

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

NUEVOS TIEMPOS, NUEVAS IDEAS



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO
DE SEMILLAS DE “*Lupinus mutabilis Sweet*” (Chocho) FRENTE A
LA CEPA DE *Escherichia coli* ATCC 8739**

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS:

Bach. Castillejo Mejía Edith Carmen

Bach. Trujillo Pablo Cristina Flormira

ASESOR:

Mg. Q.F. Teófilo Chire Murillo

LIMA- PERÚ

2020

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO
DE SEMILLAS DE “*Lupinus mutabilis Sweet*” (Chocho) FRENTE A
LA CEPA DE *Escherichia coli* ATCC 8739**

DEDICATORIA

A mis hijos adorados Cris y Jaime, a mi esposo por siempre apoyarme.

Cristina

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mis padres. Quienes con su palabra de aliento no me dejaban decaer para seguir adelante y siempre sea perseverante y cumpla con mis metas propuestas.

Edith

AGRADECIMIENTO

Gracias totales, a mi Creador celestial y mi amada familia, quienes me alentaron para no declinar en esta nueva meta trazada.

Cristina

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa, quien han creído en mí siempre dándome ejemplo de superación humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo q tengo. Porque fomentan en mí, el deseo de superación y triunfo en la vida.

Edith

INDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimientos	
Índice general	
Índice de tablas	
Índice de figuras	
Índice de anexos	

Resumen	
Abstract	
Introducción	

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1	Descripción de la realidad problemática	3
1.2	Formulación del Problema	6
	1.2.1 Problema General	6
	1.2.2 Problemas Específicos	6
1.3	Objetivos	6
	1.3.1 Objetivo General	6
	1.3.2 Objetivos Específicos	6
1.4	Justificación	7

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1	Antecedentes de la Investigación	9
	2.1.1 Nacionales	9
	2.1.2 Internacionales	11
2.2	Bases teóricas	13
	2.2.1 <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho o Tarwi)	13
	2.2.1.1 Taxonomía	14
	2.2.1.2 Descripción botánica	15
	2.2.1.3 Composición química y valor nutricional	19
	2.2.1.4 Propiedades medicinales y alimenticias	19
	2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	20
	2.2.2.1 Clasificación taxonómica	21
	2.2.2.2 <i>Escherichia coli</i> , como indicador de contaminación fecal	22
	2.2.2.3 Grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i>	22
	2.2.2.4 Infecciones en humanos	23
	2.2.2.5 Síntomas que produce la <i>Escherichia coli</i>	23
	2.2.2.6 Clasificación de los antibióticos utilizados contra la bacteria <i>Escherichia coli</i>	24
	2.2.3 Ciprofloxacino	25
	2.2.3.1 Farmacología del Ciprofloxacino	25
	2.2.3.2 Mecanismos de acción del Ciprofloxacino	25

2.3	Formulación de Hipótesis	26
2.3.1	Hipótesis General	26
2.3.2	Hipótesis Específicas	26
2.4	Variables	27
2.4.1	Operacionalización de Variables e indicadores	27
2.5	Marco conceptual	28

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1	Tipo y Nivel de la Investigación	30
3.2	Diseño de la Investigación	30
3.3	Población y Muestra de la Investigación	31
3.3.1	Población	31
3.3.2	Muestra	31
3.4	Equipos materiales y reactivos	31
3.5	Procedimiento experimental	33
3.5.1	Proceso de elaboración del extracto del <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	34
3.5.2	Prueba de solubilidad	35
3.5.3	Tamizaje Fitoquímico	35
3.5.4	Prueba de Cromatografía en capa fina (CCF)	35
3.5.5	Elaboración de las concentraciones 20%,30% y 40% del extracto	36
3.5.6	Cálculo de la concentración de la dosis del Ciprofloxacino a emplear	37
3.5.7	Método de difusión en agar en placa para determinar el efecto antibacteriano	38
3.5.8	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	42
3.5.9	Procesamientos de datos	42

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1	Presentación de resultados	43
4.2	Contrastación de hipótesis	54
4.3	Discusión de resultados	55

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	58
5.2	Recomendaciones	59

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	Composición por 100 g de porción comestible del <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho).	19
TABLA 2	Clasificación de los antibióticos.	24
TABLA 3	Operacionalización de variables e indicadores.	27
TABLA 4	Distribución de grupos para determinar el grado de concentración del extracto de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho).	40
TABLA 5	Resultados de la prueba de solubilidad.	43
TABLA 6	Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de semillas <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho)	44
TABLA 7	Resultados de la cromatografía en capa fina del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho).	45
TABLA 8	Resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) 20%.	46
TABLA 9	Resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) 30%.	48
TABLA 10	Resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) 40%.	50
TABLA 11	Resultados de la comparación de la actividad antibacteriana del porcentaje y dosis de inhibición de los 3 grupos experimentales del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho).	52
TABLA 12	Resultados en la escala de Duraffourd de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho)	53
TABLA 13	Resultados de valores estadísticos del análisis de varianza de un factor del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho)	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Chocho o Tarwi)	13
Figura 2	Hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Chocho o Tarwi)	15
Figura 3	Tallos de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Chocho o Tarwi)	16
Figura 4	Flores e inflorescencias de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Chocho o Tarwi)	17
Figura 5	Semillas de Chocho o Tarwi de diferentes ecotipos	18
Figura 6	Raíces y nódulos del chocho o Tarwi	18
Figura 7	Componentes estructurales de la <i>Escherichia coli</i>	21
Figura 8	Estructura molecular del Ciprofloxacino.	25
Figura 9	Mecanismo de acción del Ciprofloxacino	26
Figura 10	Procedimiento microbiológico del ensayo	41
Figura 11	Comparación de la actividad antibacteriana (halos de inhibición) al 20%	47
Figura 12	Comparación de la actividad antibacteriana (halos de inhibición) al 30%	49
Figura 13	Comparación de la actividad antibacteriana (halos de inhibición) al 40%	51

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia	65
Anexo 2. Ficha de recolección de datos	66
Anexo 3. Resultados estadísticos	67
Anexo 4. Certificado taxonómico de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho)	70
Anexo 5. Certificado de la <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	71
Anexo 6. Certificado de laboratorio	72
Anexo 7. Testimonio fotográfico	73

RESUMEN

Introducción. La investigación tuvo como finalidad evaluar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas de "*Lupinus mutabilis Sweet*" (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739, en muestras procedentes de la ciudad de Llamellín, prov. Antonio Raimondi, dpto. Ancash – Perú. **Metodología.** La investigación comprendió el ensayo de solubilidad del extracto seco, screening fitoquímico, cromatografía en capa fina y para evaluar la actividad antibacteriana se aplicó el método de difusión en agar (excavación en placa). Se elaboró disoluciones a concentraciones de 20%, 30% y 40%. Cada concentración se colocó en una placa de Soya Trypticase, la cual contuvo el inóculo estandarizado de *Escherichia coli* a una turbidez de 0.5 en escala de Mc Farland, y como control positivo el Ciprofloxacino. Se realizaron excavaciones de 8 mm de diámetro y 8 mm de profundidad. Posteriormente, se rotuló cada placa y se prosiguió a incubar a 37°C por un lapso de 24 horas, todas las pruebas se realizaron por quintuplicado y seguidamente se midió los respectivos halos de inhibición. **Resultados.** El extracto contiene alcaloides, aminoácidos y flavonoides. *El extracto al 40% tuvo mayor actividad antibacteriana (halo de inhibición 20.56 mm), luego el extracto al 30% (halo de inhibición 14.5 mm), y finalmente el extracto al 20% (halo de inhibición 11.96 mm). **Conclusión.** Se determinó que el extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739.

Palabras clave: Efecto antibacteriano; *Lupinus mutabilis Sweet*; *Escherichia coli*; placas de Agar Soya Trypticase TSA.

SUMMARY

Introduction. The purpose of the research was to evaluate the antibacterial effect of the aqueous extract of seed "*Lupinus mutabilis* Sweet" (Chocho) against the strain of *Escherichia coli* ATCC 8739, in samples from the Llamellín district, Antonio Raimondi province, Ancash department - Peru. Methodology. The investigation included the dry extract solubility test, phytochemical screening, thin layer chromatography and for the evaluation of antibacterial activity the agar diffusion method (plate excavation) was applied. Dilutions were made at concentrations of 20%, 30% and 40%. Each concentration was placed on a Tripticasa Soy plate, which contained the standardized inoculum of *Escherichia coli* at a turbidity of 0.5 of the Mc Farland scale, and as a positive control the Ciprofloxacin. Excavations of 8 mm in diameter and 8 mm deep were made. Each of the plates was then labeled and incubated at 37 ° C for a time of 24 hours, all tests were performed in quintuplicate and subsequently the respective inhibition halos were measured. **Results** The extract contains alkaloids, amino acids and flavonoids. * The 40% extract had a higher antibacterial activity (20.56 mm halo of inhibition), then the 30% extract (14.5 mm inhibition halo), and finally the 20% extract (11.96 mm inhibition halo). **Conclusion.** It was determined that the aqueous extract of seed of *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho) has an antibacterial effect againsts the strain of *Escherichia coli* ATCC 8739.

Keywords: Antibacterial effect; *Lupinus mutabilis* Sweet; *Escherichia coli*; plates of Agar Soya Tripticasa TSA.

INTRODUCCIÓN

Los vegetales son fuente de principios activos, se ha reconocido su uso a través de la historia de nuestros antepasados hasta nuestros tiempos, los cuales han servido para curar enfermedades o aliviar síntomas, además el costo de las plantas es significativamente inferior en relación a los medicamentos, los cuales son difíciles de obtener para la población de limitados recursos o por encontrarse en zonas alejadas de la ciudad. Asimismo, los efectos adversos son cada vez más altos.

El *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) es originario de la extensa región de los Andes. La semilla de esta especie tiene un sabor amargo, es empleado por los habitantes del lugar para alimentarse, rico en vitaminas, proteínas y minerales, tiene beneficios preventivos y curativos, es sustancial para los niños en etapa de crecimiento, personas con diabetes, problemas renales.

Las plantas medicinales son utilizadas desde la antigüedad, mediante prácticas ancestrales, es por ello que es indispensable realizar trabajos de investigación para validar sus propiedades curativas, y así acreditarlas como medicina natural. **Rodríguez, A. (2009)** ⁽¹⁾ En su investigación de título “Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los alcaloides del agua de cocción de desamargado del *Lupinus mutabilis*”. Se encontró alcaloides (+++), y a su vez muestra actividad antibacteriana, es decir, se concluye que el *Lupinus mutabilis* Sweet podría tener propiedades curativas.

Las investigaciones elaboradas sobre el *Lupinus* son cuantiosas, sin embargo, por su alto nivel de alcaloides, no permite su consumo directo, por lo cual estos deben ser eliminados previamente.

Esta tesis tiene como finalidad analizar las propiedades farmacológicas que posee esta leguminosa, el objetivo principal es determinar el efecto antibacteriano existente en el extracto acuoso de semilla de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) frente a cepas de *Escherichia Coli*.

