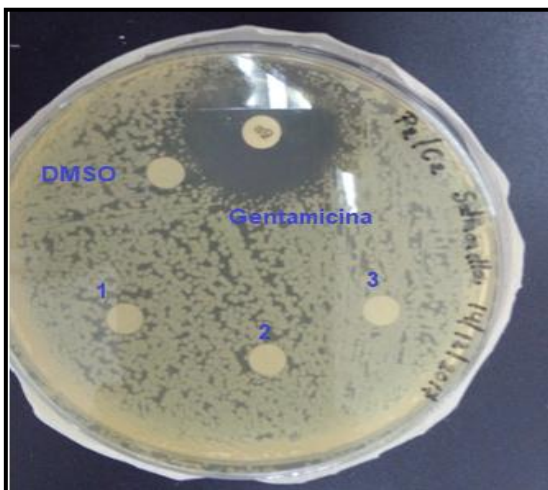


0,5975mM

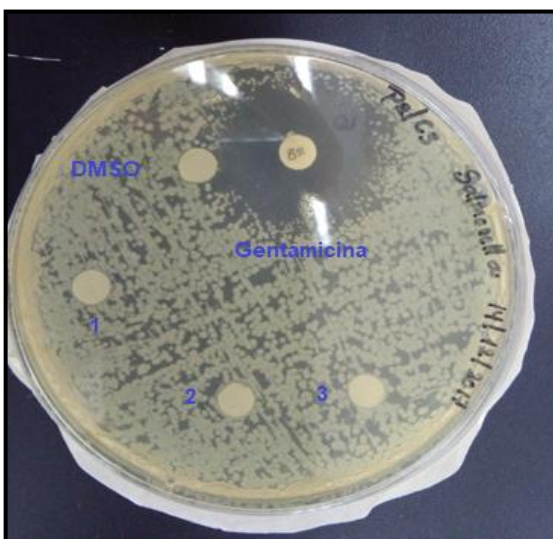
**ANEXO IV. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA
(*Salmonella* spp.)**



C1 = 100 µg/ml

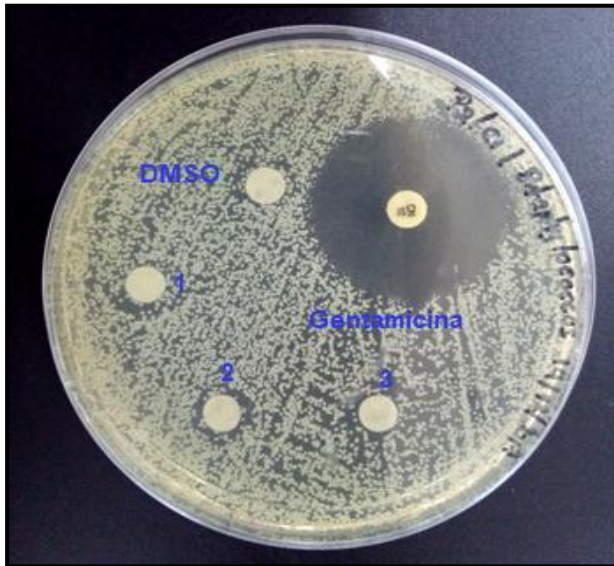


C2 = 10 µg/ml



C3 = 1 µg/ml

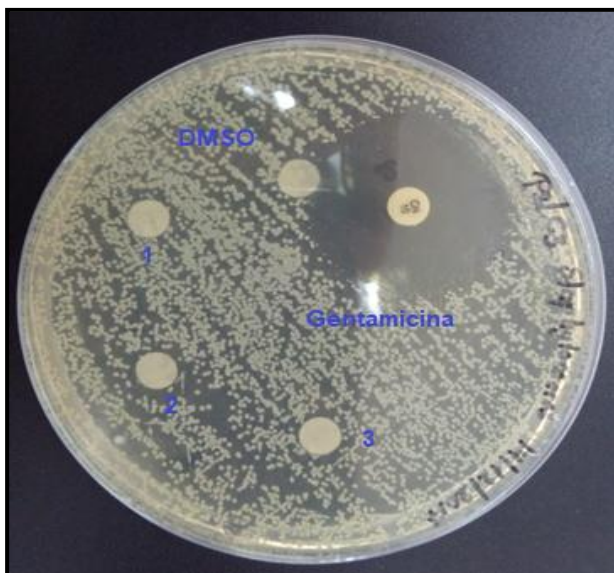
**ANEXO V. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA
(*Staphylococcus aureus*)**