Asimismo, el trabajo de investigación se distribuye en cinco capítulos: el primero está orientado a la descripción de los objetivos y la realidad del problema de la investigación. En el segundo capítulo se detallan los antecedentes, la hipótesis y el marco conceptual. El tercer capítulo está relacionado con la parte metodológica, es decir, se describe el tipo, diseño, población, muestra, técnicas y procesamiento de datos de la investigación. En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos, la contrastación de hipótesis y la discusión. Finalmente, en el quinto capítulo se mencionan las conclusiones del estudio además incluye las recomendaciones sobre la investigación.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la problemática

Gran número de enfermedades catalogadas como infecciosas son causadas por microorganismos; dichas enfermedades pueden contagiarse de diferentes maneras, entre los que destacan: por agua contaminada, ingesta de alimentos contaminados y transmisión directa; y en el tratamiento de dichas infecciones se utiliza un conjunto de antibióticos. Entre los microorganismos comúnmente conocidos se encuentra la *Escherichia coli* que es una bacteria estudiada en 1885 por el bacteriólogo alemán Escherichia, al cual se debe su nombre, que suele alojarse en el intestino del individuo y en el de los animales que poseen sangre caliente. A pesar de que las cepas son inocuas, estas originan graves enfermedades producto de una transmisión alimentaria. *Escherichia coli*, usualmente, se contagia por ingerir líquidos o alimentos infectados, como productos cárnicos poco cocidos, huevo y leche cruda. ⁽¹⁾

Como se ha mencionado líneas arriba, el *Escherichia coli* se instala en los intestinos de los animales y son desechados en las heces, las que, luego, al ser utilizadas como fertilizante, tienen una alta posibilidad de contaminar los vegetales; por ello, es vital su adecuada desinfección. Los principales síntomas de una infección por la bacteria *Escherichia coli* son: diarrea, cólicos, vómito y fiebre. Por lo general, esta infección puede durar hasta diez días; no obstante, en algunas ocasiones puede ser causante de muerte. ⁽²⁾

Por otro lado, se viene observando que el uso de la medicina alternativa se extiende cada vez más, posiblemente por los ineficaces que resultan algunos tratamientos farmacológicos que incluyen antibióticos, lo cual obliga a optar por terapias y medicamentos naturales a bajos costos al alcance de la población. Existe en el mercado farmacéutico una vasta variedad de antibióticos de primera, segunda y de tercera generación que brindan diversas alternativas para tratar enfermedades a causa de bacterias. ⁽³⁾ Sin embargo, muchos de estos antibióticos suelen perder eficacia antibacteriana, generado por múltiples factores, como, por ejemplo, la automedicación, el régimen farmacológico inconcluso de los pacientes, y el abandono de los tratamientos prescritos. Además, cabe agregar que el consumo desmesurado de antibióticos, favorece el brote de cepas microbianas multidrogas resistentes; ⁽¹⁷⁾ es decir, tales cepas se vuelven resistentes ante los efectos de un antibiótico, por cuanto las bacterias pueden llegar a portar complejos genes de resistencia, por lo que se le designa multirresistente. Precisamente la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un dilema para la salud pública mundial, y su gravedad aumenta año tras año. ⁽²⁴⁾ En 2013 se reportaron al menos 700.000 muertes que se atribuyen a organismos antibiótico-resistentes (de las cuales 23.000 sucedieron en EE.UU.), y se cree que para 2050 la cifra aumentará a 10 millones al año, superando al número de muertes por cáncer. ⁽²⁾

Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que, “entre un 8% y un 65% de las muestras de *Escherichia Coli*, una bacteria que provoca infecciones de las vías urinarias presentó resistencia al Ciprofloxacino, un antibiótico habitualmente utilizado para tratar estas infecciones”. El conocimiento sobre la susceptibilidad antimicrobiana debe enfocarse a la realización de esquemas de tratamiento más eficientes, políticas, estrategias, metodologías que faciliten una apropiada vigilancia en la elaboración y el uso comedido de antibióticos. ⁽²⁾

Ante la resistencia de esta bacteria frente al fármaco Ciprofloxacino, la medicina natural representa otra opción, ya que los vegetales son una gran fuente renovable y de componentes químicos, debido a esto las plantas proporcionan

fuentes naturales de principios activos. Asimismo, estos principios son fundamentales para la síntesis de otras estructuras tales como: fármacos insecticidas y otros. ⁽⁸⁾ En el Perú, las especies de la vegetación son aproximadamente unas 300 mil, muchas de las cuales han sido consignadas por su uso como antimicrobianos. ⁽⁹⁾ De esta manera, las investigaciones vinculadas con la microbiología, etnobotánica y fitoquímica son cada vez más necesarias, ya que sirven para profundizar en las propiedades de las plantas medicinales. Una investigación financiada de estas plantas podría ayudar a contrarrestar de modo más eficiente las enfermedades más usuales en la sociedad. Además, el índice de efectos adversos en las plantas es menor que los fármacos. ⁽¹⁰⁾ Cabe resaltar que, según la variedad de especies de flora, el Perú se encuentra en el quinto lugar en el mundo y en décimo, en especies nativas domesticadas. A pesar de ello solo se conoce que aproximadamente 4400 de estas especies son utilizadas con propósitos medicinales. ⁽¹¹⁾ Pese a ello, se disponen de escasos estudios de actividad y estudios fitoquímico.

La búsqueda de elementos antimicrobianos se orienta en torno agentes con nuevos mecanismos de acción que posean la capacidad de eludir la resistencia bacteriana actual. ⁽¹²⁾ por ello el estudio del *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) con el propósito de encontrar otros principios activos. ⁽¹³⁾ Algunos trabajos realizados en el país confirman las bondades de la semilla de esta planta, bien sea como extractos acuosos con actividad antiinflamatoria, como lo evidencian Castañeda et al.; ⁽¹⁴⁾ como extracto acuoso con efecto biocida, como lo señala Añamuro; ⁽¹⁵⁾ o como extracto combinado con otros componentes con actividad antibacteriana frente a cepas de la bacteria *Escherichia coli* y otras, como lo refieren en su investigación Flores y Vásquez. A nivel internacional, los trabajos de Rodríguez ⁽¹⁾ y Méndez ⁽¹¹⁾ comprueban la dinámica antibacteriana y propiedades farmacológicas del *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho).

Por las razones expuestas anteriormente, esta investigación sostiene como finalidad evaluar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de

Lupinus mutabilis sweet (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli*, utilizando los resultados a futuro en otros estudios, como actividades sinérgicas frente a los antibióticos que se exponen en la industria farmacéutica con el objetivo de generar mayor evidencia científica para su consumo.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema General

¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739?

1.2.2 Problemas Específicos

1. ¿Qué clases de compuestos presentan mayor concentración en el extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho)?
2. ¿En qué concentración del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) posee efecto antibacteriano frente a la cepa de *Escherichia coli*?
3. ¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) comparado con el fármaco Ciprofloxacino?

1.3 Objetivos

1.3.2 Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739.

1.3.3 Objetivos Específicos

1. Determinar los compuestos con mayor presencia en el extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho).
2. Determinar la concentración del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) que posee efecto antibacteriano frente a la cepa de *Escherichia coli*.
3. Comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas del *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) con el fármaco Ciprofloxacino.

1.4 Justificación

Este trabajo de investigación tiene una justificación práctica, por cuanto se hace necesario disponer de un fármaco natural, como el que se propone aquí, en base al extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), que represente una opción de tratamiento antibacteriano para *Escherichia coli* ATCC 8739, frente a los antibióticos que se expenden en el mercado farmacéutico, pero que son poco efectivos debido a la resistencia bacteriana, así como tienen un alto costo económico.

La resistencia de las bacterias ante los antibióticos es una problemática para la salud a nivel Latinoamericano, donde la automedicación es una práctica común. Específicamente, *Escherichia coli* presenta resistencia a los antibacterianos Trimetoprim-sulfametoxazol, Ciprofloxacino, Ampicilina, etc.; y, en otros casos, presentan efectos adversos. ⁽¹⁷⁾

Cabe señalar que, en las zonas rurales y lugares vulnerables, donde no se cuentan con instalaciones de agua potable, alcantarillado y conexiones domiciliarias, la población está más expuesta a diversas enfermedades ya que no poseen los medios económicos para acceder al servicio de salud inmediato. Frente a este panorama, se sugiere la medicina alternativa, con productos que provienen de sustancias extraídas de plantas naturales endógenas. Nuestro país cuenta con

muchos recursos vegetales que no son aprovechados ni se dan a conocer; tal es el caso de esta semilla, de la planta denominada *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), el cual es usado en la dieta alimenticia, en algunas zonas más que en otras, desconociendo la mayoría de la población sus propiedades como medicina natural.

El presente estudio es para difundir el uso medicinal de esta planta; se evalúa el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) frente a las cepas de *Escherichia coli*, causante de diversas enfermedades: infección urinaria, prostatitis, pilonefritis, infección entérica, enterohemorrágicas, enterotoxigénicas, hepatobiliares, enteroagregativas, que, en su forma más grave, pueden causar la muerte. En tal sentido, los resultados logrados permitirán demostrar los beneficios del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), para su posterior utilización como producto medicinal, logrando, de esta manera, masificar su expendio y consumo, debido a su bajo costo y fácil accesibilidad.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

2.1.1 Nacionales

Castañeda C, et al.2002 ⁽⁷⁾ investigación titulada “Evaluación del Efecto Antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), en animales de experimentación”. **Objetivo.** Evaluar el efecto Antiinflamatorio del extracto acuoso de la leguminosa (Chocho). **Metodología.** La elaboración de esta investigación comprendió, Screening Fitoquímico para determinar alcaloides y otros metabolitos. Los alcaloides también fueron identificados por TLC (Cromatografía en capa fina) y HPLC comparado con estándar de esparteína y la inflamación fue evaluada utilizando la técnica de Granuloma de Pouche con trementina en ratas. **Resultados.** Se empleó las técnicas estándar del CYTED, obteniéndose el efecto máximo de inhibición de la inflamación a los 80 minutos en comparación con los 60 minutos correspondientes al diclofenaco (30 mg/Kg) mostrando un porcentaje de inhibición de 66% frente al 100% del fármaco estándar. **Conclusión.** De esta investigación los extractos acuosos de los granos evidenciaron actividad antiinflamatoria.

Añamuro C. (2016) ⁽⁸⁾ “Determinación del efecto biocida del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) sobre *Thrips tabaci Lindeman* (Trips)

en cultivos de cebolla”. **Objetivo.** Evaluar el efecto biocida del extracto acuoso del Chocho con la finalidad de reducir el daño provocado por *Thrips tabaci* Lindeman en cultivos de cebolla. **Metodología.** Se implementaron criaderos de *Thrips tabaci* Lindeman, del cual se extrajeron 607 larvas de 25 a 35 días a condiciones ambientales $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se trabajó con concentraciones del extracto del Chocho de 5,10, 20 y 40 %. **Resultados.** Se observó mayor eficacia en el control de la plaga de insectos adultos de *Thrips tabaci* L. fue el extracto a una concentración de 40%, el cual provocó la mortalidad de 96.67 % de insectos luego de 2 días de ser aplicados. **Conclusión.** El extracto acuoso de los granos del Chocho sobre *Thrips tabaci* Lindeman (Trips) en cultivos de cebolla tiene efecto biocida.

Yepes, A. et al. 2009 ⁽⁹⁾ “Efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas de Chocho, *Lupinus mutabilis* sobre *Alternaria solani* y *Fusarium solani*”. **Objetivo.** Evaluar el efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* “chocho” o “Tarwi”, sobre los hongos: *Alternaria solani* y *Fusarium solani*. **Metodología.** Se trabajó con la semilla triturada convirtiéndola en harina luego se eliminó la concentración de grasa con cloroformo el extracto acuoso se realizó mediante ebullición por 10 minutos. Luego se colocó en placas petri en combinación con el medio de cultivo agar para concentraciones de 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 mL%. En cada concentración se usaron tres repeticiones, los hongos se inocularon en placas petri, a través de una punteadura central. **Resultados.** Al cabo de 5 días de incubación a 25°C se realizó la medida del crecimiento micelial (cm) observándose que el efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis*. **Conclusión** “Chocho” o “Tarwi” mostró una inhibición del crecimiento micelial en *Alternaria solani* del 74,2% y en *Fusarium solani* del 66,86% con la concentración de 13 mL% y a la concentración de 1 mL% la inhibición del crecimiento micelial alcanzó el 10,33% para *Fusarium solani* y 14,66% en *Alternaria solani*.

Chura, B. (2017) ⁽¹⁰⁾ “Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones (*Lupinus mutabilis* Sweet) de Chocho en *Escherichia coli* y *Candida albicans*”. **Objetivo.** Determinar el efecto antibacteriano de la decocción de hojas, flores y fruto del

Chocho sobre *Escherichia coli* y *Candida albicans*. **Metodología.** Se realizaron cinco concentraciones (5, 10, 30, 50 y 100%). Se inició teniendo como control al antibacteriano Eritromicina, para *E. coli* y en *Candida albicans*, al antifúngico Itraconazol. Los métodos se iniciaron con el aislamiento de *E. coli* y *C. albicans* en muestras de orina positivas a infección urinaria del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón de Puno; luego se evaluó el contenido cualitativo de alcaloides de las decocciones de cada órgano vegetal mediante los reactivos Dragendorf, Mayer y Wagner; seguidamente se evaluó la resistencia de ambos microorganismos a las decocciones de flores, hojas y semillas de chocho, mediante el método de Kirby Bauer; Eritromicina, Itraconazol y agua destilada. **Resultados.** Las hojas y semillas resultaron con muy abundantes contenidos de alcaloides (+++), las decocciones de hoja, flores y semillas al 100%, lograron inhibiciones de *E. coli* con 9.63 mm, 8.77 mm y 9.27 mm respectivamente; por otro lado, las decocciones de las hojas al 50% y 100% lograron inhibiciones con de *C. albicans* con 11.37 mm y 12.03 mm respectivamente. **Conclusión.** La decocción de hojas y semillas lograron inhibiciones de los microorganismos evaluados.

2.1.2 Internacionales.

Rodríguez, A. (2009) ⁽¹⁾ "Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los alcaloides del agua de cocción de desamargado del *Lupinus mutabilis*". **Objetivo.** Evaluar la actividad antibacteriana de los alcaloides del *Lupinus mutabilis* (Chocho). **Metodología.** Se emplearon liofilizados de cocción e hidratación del proceso de desamargado de las semillas y hojas, también extracto crudo etéreo de hojas del Chocho, frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium smegmatis*. Como control positivo se utilizó Estreptomina **Resultados.** En la cocción del Chocho se obtiene Lupanina para activar mecanismos inhibitorios de estos microorganismos en estudio. **Conclusión.** La cuantificación de los alcaloides expresados como Lupanina en el agua de cocción

del grano de *Lupinus* reveló una concentración de 36%, además la cocción facilita una mayor liberación del compuesto de interés farmacológico.

Méndez E. (2010) ⁽¹¹⁾ “Actividad antibacteriana de un gel elaborado del extracto alcaloidal del *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho)”. **Objetivo.** Determinar la actividad antibacteriana de un gel obtenido del extracto alcaloidal del Chocho frente *E. coli* y *S. aureus*. **Metodología.** Se elaboró un extracto etéreo de los alcaloides totales del fruto del chocho obtenido por extracción líquido-líquido con éter, extracto alcohólico de las hojas de Chocho obtenido por maceración. Se produjeron 2 geles con ambos preparados adicionándole el extracto alcaloidal, determinando parámetros físicos, organolépticos y microbiológicos. Como control positivo de la actividad antibacteriana se utilizó crema Sulfadiazina de plata, a una concentración del 1%, aplicada todos los días sobre heridas de 1cm de diámetro causada por *E. Coli* y *S. aureus* en ratones para experimentación durante 4 semanas. **Resultado.** Se obtuvo porcentajes de inhibición bacteriana: en *E. Coli* 84, 86 y 93% como también para heridas con infección epidérmica causadas por *S. aureus* el 87, 86 y 92%. **Conclusión.** Se comprobó que tanto el gel como la crema tienen similitud en su actividad antibacteriana.

Villacrés E, et al. (2009) ⁽¹²⁾ “Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)”. **Objetivo.** Evaluar la fisiología del Chocho y las propiedades de los alcaloides que destacan en él. **Metodología.** La obtención de los alcaloides es por maceración en agua, alcohol isopropílico, hexano y por cocción. Se emplearon los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycrosporium canis* y *Trichophytom rubrum*. Posteriormente se elaboró un gel coloidal a partir del Chocho, empleando como control positivo Sulfadiazina de plata, aplicándolo en los ratones experimentales. **Resultados.** Contiene Lupanina, la cual le confiere un sabor amargo, también presenta el alcaloide Quinozilídico, además en el estudio realizado se destaca su actividad antibacteriana. **Conclusión.** El efecto antibacteriano se alcanza a los 18 días de aplicación en *Escherichia coli* y 21 días, *Staphylococcus aureus*.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho o Tarwi)

Es una leguminosa, la cual es utilizada para la alimentación, a través de sus granos. Esta planta es denominada Chocho en la zona norte de Perú y Ecuador, mientras que en la parte sur de Bolivia y Perú se le conoce como Tarwi. ⁽¹³⁾

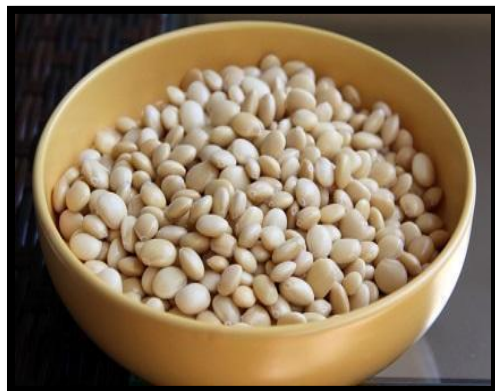


Figura N° 1. *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho o Tarwi).

El género *Lupinus* tiene, aproximadamente, doscientas especies ubicadas en el continente americano. Por lo general, se siembra entre los 2500 a 3400 m.s.n.m., por lo cual, esta planta solo crece en lugares secos. Además, es sensible al aumento de humedad y sequía. No es recomendable que se cultive en zonas muy heladas, ya que esto puede interferir durante la etapa de madurez y racimo, no obstante, algunas plantas son sembradas cerca del lago Titicaca y son menos vulnerables al frío. Se recomienda que el *Lupinus mutabilis Sweet* permanezca en suelos arenosos o francos, de esta manera se asegura una mejor proporción de nutrientes, y el pH, este último debe estar entre el cinco y siete. ^(15 y 16).

2.2.1.1 Taxonomía

Taxonomía de *Lupinus mutabilis* Sweet.

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: FBALES

FAMILIA: FBALES

GÉNERO: *Lupinus*

ESPECIE: *Lupinus mutabilis* Sweet

Nombre Vulgar: "Chocho"

2.2.1.2 Descripción botánica

Hoja

La hoja del *Lupinus mutabilis* está formada por ocho folíolos, pueden ser de forma lanceolada u ovalada. Al pie del pecíolo hay hojas estipulares, por lo general son rudimentarias. Esta planta se destaca por la poca presencia de vellosidades en sus hojas. ⁽¹⁵⁾



Figura N°2. Hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho o Tarwi).

Tallos y ramificaciones

Esta planta puede cambiar, según el contenido de antocianina, de amarillo verdoso a verde oscuro. El *Lupinus mutabilis* Sweet puede llegar a medir desde medio metro hasta dos metros. Este vegetal es utilizado como combustible, debido a que es muy leñoso. Debido a su alto porcentaje de celulosa y fibra, el Chocho es usado en combustión, no obstante, puede ser industrializado.

Cabe señalar que, con respecto a las especies silvestres, el Chocho puede ser rojizo o morado oscuro. ^(16, 18)



Figura N° 3. Tallos de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho o Tarwi).

Flores

El *Lupinus mutabilis* Sweet corresponde a la subfamilia Papilionaceae. Este posee una gran corola de hasta 2 cm, con 5 pétalos, el cual está compuesto por un estandarte, dos quillas y dos alas ⁽¹⁸⁾.

Esta planta puede llegar a poseer hasta 3 floraciones consecutivas, debido a su ramificación. Una planta de *Lupinus mutabilis* Sweet puede llegar a poseer hasta mil flores.

Con respecto al color de la flor, este es distinto durante su fase de maduración, ya que puede pasar de un azul claro hasta uno muy intenso. Los colores más usuales son el azul y el púrpura, mientras que lo menos recurrentes son el rosado, amarillo, crema y blanco. ⁽²⁰⁾



Figura N°4. Flores e inflorescencias de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho o Tarwi).

Semillas

Están ubicadas en las vainas, las cuales miden de cinco a doce centímetros. De otro lado, las semillas pueden ser ovaladas, redonda y hasta casi cuadrangular. Un kilo de semillas o grano puede significar de 3 500 a 5 000 de estas. Los tamaños de estas varían en función a las condiciones de crecimiento como el tipo de semilla y el ecotipo.

Sus colores son diversos, entre los que destacan: blanco, marrón, ocre, amarillo, gris, colores marmoleados. ^(16,18, 20)



Figura N° 5. Granos de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho o Tarwi) de distintos ecotipos.

El fenotipo para la manifestación del color de la semilla es muy complicado, debido a la presencia de genes tanto para la coloración relevante como para las combinaciones. ^(16,20)



Figura N°6. Raíces y nódulos del *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho o Tarwi).

2.2.1.3 Composición química valor nutricional

La leguminosa Chocho o Tarwi tiene un alto contenido en proteínas y grasas, por lo que su consumo frecuente favorecería el aporte de una gran cantidad de nutrientes a nuestra alimentación. Por otro lado, la cantidad de proteínas contenidas en este alimento es superior a la de la soya, además de su similitud en el contenido lipídico.

Tabla N°1 Composición por 100 g de porción comestible del Chocho.

Composición	Chocho cocido con cascara	Chocho crudo sin cascara	Chocho harina
Energía Kcal.	151	277	458
Agua g	69.7	46.3	37.0
Proteína g	11.6	17.3	49.6
Grasa g	8.6	17.5	27.9
Carbohidratos	9.6	17.3	12.9
Fibra g	5.3	3.8	7.9
Ceniza g	0.6	1.6	2.6
Calcio g	30	54	93
Fosforo mg	123	262	440
Hierro mg	1.4	2.3	1.38
Tiamina mg	0.01	0.60	-
Rivoflamina mg	0.34	0.4	-
Niacina mg	0.95	2.10	-
Ácido ascórbico	0.00	4.6	-

Fuente Caicedo c. (2000)

2.2.1.4. Propiedades medicinales y alimenticias

El *Lupinus mutabilis* posee dos primordiales activos, los cuales son: Isoflavonoides (hormonas vegetales), y Quinolizidinicos, los cuales son usados como esparteína para el uso de tónico cardíaco, antiespasmódico y sedante (Carrillo *et al.*, 2012). El Chocho es captado por las empresas dedicadas a la farmacéutica para la elaboración de sus productos.

Debido a que el Chocho posee alcaloides deben ser desaguados antes de ser consumido. Asimismo, se debe ser preciso con respecto a la dosis de esta planta para fines medicinales, ya que puede generar daños.

El *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) tiene la capacidad de lidiar con los parásitos, para ello debe consumirse de seis a diez semillas amargas antes de consumir algún alimento (ayunas), si la persona desea endulzar, entonces puede combinarse con miel.

Esta planta también es recomendable para personas que padecen de estreñimiento, para lo cual se recomienda consumir seis semillas cocidas.

El *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) es recomendado para las personas que padecen de reumatismo, artritis o gota, para ello debe consumirse en ayunas (una vez al día) seis semillas molidas, previamente maceradas en agua.