C1 = 100 µg/ml



C2 = 10 µg/ml

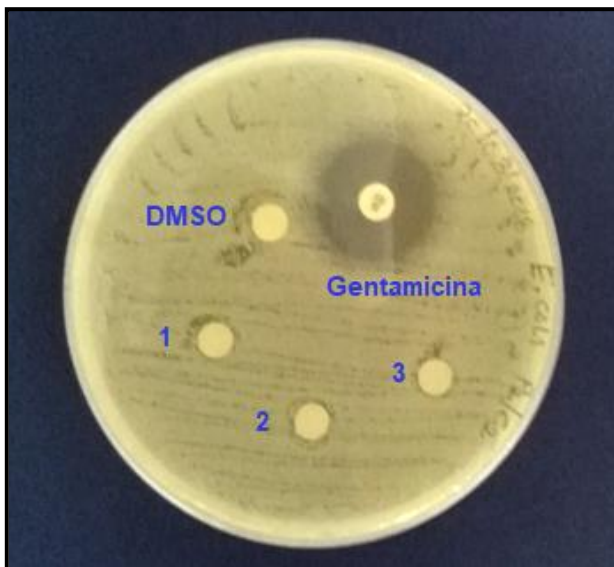


C3 = 1 µg/ml

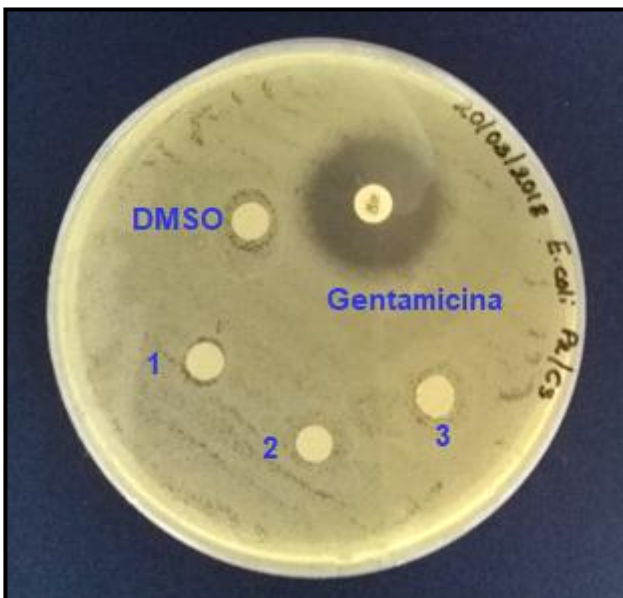
**ANEXO VI. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA
(*Escherichia coli*)**