Esta planta también es utilizada como parte de una bebida para la tuberculosis.

2.2.2 *Escherichia coli*

Las bacterias son organismos unicelulares que están constituidos por una sola célula, el cual no posee núcleo. Su ADN se localiza libre en el citoplasma y no presenta organelos. Además, posee una pared celular que rodea la célula otorgándole solidez y protección. Las células son diminutas que no se pueden observar, sin embargo, cuando se unen entre sí creando colonias es más fácil observarlas. Cuando los factores ambientales se tornan desfavorables, la gran mayoría de bacterias crean de manera interna endosporas, quienes son las encargadas de comprender la sustancia genética y los elementos fundamentales para subsistir. Algunas de ellas se caracterizan por ser sólidas, facilitándoles la subsistencia a elevadas temperaturas. Su reproducción es de tipo asexual a través de la fisión binaria, el cual va a generar duplicados idénticos a la célula inicial. En algunos casos las bacterias realizan su réplica de forma tan rápida dando así a una población de millones de bacterias en un tiempo muy reducido ⁽²⁴⁾.

El término *Escherichia coli* fue denominado así en 1885 por Theodore Escherich. En un inicio se le otorgó el nombre de "*Bacterium coli commune*", sin embargo, en 1919 se le atribuyó a descubridor ⁽²⁵⁾.

La *Escherichia coli* es un elemento del microbiota del tracto digestivo de los mamíferos y la avifauna.

Los elementos más representativos de la especie son los bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1,1-1,5 μm de ancho y 2,0-6,0 μm de largo. “Según la cantidad de oxígeno requerido, se denominan como anaerobios facultativos y también móviles debido a flagelos sésiles”. (26)

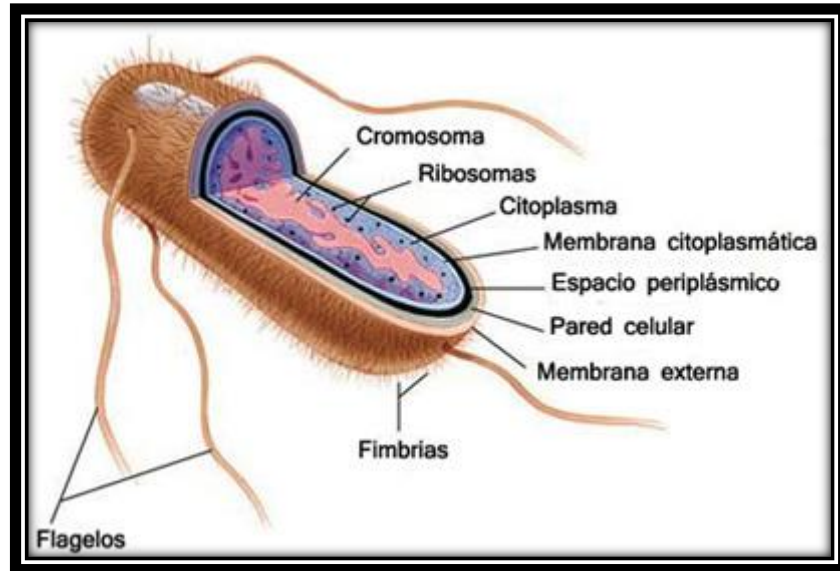


Figura N°7. Componentes estructurales de *Escherichia coli*.

2.2.2.1 Clasificación taxonómica

Desde el punto de vista taxonómico su clasificación es la siguiente:

PHYLUM: *PROTEOBACTERIA*

CLASE: *GAMMAPROTEOBACTERIA*

ORDEN: *ENTEROBACTERIALES*

FAMILIA: *ENTEROBACTERIACEAE*

GÉNERO: *Escherichia*

ESPECIE: *Escherichia coli* (26)

2.2.2.2 Escherichia coli como indicador de contaminación fecal

El *E. coli* es catalogado como un indicador de contaminación fecal. También es utilizado como un indicador para determinar si el agua es apta para el consumo humano. ⁽²⁶⁾

Por ello la presencia de *E. coli* alojados en organismos de agua en lugares tropicales han tenido relevancia durante los últimos años.

No obstante, es importante señalar que, el *Escherichia coli* a pesar de que sirve como un indicador de contaminación fecal, se han detectado grupos patógenos que ocasionan enfermedades intestinales en los animales, por ello se debe tener mucho cuidado al realizar el estudio de calidad microbiológica del agua ⁽²⁷⁾.

2.2.2.3 Grupos patógenos de Escherichia coli

Se diferencian dos extensas agrupaciones de *E. coli* patógenas de acuerdo a la infección que causen. La primera agrupación está compuesta por cepas de *E. coli* causantes de infecciones extra intestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal). La segunda agrupación posee varias clasificaciones, una de ellas es la estimación de factores de patogénesis y virulencia. Según esta clasificación, se identifican seis conjuntos: *E. Coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. Coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. Coli* enteroagregativas (EAEC), *E. Coli* enteropatogénicas (EPEC) y *E. Coli* enterohemorrágicas (EHEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (ADEC) ⁽²⁶⁻²⁷⁾.

Cabe señalar que, en 1998 O'Brien y Kaper, plantearon la formación de un grupo nuevo conformado por las cepas de *Escherichia coli*, fabricantes de toxina Shiga. Además, también son fabricantes de verotoxinas. Esta agrupación abarca al conjunto de las EHEC y algunos serotipos que no tienen los factores de virulencia generadores de la patogénesis, a pesar de que sí son capaces de producir las toxinas Shiga.

2.2.2.4 Infecciones en humanos

E. coli se hospeda, por lo general, en el tracto intestinal del humano y animales, pero no significa un principal agente perjudicial, debido a una exuberancia en la porción intestinal y su destreza de implantación. La existencia de esta bacteria en los alimentos o líquidos significa la presencia de una contaminación fecal. ⁽²⁸⁻²⁹⁾

Las infecciones producidas por la bacteria *E. coli*, se dividen en dos: extra intestinales e intestinales.

Las infecciones extraintestinales son producto del contacto entre personas, lo cual origina cistitis, pielonefritis. Producto de la relación estrecha entre el medio usual de los microbios y las vías urinarias. Esta clase de infección representa, al menos, el 20% del total de infecciones urinarias. Cabe señalar que en las personas que son medicadas con fármacos inmunosupresores, este microbio puede ocasionar infecciones agravadas. ⁽²⁵⁾

El *E. coli* es un microorganismo que reside usualmente en el intestino humano y animal (de sangre caliente), que realiza una notable función en el intestino. Por lo cual, este huésped habitual en el intestino se emplea desde hace un buen tiempo como la mejor señal que indica presencia de materia fecal en alimentos. ⁽²⁸⁾

2.2.2.5 Síntomas que produce la *E. coli*

Las cepas de *E. coli* que generan padecimientos se clasifican en función a los síntomas que presenta la persona. Esta clase de cepa se catalogan hasta en seis grupos, no obstante, sus propiedades no son únicas pues son compartidas entre estos. La *E. coli* shiga-toxigénica corresponde a estas. ⁽²⁹⁾

Esta bacteria puede producir una diarrea dócil e incluso una colitis con presencia de sangre. Con un porcentaje no menor de 10% de los enfermos, puede convertirse en un padecimiento de gravedad, tal es el caso del síndrome hemolítico urémico (SHU).

^(28 y 29)

2.2.2.6 Clasificación de los antibióticos utilizados contra la bacteria

Escherichia coli

Los antibióticos para eliminar el exceso de bacterias como *Escherichia coli*, que causan infección.

Tabla N°2 Clasificación de los antibióticos

FLUOROQUINONAS	BETALACTAMICOS	CEFALOSPORINA
<p>1.- GENERACION</p> <p>Ácido nalidixico Ácido pipemidico</p> <p>2.- GENERACION</p> <p>Norfloxacino Ciprofloxacino</p> <p>3.- GENERACION</p> <p>Levofloxacino Gatifloxacino</p>	<p>Ampicilina + Sulbactam (UNASYN)</p> <p>Amoxicilina + Ac. clavulánico (CLAVULIN)</p> <p>Piperacilina + Tazobactam (TAZOSIN)</p>	<p>1.-Generación</p> <p>Cefazolina, Cefadroxilo, Cefalexina, Cefalotina, Cefradina, cefroxadina</p> <p>2.- GENERACIÓN</p> <p>Cefuroxima, Cefaclor, Cefamandol, Cefoxítina, Cefuroxima, Cefotiam, Loracarbef</p> <p>3.- GENERACIÓN</p> <p>Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidime, Cefoperazona, Proxetil, Pivoxil, Ceftivutén, Moxalactam</p>

2.2.3 Ciprofloxacino

2.2.3.1 Farmacología del Ciprofloxacino

El Ciprofloxacino es un principio activo de la agrupación de las Quinolonas. Estos complejos se nombran también como Girasa. Agente de acción bactericida, de efecto rápido, no presenta resistencia cruzada con las penicilinas, tetraciclinas y aminoglucósidos. Por lo general los organismos resistentes a estos fármacos son sensibles al Ciprofloxacino. Además, está demostrado que cuando se acopla con otros agentes antibacterianos se muestran efectos aditivos.

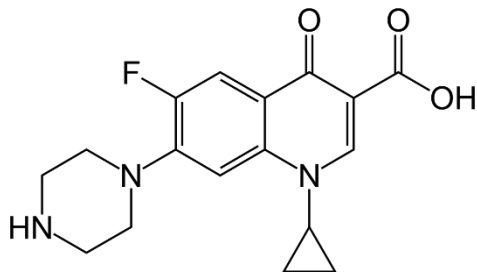


Figura N°8. Estructura molecular del Ciprofloxacino

2.2.3.1 Mecanismo de acción del Ciprofloxacino

El Ciprofloxacino impide la lectura a partir del cromosoma de los datos indispensables para el metabolismo de la bacteria, generando la reducción rápida de la capacidad reproductora.

Interviene intracelularmente por inhibición del ADN Girasa, un tipo II de Topoisomerasa, el cual es fundamental para el envolvimiento del ATP dependiente del ADN bacteriano; haciendo posible que este se replique y forme parte de ambas células hijas; el Ciprofloxacino inhibe la distensión del ADN enrollado promoviendo que el ADN de doble cadena se rompa.

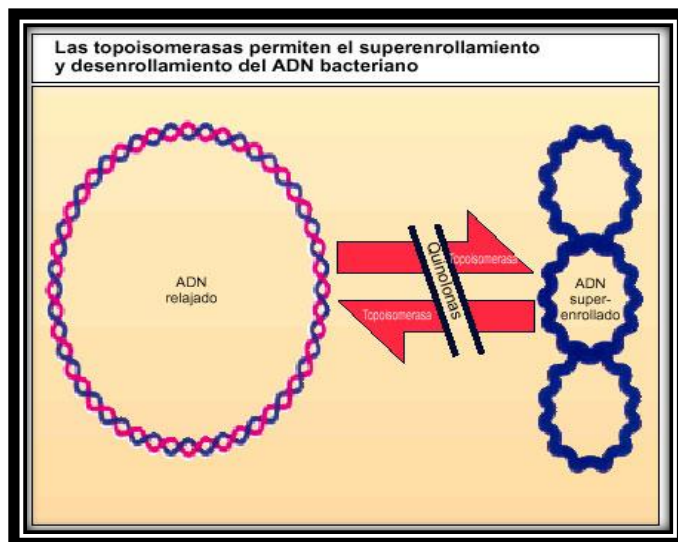


Figura N°9. Mecanismo de acción del Ciprofloxacino.

2.3 HIPÓTESIS

2.3.1. Hipótesis General

El extracto acuoso de semillas de "*Lupinus mutabilis Sweet*" (Chocho) tiene efecto antibacteriano in vitro frente a la cepa de *Escherichia coli* 8739.

2.3.2. Hipótesis Específicas

- 1.- El extracto acuoso de "*Lupinus mutabilis Sweet*" (Chocho) contiene compuestos como alcaloides y flavonoides en mayor presencia.
- 2.- Existe una concentración del extracto acuoso de semillas de "*Lupinus mutabilis Sweet*" (Chocho) con efecto antibacteriano frente a la cepa de *Escherichia coli*.
- 3.- El extracto acuoso de semillas de "*Lupinus mutabilis Sweet*" (Chocho) posee efecto antibacteriano comparado con el fármaco Ciprofloxacino frente a la cepa de *Escherichia coli*.

2.4 VARIABLES

2.4.1 Operacionalización de variables e indicadores

La Operacionalización de variables e indicadores se presenta en la tabla n°3

Tabla N° 3 Operacionalización de variables e indicadores

VARIABLES	DIMENSIONES		INDICADORES
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto acuoso de semillas de " <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> " (Chocho)	F I T O Q U Í M I C A	Prueba de Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Insoluble • Poco soluble • Medio Soluble • Soluble
		Marcha Fitoquímica	Identificación de compuestos: <ul style="list-style-type: none"> • Alcaloides • Flavonoides • Saponinas • Compuestos fenólicos • Aminoácidos
	Concentración del extracto acuoso del " <i>Lupinus mutabilis sweet</i> " (chocho)	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto al 20% • Extracto al 30% • Extracto al 40% 	
VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES		INDICADORES
Efecto antibacteriano frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> .	M I C R O B I O L O G Í C A	Difusión en agar en placas.	Diámetros de los halos de inhibición en mm según la escala Duraffourd.

2.5 MARCO CONCEPTUAL

In vitro

Técnica que determina reacciones biológicas que ocurren en células, tejidos, extractos celulares o en compuestos sintéticos de composición celular, en un ambiente controlado ⁽³⁴⁾.

Foliolo

Órgano o apéndice foliáceo pequeño; cada una de las hojas pequeñas que constituyen una hoja compuesta ⁽¹⁴⁾.

Simbiosis

Agrupación intrínseca, por lo general, obligatoria de dos seres de especies distintas que habitan ligados, pero no necesariamente con un vínculo de beneficio en relación de reciprocidad ⁽¹⁴⁾.

Bacterias

Microorganismos procariotas y unicelulares, no pertenecientes a las Arqueas. Componen un conjunto muy variado, de acuerdo a su metabolismo y su medio habitual, pueden ser acuáticas o terrestres, libres o parásitos, como saprófitos de plantas y animales, siendo los caracterizados parásitos los causantes de múltiples enfermedades infecciosas. ⁽³⁴⁾

Actividad antibacteriana

Disposición de abatir, exterminar o inactivar diversos microorganismos, e imposibilitar su reproducción y su accionar patógeno. ⁽³³⁾

Halos de inhibición

Sector entorno a un disco de antibiótico en una prueba que determina la sensibilidad potencial de una cepa bacteriana frente a un antibiótico. ⁽³⁴⁾

Tamizaje Fitoquímico

Son ensayos de tipo cualitativo que permiten la identificación del fruto a estudiar, es por lo general la presencia de determinados compuestos específicos derivados del metabolismo secundario de la planta.

También para los ensayos de metabolitos secundarios se les hace esta prueba, pero es común para todas las plantas, por eso carece de interés diagnóstico. Las pruebas para el tamizaje fitoquímico comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación, fluorescencia, micro sublimación).⁽³⁰⁾

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Tipo y Nivel de la Investigación

El tipo de estudio que se empleó para esta investigación fue de tipo básica, descriptiva y transversal. Es de carácter descriptivo, pues se detalló las variables: dependiente e independiente. El análisis es transversal, debido a que se realizó en un solo momento, además es básica pues los resultados podrían ser de aplicación práctica posterior.

El trabajo de investigación es correspondiente al nivel argumentativo- descriptivo, ya que se especifica el efecto antibacteriano del Chocho sobre la *Escherichia coli*.

3.2 Diseño a utilizar

El estudio replica el diseño cuasi experimental, in vitro donde se evaluó la variable Efecto antibacteriano del extracto acuoso del *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) a distintas concentraciones con respecto de un inóculo determinado de la bacteria. Su control negativo para determinar su poder antibacteriano. Este procedimiento cuasi experimental se desarrolló en un periodo de tiempo preestablecido, Octubre – Noviembre 2018; las mismas que se ejecutaron en las instalaciones de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.3 Población Y Muestra de la investigación

3.3.1 Población

- **Población Vegetal:** semillas o granos de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), se recolectó en el dpto. Ancash, prov. Antonio Raimondi en la ciudad de Llamellín que se encuentra sobre los 3,384 metros sobre el nivel del mar.
- **Población Microbiológica:** cepa de *Escherichia coli*

3.3.2 Muestra

- **Muestra Vegetal:** 500g semillas o granos de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), para realizar el estudio.
- **Muestra Microbiológica:** Cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739.

3.4 Equipos, materiales y reactivos

Equipos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

1. Balanza Analítica Digital
2. Estufa
3. Plancha de calentamiento
4. Luz UV 254 y 366 nm
5. Autoclave
6. Incubadora
7. Vernier

Materiales

Se utilizaron los siguientes materiales:

1. Papel Kraft
2. Matraz Erlenmeyer 250 y 500 ml
3. Embudo de vidrio
4. Papel filtro
5. Tubos de ensayo
6. Pipetas
7. Fiolas de 50 mL
8. Pipeta de 25 mL
9. Sacabocado
10. Placas Petri
11. Micropipetas de 100 μ L
12. Tubos de ensayo de 15 x 150
13. Mechero
14. Asa de Kolle

Reactivos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

1. Reactivo de Wagner
2. Reactivo de Dragendorf
3. Reactivo de Reineckato
4. Reactivo de Shinoda (magnesio + ácido clorhídrico concentrado)
5. Reactivo de Cloruro Férrico
6. Reactivo de gelatina al 1%
7. Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger)
8. Reactivo de Ninhidrina
9. Reactivo Fehling A-B
10. Solución de Lugol

11. Reactivo 2,4 DNPH
12. Metanol
13. Etanol
14. Cloroformo
15. Agua destilada
16. Isopropanol
17. Agar Soya Trypticasa
18. Solución salina fisiológica
19. Caldo Tioglicolato
20. Dimetil sulfóxido (DMSO)
21. Control Positivo "Ciprofloxacino"
22. Isopropanol
23. Reactivo de Tricloruro de Aluminio al 2%
24. Metanol: Agua (25:75)
25. BAW (Butanol: Agua: AAG) (4:3:1)
26. Ácido sulfúrico 2 N

3.5 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTAL

En el ámbito práctico del trabajo de investigación engloba los siguientes procedimientos: elaboración del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), los ensayos preliminares la prueba de solubilidad, tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina, así como el estudio de la actividad antibacteriana del *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho).

3.5.1 Proceso de elaboración del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho)

Para la elaboración del extracto se procedió de la siguiente manera:

A.- Recepción de la materia prima

Se recibió la materia prima: tallos, flores, hojas, vainas y semillas.

Pesando 3 kg total de la planta.

B.- Selección.

Se seleccionó la materia prima, se eliminan las flores, hojas, tallo y vaina. Se seleccionó solo 500 gr. de semilla (leguminosa) para la investigación.

C.- Lavado desinfectado y secado

Se lavó 2 veces con agua destilada y luego se procede a secar a temperatura ambiente.

D.- Calentamiento a 40°C

En un Beaker de 1000 mL se colocó 500 gr. de semilla y se vertió agua destilada hasta cubrirlo. Se lleva a la estufa a 40° C por un tiempo de 6 horas.

E.- Pelado

Se peló el fruto y se obtuvo 400 gr. y se trabajó con la pulpa.

F.- Extracción de reflujo de semillas de "*Lupinus mutabilis Sweet*"

Se colocó 200 gramos en un matraz de 500 mL y se vierte agua 350 mL hasta cubrir la semilla y se lleva a una plancha de calentamiento, luego se coloca el refrigerante y se procede a la extracción acuosa por reflujo a una temperatura de 45° C por 6 horas (esto se hace por duplicado).

Después se procede hacer el filtrado y se obtiene un total de 580 mL de extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho).

Se separan 180 mL para hacer las pruebas de tamizaje fitoquímico y cromatografía.

G.- Extracto Seco de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho)

400 ml del extracto líquido es puesto en crisoles y es llevado a la estufa a 40 °C por un tiempo de 24 horas. Luego del secado en la estufa se obtiene una melcocha de 40 gramos que usamos en la prueba de solubilidad y en la elaboración de las concentraciones del extracto.

3.5.2 Prueba de solubilidad

Para la prueba de Solubilidad se usó melcocha del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho). Se procedió de la siguiente manera:

En una gradilla se colocaron 5 tubos de ensayos, rotulados previamente, añadiendo una pequeña porción de melcocha con una espátula y es vertida a cada uno de los tubos de ensayo, luego con una pipeta se colocaron 3 mL de los solventes: Etanol, Metanol, Cloroformo, Agua e Isopropanol. Los resultados se muestran en la tabla N°5.

3.5.3 Tamizaje Fitoquímico

En una gradilla se colocó 12 tubos de ensayos, a cada tubo se le agregó 2 mL del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* luego se adicionó 5 gotas de cada reactivo a los tubos. En estas pruebas cualitativas se observaron reacciones de cambio de color, fluorescencia, reacciones de precipitación, etc., Los resultados se observan en la tabla N° 6

3.5.4 Prueba de Cromatografía en capa fina (CCF)

La localización de los complejos disociados, usualmente, se realiza por métodos genéricos o particulares, la luz UV posibilita detectar elementos que captan la longitud de onda larga 365nm y la onda corta a 254nm. Los resultados se observarán en la tabla N° 7.

3.5.5 Elaboración de las concentraciones de 20%, 30% y 40% del extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho)

Se tomó 30 gramos del extracto seco para obtener las concentraciones.

a) Extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 20%.

Se pesó 5 gramos del extracto seco de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) y se colocó en una fiola de 25 mL de capacidad. Después, se enrasó hasta los 25 mL con DMSO.

b) Extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 30%.

Se pesó 7.5 gramos del extracto seco de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) y se colocó en una fiola de 25 mL de capacidad. Luego se enrasó hasta los 25 mL con DMSO.

c) Extracto de *Lupinus mutabilis sweet* (Chocho) al 40%.

Se pesó 10 gramos del extracto seco de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) y se colocó en una fiola de 25 mL de capacidad. Seguidamente, se enrasó hasta los 25 mL con DMSO.

3.5.6 Cálculo de la concentración de la dosis del Ciprofloxacino a emplear

Pesamos un blíster de 10 tabletas de 500 mg para conseguir un peso promedio.

Repeticiones	Ciprofloxacino
M1	1,1822
M2	1,1781
M3	1,1877
M4	1,1803
M5	1,1817
M6	1,1877
M7	1,1787
M8	1,1920
M9	1,1952
M10	1,2062
PROMEDIO	1,1870
DESVIACIÓN	0,009

Entonces decimos que el peso promedio del Ciprofloxacino de 500mg es 1,1870 g.

Por lo tanto, preparamos una concentración de 150 mg.

$$\begin{array}{rcl} 1,187 \text{ gramos} & \longrightarrow & 500 \\ X \text{ gramos} & \longrightarrow & 150 \\ X & \longrightarrow & 0,3561 \text{ gramos} \end{array}$$

$$X = 35,6 \text{ mg}$$

Entonces 35,6 mg se pesará y se disolverá en 1 mL de DMSO (DIMETIL SULFOXIDO)

3.5.7 Método de difusión en agar en placa para determinar el efecto antibacteriano

- **Reactivación de cultivos de cepa *Escherichia coli***

La cepa de *E. coli* sembrado en Agar Soya Trypticasa durante 24 horas a 37 °C.