C1 = 100 µg/ml

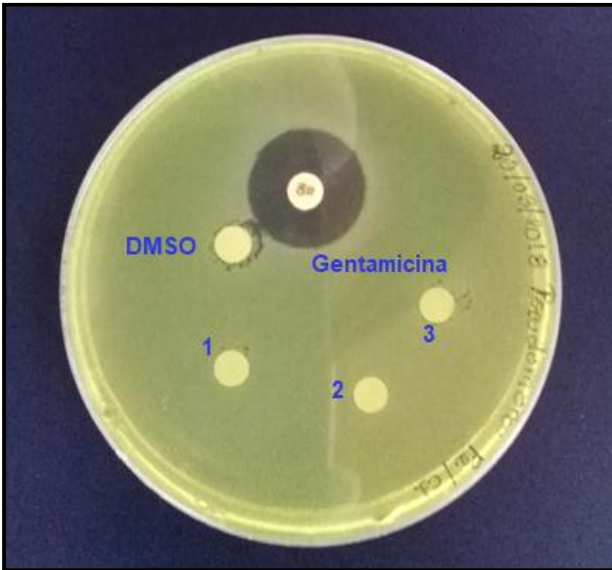


C2 = 10 µg/ml

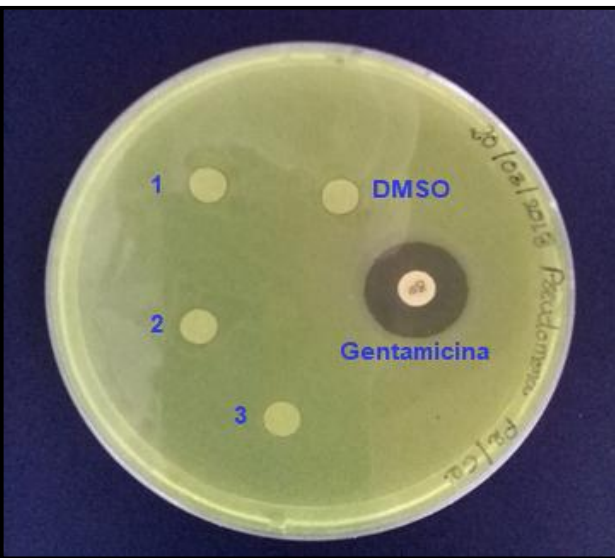


C3 = 1 µg/ml

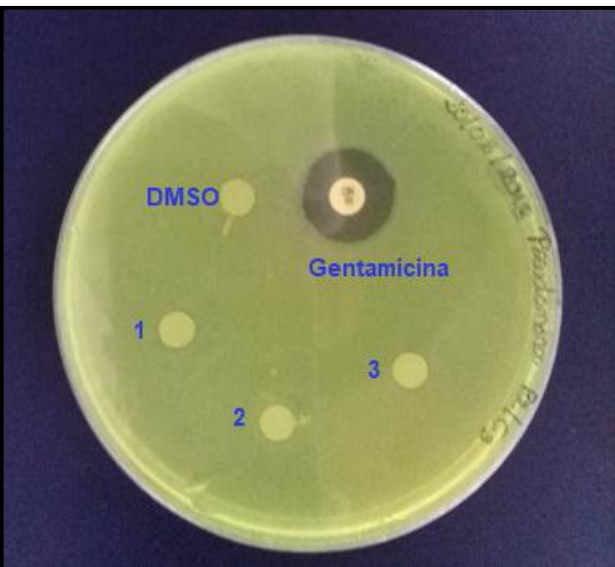
**ANEXO VII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 2-DIFLUOROMETIL-3-METILCROMONA
(*Pseudomona aureginosa*)**



C1 = 100 µg/ml

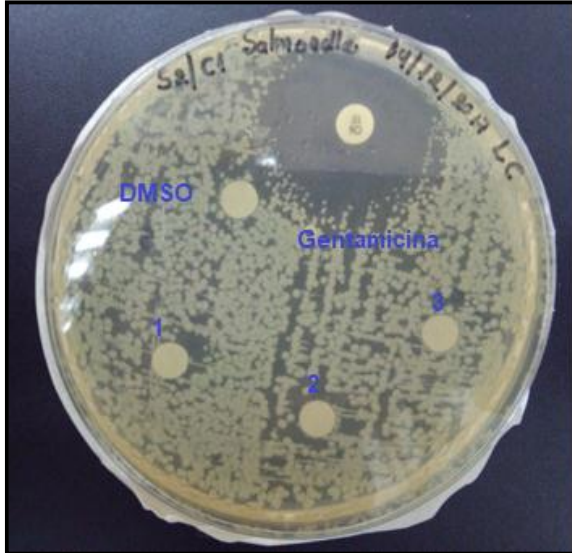


C2 = 10 µg/ml

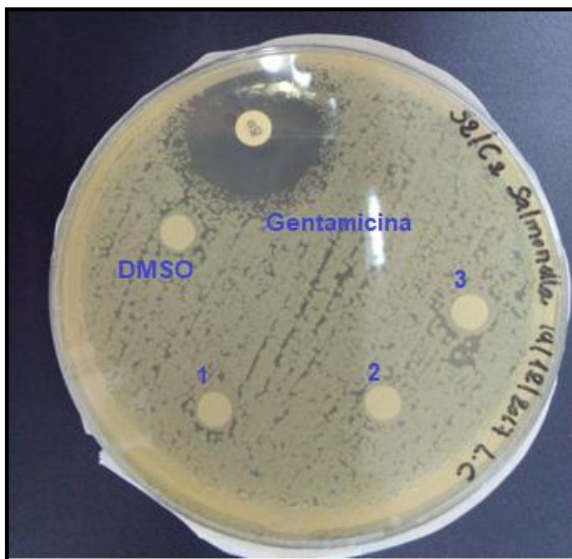


C3 = 1 µg/ml

**ANEXO VIII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona
(*Salmonella* spp.)**



C1 = 100 µg/ml

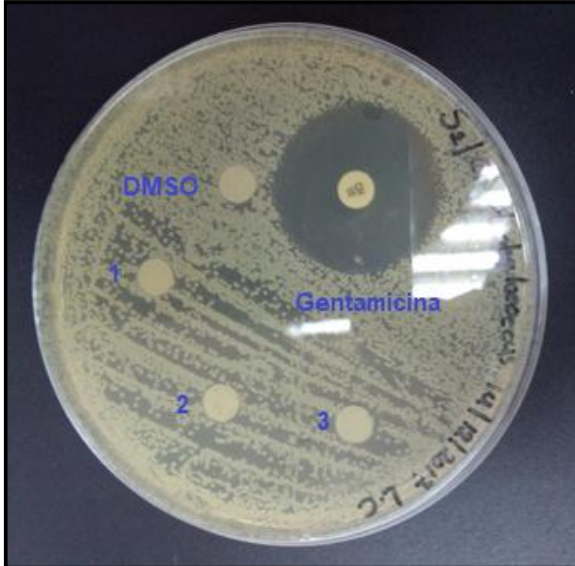


C2 = 10 µg/ml

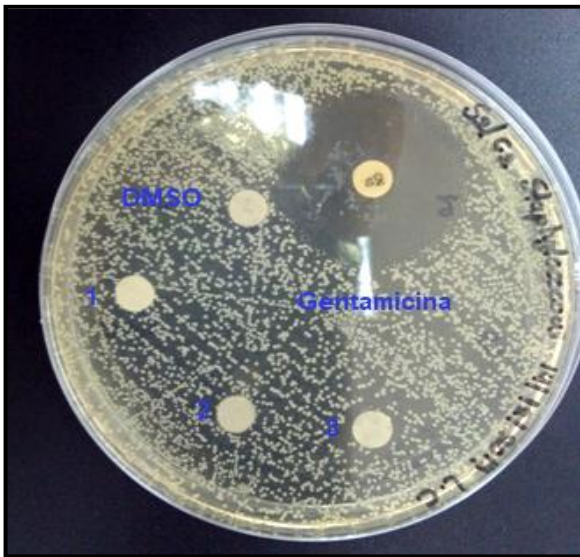


C3 = 1 µg/ml

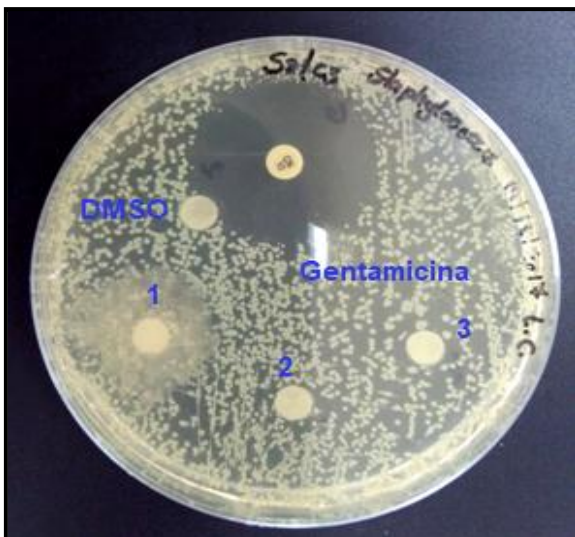
**ANEXO IX. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona
(*Staphylococcus aureus*)**