- **Preparación y estandarización de los inóculos de cepa *Escherichia coli***

A partir de un cultivo joven, las colonias de la cepa de *Escherichia coli* fueron suspendidas en caldo Tioglicolato, incubado a 37 °C por 24 h y de este se realizó una dilución con solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente al tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/mL).

- **Preparación del medio de cultivo**

La metodología de elaboración del medio de cultivo Agar Soya Trypticasa se encuentra relacionada a la marca del medio empleado.

Para este estudio se empleó el medio de marca Merck cuya forma de preparación es la siguiente, se pesó 20 gramos de medio Agar Soya Trypticasa que se diluyó en 500 mL de agua destilada, se procedió con la homogenización en baño María hasta lograr la disolución completa.

A continuación, se procede con la esterilización en el autoclave del medio de cultivo a 121°C y 15 lb de presión por un periodo de 15 minutos.

Terminado el periodo se retira el medio del autoclave dejando reposar hasta lograr que su temperatura aproximadamente se encuentre entre 45 a 50 ° C.

Una vez logrado que el medio se encuentre a la temperatura esperada, se incorpora empleando la micro pipeta un volumen de 100 µL del inóculo estandarizado de *Escherichia coli* por cada 100 mL de agar preparado, homogenizando con movimientos circulares.

Empleando una pipeta de 25 mL depositamos el agar Soya Trypticasa que contiene el inóculo estandarizado de *Escherichia coli* en una placa Petri, dejando solidificar por un lapso mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente, rotular la placa.

- **Determinación del Efecto Antibacteriano**

El efecto antibacteriano se definió a través de la técnica de Difusión en Agar (excavación en placa).

La actividad antibacteriana del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) se realizó a partir de una muestra llevada a sequedad bajo técnicas especificadas anteriormente; frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739, en concentraciones de 20%, 30% y 40%, empleando el método de difusión en agar (excavación en placa), evaluando el diámetro del halo que genera. Considerando como controles de magnitud: un blanco Dimetil Sulfóxido DMSO para descartar que la actividad inhibitoria del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho), un control positivo de actividad antibacteriana seleccionando al Ciprofloxacino.

A cada placa de agar Soya Trypticasa que contiene el inóculo estandarizado de *Escherichia coli*, se hicieron excavaciones en número de tres por cada placa de 8mm de diámetro y 8 mm de profundidad empleando un sacabocado estéril, distribuidos de la siguiente manera:

Tabla N°4 La distribución de los grupos para determinar el grado de concentración del extracto.

GRUPOS	BLANCO	CONTROL POSITIVO	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO
Grupo N°1 (5 placas)	DMSO	Ciprofloxacino 150 mg/mL	Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) al 20%
Grupo N°2 (5 placas)	DMSO	Ciprofloxacino 150 mg/mL	Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) al 30%
Grupo N°3 (5 placas)	DMSO	Ciprofloxacino 150 mg/mL	Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) al 40%

Elaboración: Propia

En cada placa se colocó el blanco, el control positivo y una concentración del extracto y se repitió 5 veces. De manera similar se hizo con las otras dos concentraciones, se rotuló cada una de las placas y se procedió a incubarlas a 37°C por un periodo de 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a retirar las placas de la incubadora para luego tallar los diámetros de los halos de inhibición empleando el vernier y proceder con el análisis estadístico de los resultados.

- **Evaluación del efecto antibacteriano**

La valoración se efectuó cuantitativamente a través de medición numérica de los halos de inhibición, y cualitativamente mediante un patrón de la escala Duraffourd⁽³⁸⁾ (tabla N° 12).

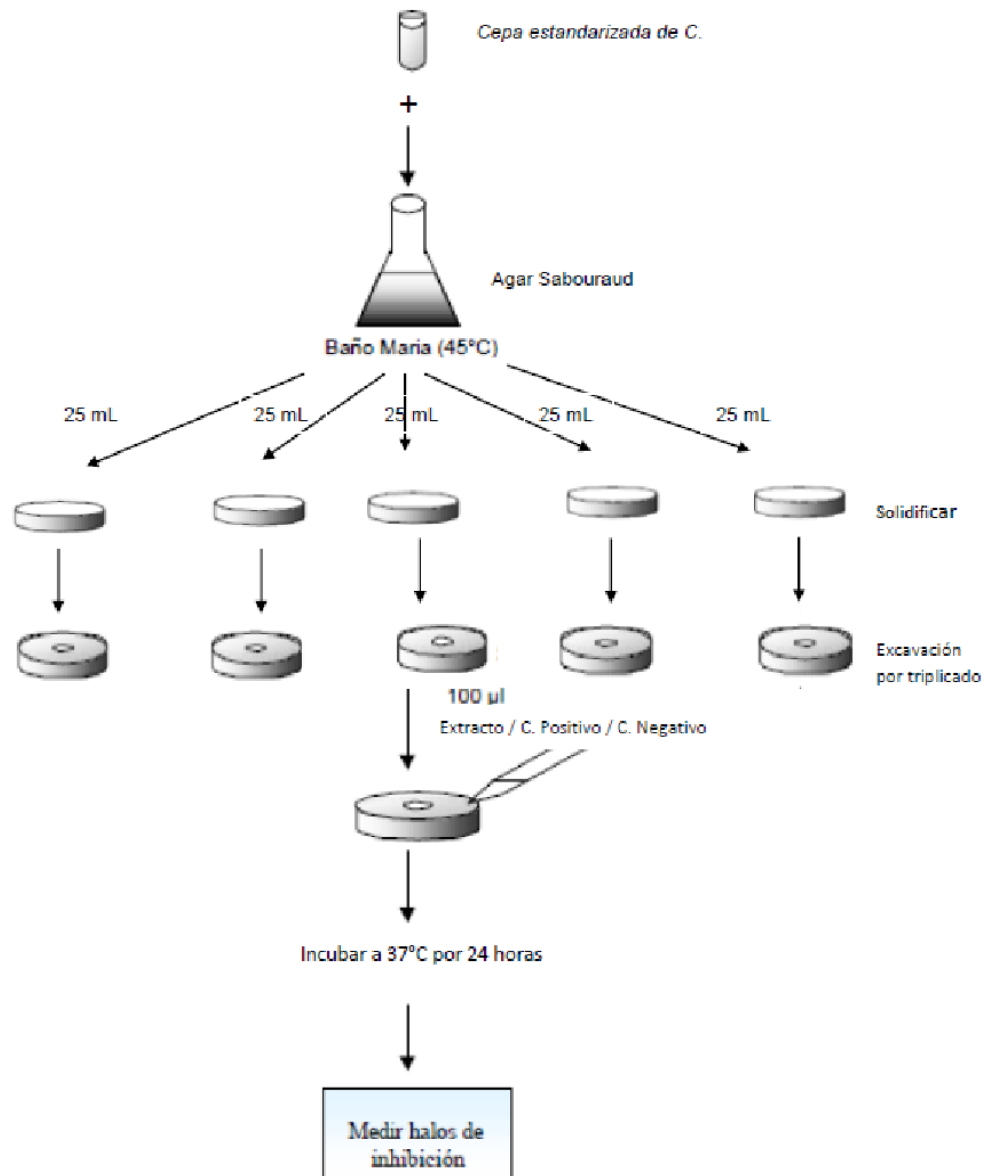


Figura N° 10. Procedimiento microbiológico del ensayo.

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica que se utilizó para la recolección de información fue la observación, a través de la elaboración de una ficha de registro de datos obtenidos en cada proceso, que posibilitó registrar minuciosamente los procesos que permitan llegar a los hallazgos. Asimismo, se emplearon fotografías a fin de acreditar los procedimientos efectuados. **(Anexo 8)**

La prueba de solubilidad, el tamizaje fitoquímico y ensayos previos, así como también el estudio de la dinámica antimicrobiana de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) se ejecutaron en los laboratorios de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.7 Procesamiento de Datos

Se procedió a estructurar las fichas de recopilación y enlistarlas a fin de ser incorporadas a la base de datos en Microsoft Excel.

Se utilizó la prueba paramétrica ANOVA para la contrastación de hipótesis, la comparación de los grupos se aplicó la prueba de Tukey.

La información recolectada se analizó, se implementó estadística descriptiva con el propósito de fijar la distribución de los datos almacenados a través de medidas de tendencia central, dispersión, forma y posición. Igualmente se aplicó estadística inferencial con respecto a las hipótesis de la investigación. Se presentaron los resultados en tablas además de su correspondiente representación gráfica. Se consideró un margen de error estadístico de 5%.

CAPÍTULO IV

4.1 PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1.1 Resultados de la Prueba de Solubilidad

Los resultados de la prueba de la solubilidad se muestran en la tabla n° 5.

Tabla N° 5 Los Resultados de la prueba de Solubilidad

PRUEBA DE SOLUBILIDAD Extracto de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho)	
Solventes	Resultado
Metanol	(+)
Etanol	(+)
Cloroformo	(-)
Agua	(+++)
Isopropanol	(-)

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: (-) Insoluble
(+) Poco soluble
(++) Soluble
(+++) Muy soluble

En la Tabla N° 5, se señala que el extracto de semilla de *Lupinus mutabilis Sweet* es soluble en agua (+++) seguido por el etanol y metanol (+)

4.1.2 Resultados Del Tamizaje Fitoquímico

Los resultados del tamizaje fitoquímico se observan en la tabla n° 6.

Tabla N° 6 Los resultados del tamizaje fitoquímico

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS		
Extracto de semilla de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Chocho)		
Metabolitos Primarios	Reactivo de identificación	Resultado
Azúcares reductores	Fehling Ay B	(+)
Almidón	Lugol	(-)
Cetonas y Aldehídos	2,4 DNPH	(+)
Aminoácidos	Ninhidrina	Color violáceo (+++)
Metabolitos secundarios	Reactivo de identificación	Resultado
Alcaloides	Wagner	Coloración marrón (+++)
	Dragendorf	Precipitado rojo o naranja (+++)
	Reineckato	Color lila (++)
Compuestos fenólicos y Flavonoides	Shinoda	color rojo (++)
	Cloruro férrico	Color verde oscuro (+)
	Gelatina al 1%	Precipitado blanco (+)
	Reacción de Bortranger	Color rojo (-)
Saponinas	Espuma x 15 min	Espumas (+)

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- (No se evidencia)
- + (Se evidencia poco)
- ++ (Se evidencia moderadamente)
- +++ (Se evidencia notablemente).

En la Tabla N° 6, se evidencia en el extracto de semillas de *Lupinus mutabilis* mayor presencia de alcaloides (+++), aminoácidos (+++) y flavonoides (++)

4.1.3 Resultados de la cromatografía en capa fina

Los resultados de la CCF del extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) se observan en la tabla n°7.

Tabla N° 7. Resultados de la CCF del extracto de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho).

METABOLITOS SECUNDARIOS	FASE MOVIL	FASE ESTACIONARIA	RESULTADOS
Alcaloides	Metanol: Agua en proporción de (25:75)	Marca Comercial Merck (TLC Silica gel F ₂₅₄)	Presenta manchas: coloración anaranjado
Flavonoides	Butanol: Agua: Ácido acético glacial en proporción de (20:15:5)	Marca Comercial: Merck (TLC Silica gel F ₂₅₄)	Presenta manchas: Amarillo oscuro

Fuente: Elaboración Propia

En la Tabla N°7, se visualiza que el extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) presenta alcaloides (presencia de manchas de coloración anaranjado). Además, se percibe la presencia de flavonoides (manchas de color amarillo oscuro).