C1 = 100 µg/ml

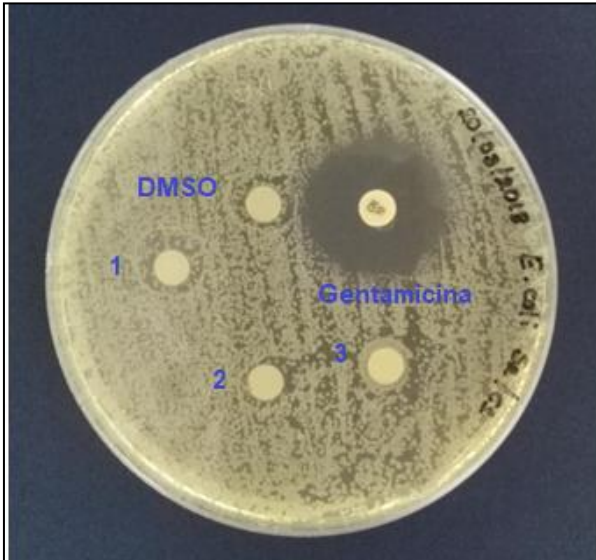


C2 = 10 µg/ml

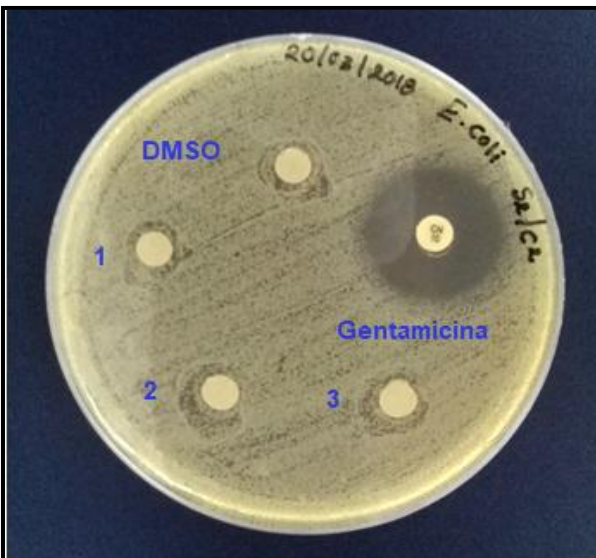


C3 = 1 µg/ml

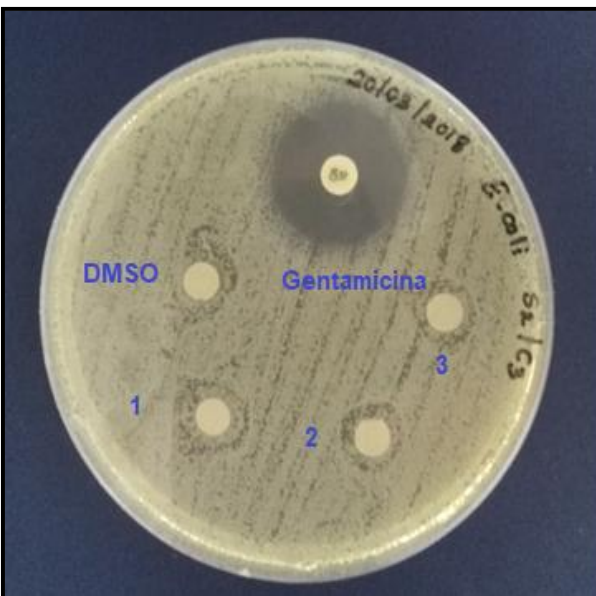
**ANEXO X. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona
(*Escherichia coli*)**