4.1.4 Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana por el método de Difusión en agar.

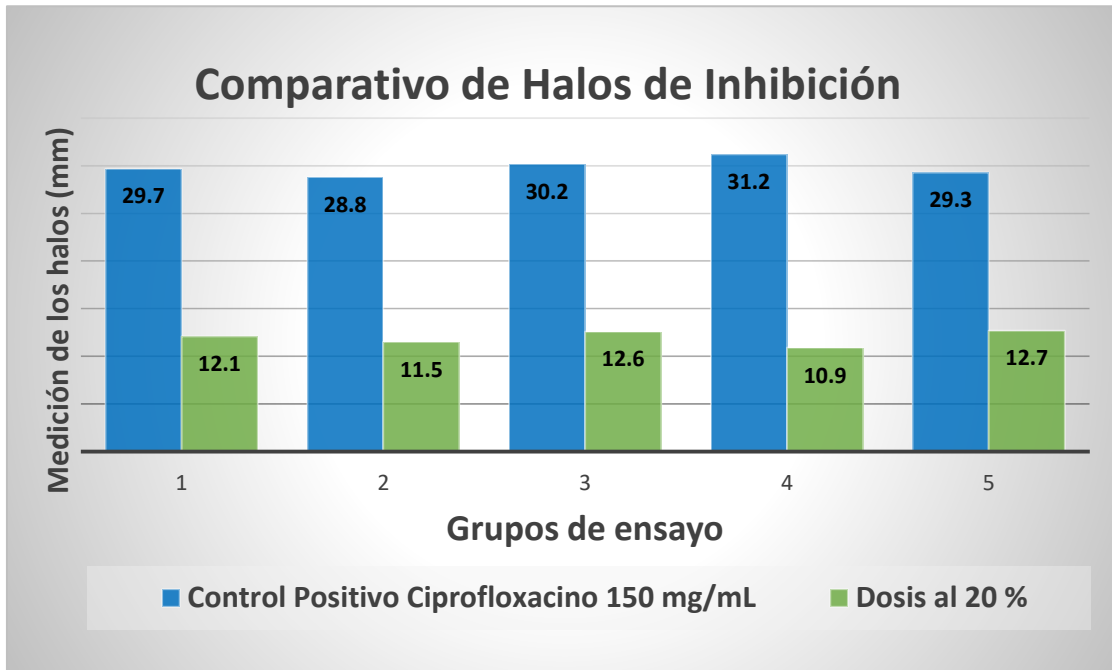
Los resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 20% se observan en la tabla n°8.

Tabla N° 8. Resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso del fruto *Lupinus mutabilis sweet* (Chocho) al 20%.

N° DE PLACAS	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO		
	DMSO	Ciprofloxacino 150 mg/mL	Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (Chocho) al 20%
1	0 mm	29.7 mm	12.1 mm
2	0 mm	28.8 mm	11.5 mm
3	0 mm	30.2 mm	12.6 mm
4	0 mm	31.2 mm	10.9 mm
5	0 mm	29.3 mm	12.7 mm
PROMEDIO	0 mm	29.8 mm	12.0 mm
DESVIACIÓN	0	0.9	0.8

Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la Tabla N° 8. Se observa que el efecto antibacteriano del extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* al 20 % tiene un halo de inhibición promedio de 12 mm sensible (+). El Control positivo de Ciprofloxacino muestra un halo de inhibición promedio de 29.8mm sumamente sensible (+++).



Fuente: Elaboración propia, 2019

Figura N° 11. Comparación de actividad antibacteriana (halos de inhibición) del extracto de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) al 20% con el Ciprofloxacino 150mg, después de 24 horas de incubación a 37 °C en estos 2 grupos de ensayos con 5 repeticiones cada una de ellas.

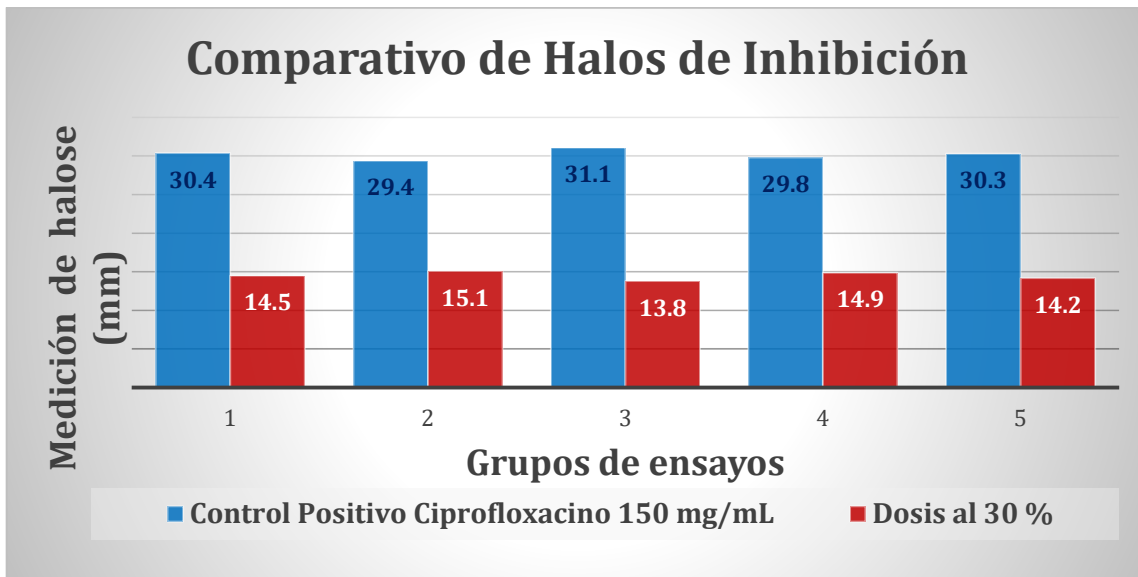
Los resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 30% se muestra en la tabla n°9.

Tabla N° 9 Resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) 30%.

N° DE PLACAS	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO		
	DMSO	Ciprofloxacino 150 mg/mL	Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) al 30%
1	0 mm	30.4 mm	14.5 mm
2	0 mm	29.4 mm	15.1 mm
3	0 mm	31.1 mm	13.8 mm
4	0 mm	29.8 mm	14.9 mm
5	0 mm	30.3 mm	14.2 mm
PROMEDIO	0 mm	30.20 mm	14.5 mm
DESVIACIÓN	0 mm	0.64	0.52

Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la Tabla N° 9. Se observa el efecto antibacteriano del extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* al 30% tiene un halo de inhibición promedio de 14.5 mm. Muy sensible (+). El Control positivo de Ciprofloxacino muestra un halo de inhibición promedios de 30.20 mm sumamente sensible (+++).



Fuente: Elaboración propia, 2019

Figura N° 12. Se muestra el efecto antibacteriano extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 30% en comparación con el Ciprofloxacino 150mg, en función a los diámetros de halos de inhibición. En agrupaciones de pruebas con 5 repeticiones cada una de ellas.

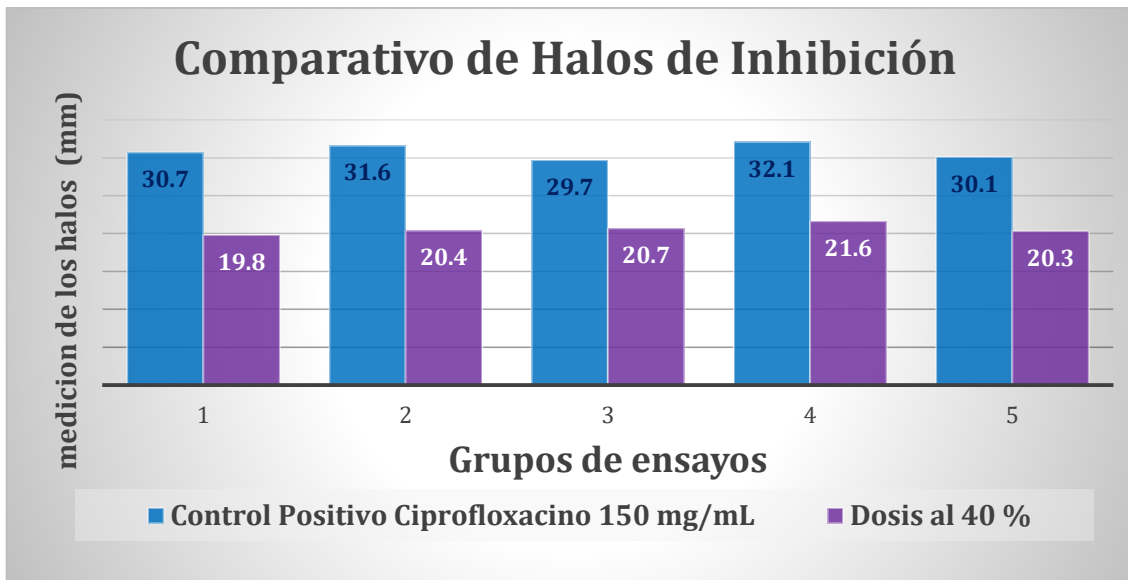
Los resultados de la actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 40% se muestra en la tabla n°10.

Tabla N° 10 Resultados de actividad antibacteriana (halo de inhibición) del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis sweet* (Chocho) 40%.

N° DE PLACAS	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO		
	DMSO	Ciprofloxacino 150 mg/mL	Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) al 40%
1	0 mm	30.7 mm	19.8 mm
2	0 mm	31.6 mm	20.4 mm
3	0 mm	29.7 mm	20.7 mm
4	0 mm	32.1 mm	21.6 mm
5	0 mm	30.1 mm	20.3 mm
PROMEDIO	0 mm	30.8 mm	20.56 mm
DESVIACIÓN	0	1.0	0.67

Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la Tabla N° 10. Se muestra actividad antibacteriana del extracto de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* al 40% tiene un halo de inhibición promedio de 20.56 mm sumamente sensible (+++). El Control positivo de Ciprofloxacino presenta un halo de inhibición promedios de 30.8 mm sumamente sensible (+++).



Fuente: Elaboración propia, 2019

Figura N° 13: Se muestra el efecto antibacteriano del extracto de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) al 40% en comparación con el Ciprofloxacino 150 mg, en función a los diámetros de halos de inhibición en agrupaciones de pruebas con 5 repeticiones cada una de ellas.

Los resultados de comparaciones de la actividad antibacteriana, del porcentaje y dosis de inhibición de los 3 grupos experimentales de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho). Se observa en la tabla n° 11.

Tabla N° 11. Resultados de comparaciones de actividad antibacteriana del porcentaje y dosis de inhibición de los 3 grupos experimentales de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho).

N° Placas	Dosis al 20 %	Porcentaje	Dosis al 30 %	Porcentaje	Dosis al 40 %	Porcentaje
1	12.1	40.7	14.5	47.70	19.8	64.50
2	11.5	39.9	15.1	51.36	20.4	64.56
3	12.6	41.7	13.8	44.37	20.7	69.70
4	10.9	34.9	14.9	50.00	20.3	67.29
5	12.7	43.3	14.2	46.86	21.6	67.44
Promedio	12.0	40.1	14.5	48.1	20.6	66.7

Fuente: Elaboración propia, 2019

En la **Tabla 11.** Se determinó actividad antibacteriana, que el mayor porcentaje de inhibición de los grupos experimentales está presente en la dosis al 40% (67.44%), mientras que el menor porcentaje de inhibición se encontró en la dosis al 20% (43.3%).

Tabla N° 12. Resultados en la Escala de Duraffourd.