C1 = 100 µg/ml

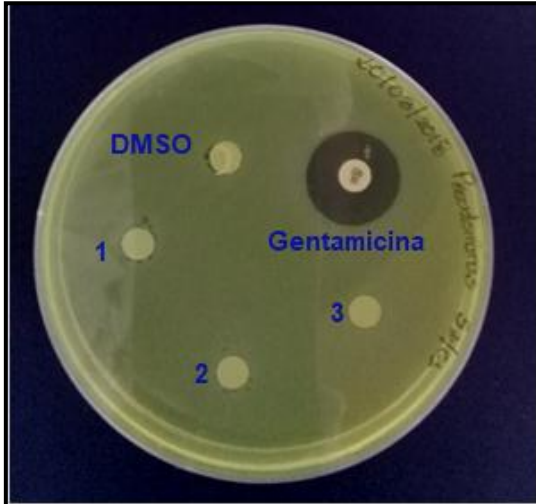


C2 = 10 µg/ml

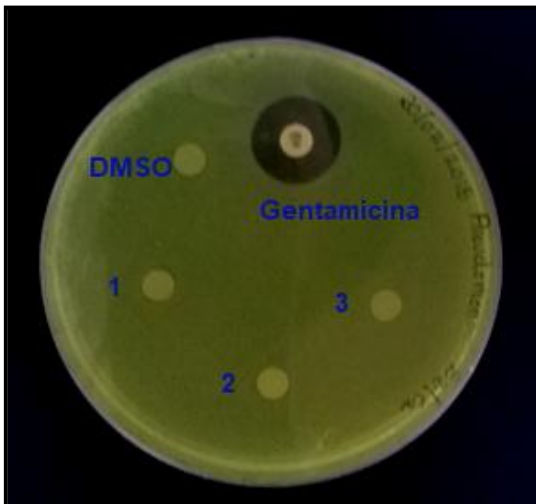


C3 = 1 µg/ml

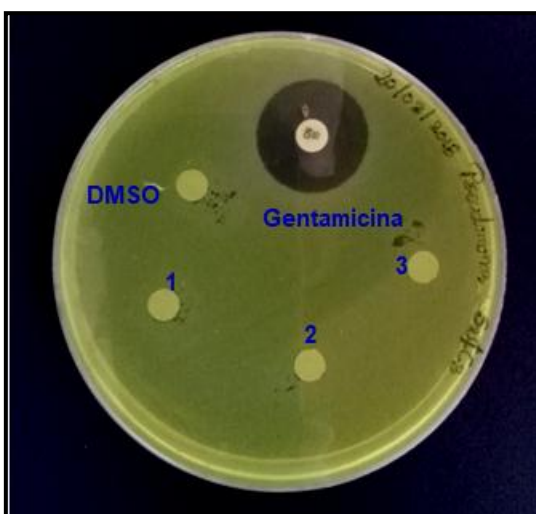
**ANEXO XI. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 6-cloro-3-metil-2-trifluorometilcromona
(*Pseudomona aureginosa*)**



C1 = 100 µg/ml

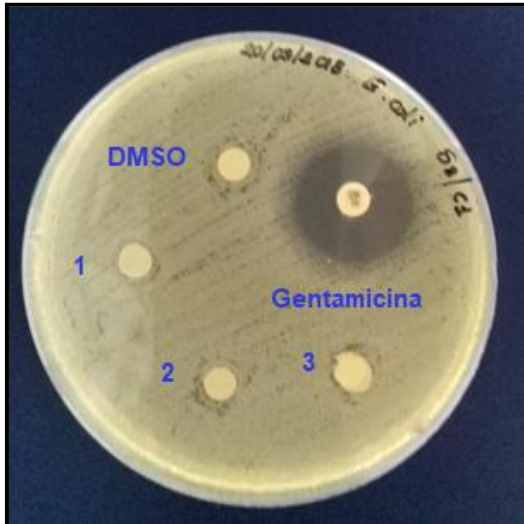


C2 = 10 µg/ml

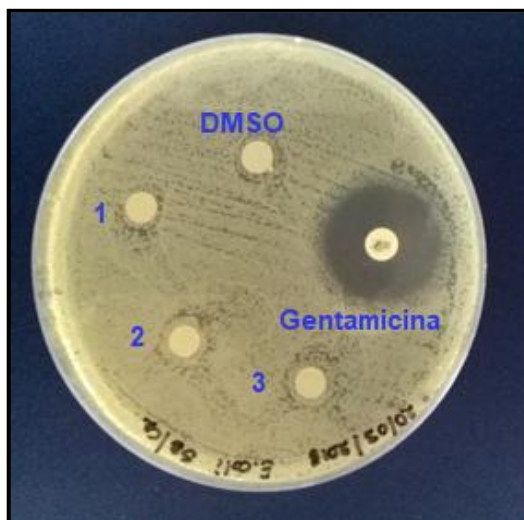


C3 = 1 µg/ml

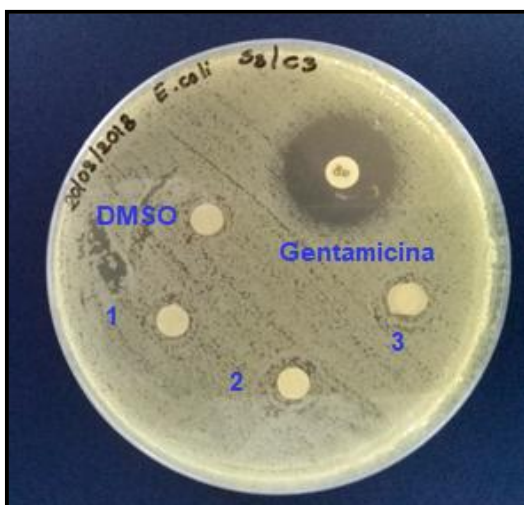
ANEXO XII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (*Escherichia coli*)



C1 = 100 µg/ml

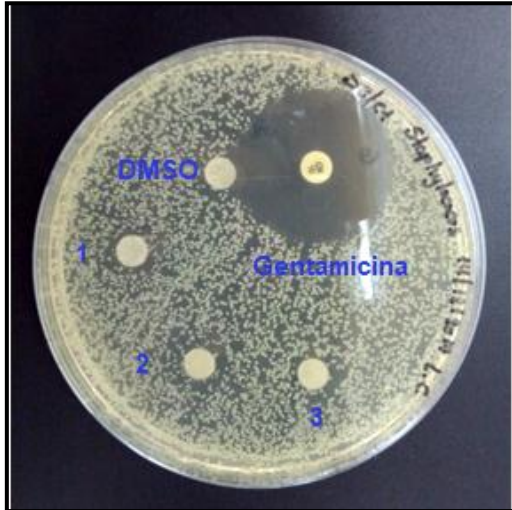


C2 = 10 µg/ml

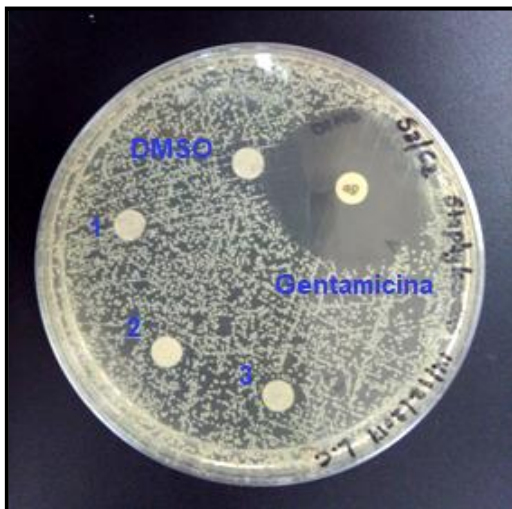


C3 = 1 µg/ml

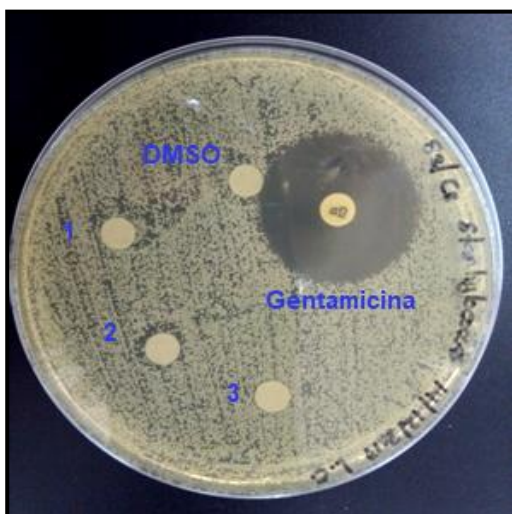
**ANEXO XIII. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona
(*Staphylococcus aureus*)**



C1 = 100 µg/ml

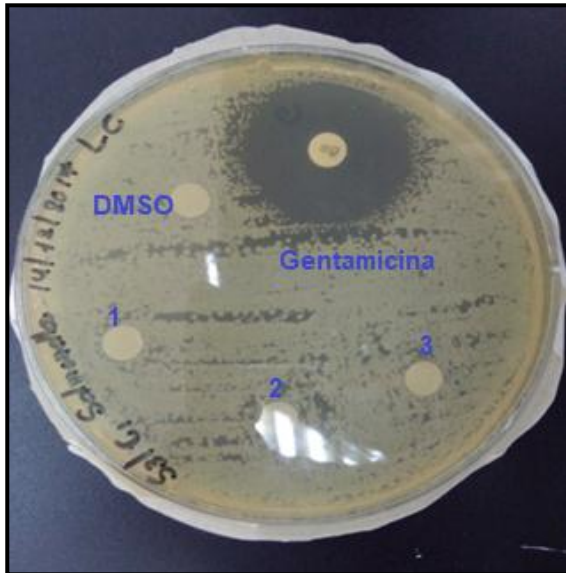


C2 = 10 µg/ml

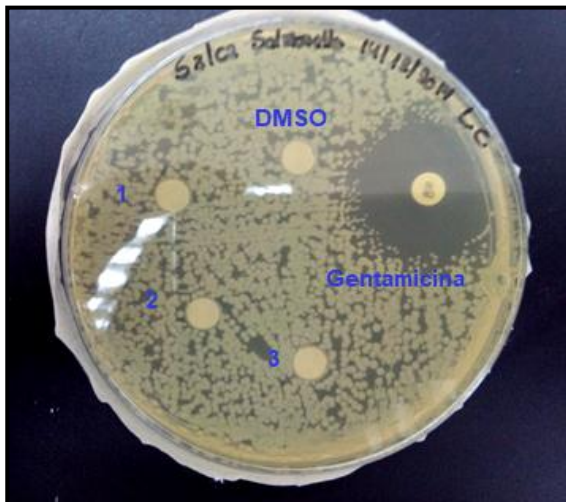


C3 = 1 µg/ml

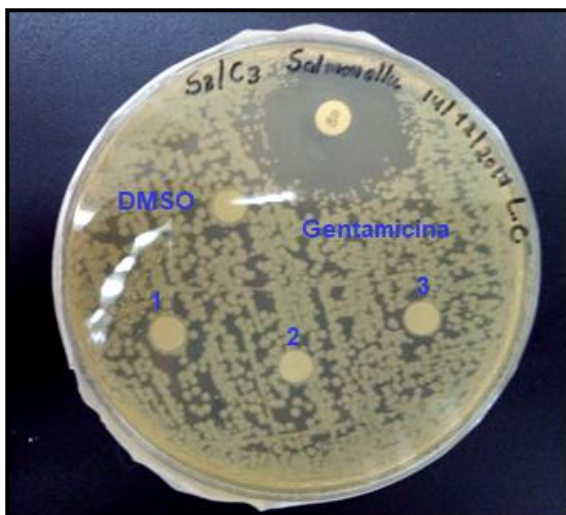
ANEXO XIV. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona (*Salmonella spp*)



C1 = 100 µg/ml

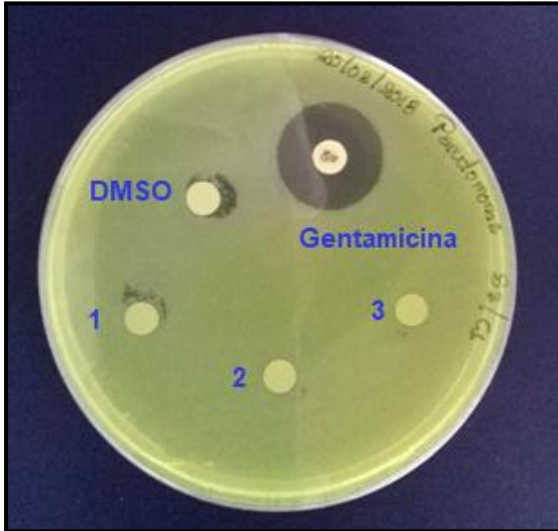


C2 = 10 µg/ml

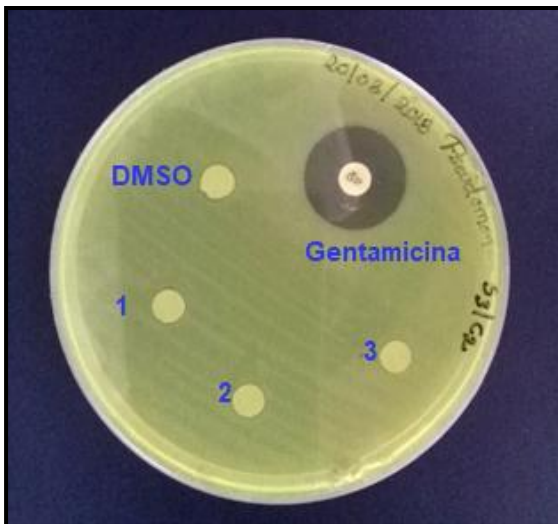


C3 = 1 µg/ml

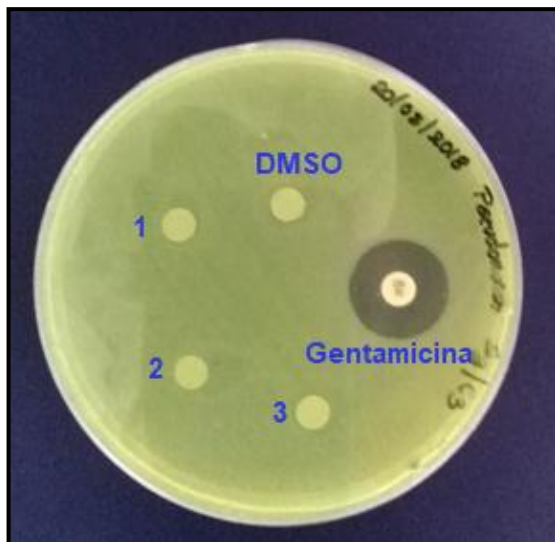
**ANEXO XV. RESULTADO EFECTO ANTIMICROBIANO
DE 3-azidometil-2-trifluorometilcromona
(*Pseudomona aureginosa*)**



C1 = 100 µg/ml



C2 = 10 µg/ml



C3 = 1 µg/ml