Concentración	Media Halo (mm)	Escala de Duraffourd
20%	12.01	Sensibilidad limite (+)
30%	14.5	Sensibilidad media (++)
40%	20.56	Sumamente sensible(+++)

Fuente: Elaboración propia, 2019.

- ❖ Nula (-): diámetro inferior a 8 mm.
- ❖ Sensibilidad límite (sensible = +): diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- ❖ Medio (muy sensible = ++): diámetro de 14 a 20 mm.
- ❖ Sumamente sensible (+++): diámetro superior a 20 mm.

Tabla N°13 Resultados de valores estadísticos del análisis de varianza de un factor

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control Negativo Dimetil sulfóxido	5	0	0	0
Control Positivo Ciprofloxacino 150 mg/mL	5	149.2	29.84	0.843
Dosis al 20%	5	59.8	11.96	0.578
Dosis al 30%	5	72.5	14.5	0.275
Dosis al 40%	5	102.8	20.56	0.443

Fuente: Elaboración propia, 2019

En la **Tabla N° 13**. Se observan los resultados que se manejan bajo la base estadística de análisis de varianza demostrando que no existe homogeneidad en las dosis tratadas con un nivel de significancia del 95%.

4.2 Contrastación de hipótesis

Prueba de Hipótesis:

H₀ = todos los grupos presentan igual inhibición del halo ($p > 0.05$)

H_a = todos o al menos uno de los grupos presentan diferente inhibición del halo ($p < 0.05$)

Criterio de aceptación:

Debido a que el nivel de significancia empleado es 0.05 y el p calculado es menor que tal valor y $F > F$ (crítico), rechazamos la hipótesis nula y aprobamos la alterna, por lo tanto, estadísticamente existe diferencia en todas las concentraciones ensayadas.

Anova es útil para aquellos supuestos que se quiere analizar en distintas situaciones que ocurre en el experimento. También denominado F (en honor al estadístico Ronald Fisher), se concluye que, cuanto más difieren las medias de la variable dependiente entre los grupos de la variable independiente más alto es el valor de F. La estadística F sigue una distribución F con grados de libertad ($n - 1$) para un nivel de confianza del 95% y 5% de error. Donde, los resultados emiten que valor ($p < 0,05$) Que los extractos presentan diferente actividad antimicrobiano sobre la cepa de *Escherichia coli* con respecto al Ciprofloxacino 150 mg/mL.

4.3 Discusión de resultados

En esta investigación se determinó la evidencia notable de alcaloides, aminoácidos y flavonoides; en cambio, se encontró poca evidencia de compuestos fenólicos. En este contexto, se pudo demostrar la presencia de metabolitos secundarios, lo cual estaría siendo ratificado por algunos estudios que obtuvieron resultados similares; tal es el caso de **Yepes, A.** ⁽⁹⁾ “Efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas de Chocho, *Lupinus mutabilis* sobre *Alternaria solani* y *Fusarium solani*”. De la misma forma, **Chura, B.** ⁽¹⁰⁾ en su investigación titulada “Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones (*Lupinus mutabilis* Sweet) de Chocho en *Escherichia coli* y *Candida albicans*”. Obtuvieron como resultado que las semillas de Chocho presentaron abundante contenido de alcaloides (+++).

A nivel internacional, un trabajo que coincide con los resultados del tamizaje fitoquímico aquí realizado, es el de **Rodríguez, A** ⁽¹⁾ cuyo estudio se titula “Determinación in vitro de la actividad antibacteriana de los alcaloides del agua de desamargado del *Lupinus mutabilis* (Chocho)”, donde registró presencia abundante de metabolitos secundarios del extracto alcohólico proveniente del agua de cocción del fruto del Chocho, tales como alcaloides, triterpenos y esteroides; con escasa presencia, identificó flavonoides, saponinas, aminoácidos libres, fenoles y taninos, y azúcares reductores. Determinó, además, que en el extracto alcohólico de hojas del Chocho la presencia de alcaloides es baja mientras que en el fruto se encuentran en abundancia. Otro trabajo desarrollado a nivel internacional es el de **Villacrés, E. et al.**, ⁽¹²⁾ titulado “Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del Chocho, demostró que el grano de *Lupinus mutabilis* contiene alcaloides, los cuales le confieren un sabor amargo característico.

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación, cobra relevancia el hecho de que el mayor efecto antibacteriano se alcanzó con la dosis del extracto acuoso en concentración al 40%. Este hallazgo coincide con lo encontrado por **Añamuro** ⁽⁸⁾ en su investigación titulada “Evaluación del efecto biocida del extracto

acuoso de granos de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) sobre *Thrips tabaci* Lindeman en siembras de cebolla”, ya que encontró que la actividad antibacteriana del extracto acuoso del *Lupinus mutabilis* (chocho) tiene un mejor porcentaje de inhibición a la dosis del 40%. Asimismo, **Villacrés, E** ⁽¹²⁾ en su investigación titulada “Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)”, observó que mediante el método de dilución en placas Petri, usando como medio de cultivo agar base, que la concentración inhibitoria mínima (CIM) contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, del extracto de hojas de Chocho y la maceración del grano en agua, es de 10 y 12,5 mg/mL respectivamente.

Con referencia a la hipótesis general sobre la actividad antibacteriana del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho), los resultados obtenidos con la prueba inferencial ANOVA confirman que el extracto acuoso de semillas de Chocho tiene efecto antibacteriano positivo frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739. Cabe señalar que en este estudio también se registró efecto antibacteriano positivo con dosis al 20% y 30% del extracto acuoso del Chocho, resultado que es congruente con lo hallado por **Chura, B.** ⁽¹⁰⁾ en su investigación titulada “Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones del Chocho en *E. coli* y *C. albicans*”, pues llega a la conclusión de que las decocciones de hoja, flores y semillas del Chocho al 100%, lograron las más altas inhibiciones de *E. coli* con 9.63, 8.77 y 9.27 mm, respectivamente. Por su parte, **Rodríguez, A.** ⁽¹⁾ en su trabajo sobre la evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides del agua de desamargado del Chocho, llegó a la conclusión que la concentración de alcaloides, incluyendo Lupanina, es de 36%, facilitando mediante la cocción, una mayor liberación de este compuesto de interés farmacológico frente al microorganismo en estudio.

Los resultados de esta investigación, en cuanto a comparaciones del porcentaje y dosis de inhibición de los grupos experimentales con el extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* (Chocho), indican que los porcentajes de inhibición para las dosis de 20%, 30% y 40%, fueron de 43,3%, 46,86% y 67,44%,

respectivamente. No obstante, frente al Ciprofloxacino como control positivo, este último registró un superior halo de inhibición de 20.56 mm. Al respecto, Méndez, ⁽¹²⁾ en su investigación titulada “Actividad antibacteriana de un gel obtenido del extracto alcaloidal del *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho)”, obtuvo porcentajes de inhibición bacteriana del 84, 86 y 93% respectivamente para infecciones epidérmicas causadas por *S. aureus*.

Citando la tesis de **Chura, B.** ⁽¹⁰⁾ titulada “Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones (*Lupinus mutabilis* Sweet) de Chocho en *Escherichia coli* y *Candida albicans*”. Se determinó las decocciones de hoja, flores y semillas al 100%, lograron las más altas inhibiciones de *E. coli* con 9.63 mm, 8.77 mm y 9.27 mm respectivamente; por otro lado, las decocciones de hoja, flores, semillas concentraciones de 50% y 100% lograron las más altas inhibiciones de los microorganismos de *C. albicans* con 11.37 mm y 12.03 mm respectivamente.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) contiene mayor cantidad alcaloides, aminoácidos y flavonoides.
2. El extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 40 % presenta mayor efecto antibacteriano frente a las cepas de *Escherichia coli*.
3. Comparando la actividad antibacteriana del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) al 40% (halo de inhibición 20.56) frente al Ciprofloxacino (halo de inhibición 30.8mm) este último presenta mayor efecto antibacteriano (halo de inhibición 30.8mm).

RECOMENDACIONES

1. Proponer ensayos que validen el grado de efectividad del *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) frente a diversas bacterias y en comparación con otros fármacos.
2. Proyectarse a futuro el consumo del *Lupinus mutabilis Sweet* (Chocho) en la elaboración de productos farmacéuticos alternativos.

REFERENCIAS

1. Rodríguez A. Evaluación “*in vitro*” de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) (Tesis de grado para la obtención del título del bioquímico farmacéutico). Chimborazo; Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2009.
2. Organización Mundial de la Salud. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. OMS. Nota de prensa 2018.
3. Arias, L. Análisis comparativo de dos métodos de aislamiento y determinación de alcaloides de *Lupinus mutabilis* (Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Industrias Alimentarias). Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2000.
4. McCawley, E. Cardio active alkaloids, In: The alkaloids, chemistry and physiology. Ed. Manske, New York: AcademicPress; .2000.
5. Vélez, A. Fundamentos de medicina corporación para investigaciones biológicas edición. Colombia; 1996.
6. Guerrero, M. Alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Evento de información y difusión de resultados de investigación sobre el chocho. Conacyt. Ambato; 1999.
7. Castañeda C, Manrique M, Ibáñez V, Gamarra C, Galán L, Quispe H. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi, Chocho), en animales de experimentación. Medicina Horizonte. 2002; 2(3).
8. Añamuru C. Determinación del efecto biocida del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) sobre *Thrips tabaci Lindeman* (Trips) en cultivos de cebolla (Tesis de pregrado). Arequipa; Universidad Católica de Santa María:2016.

9. Yepes, A. et al. Efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas de Chocho, *Lupinus mutabilis* sobre *Alternaria solani* y *Fusarium solani*. REBIOL.; Vol. 29, N° 1: enero - junio, 2009.
10. Chura, B. Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en *Escherichia coli* y *Cándida albicans* (Tesis para optar el título profesional de licenciado de biología). Puno; Universidad Nacional del Altiplano: 2017.
11. Méndez E. Elaboración de medicamentos; control de calidad de medicamentos; actividad antimicrobiana; investigación *in vitro*; gel de chocho; extracto coloidal de chocho (Tesis de grado). Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2010.
12. Villacrés, E. et al. Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). INIAP-ESPOCH-SENACYT. Págs. 6, 8 y 10. Editorial Grafistas, Quito, Ecuador; 2009.
13. Torres F., 1976, "*Lupinus mutabilis* Sweet", a potent food source from the Andean region. Am. J. Clin. Nutrition 25:833.
14. Gross. Citado en Velásquez J. 1993. En: "Evaluación de 283 especies de lupinos del Banco de Germoplasma del INIAP" (Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias: 1982.
15. Salis, A. Cultivos Andinos Alternativa Popular. Cuzco: Centro de Estudios Rurales Andinos Bartolomé de las Casa CEDEP- AYLLU. 1985; 89.
16. Siavichay, G. Evaluación agronómica de quince ecotipos de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y aspectos relacionados al mejoramiento genético de esta especie (Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ingeniería Agronómica. Ecuador: 1986.
17. Katzung, B. G. Farmacología Básica y Clínica. 9a. ed. México: Manual Moderno. 2005; 64-68.
18. Gross, R. Y Tuesta, L. El cultivo y la utilización de los lupinos. Perú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 1977;154-165.

19. Campana, A. Efecto del hervido y del lavado, sobre el peso, volumen y contenido de alcaloides en el grano de Tarwi. Perú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 1988; 303-305.
20. Castañeda, C. Estudio comparativo de 10 variedades de Tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) conducidos en dos ambientes de la sierra, norte y centro del Perú (Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo). Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina: 1988.
21. Ortega, R. y Palacios, A. Efecto del tiempo de remojo, cocción, y lavado sobre el contenido de alcaloides y proteína en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) (Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos). Ambato. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos: 1995.
22. Jarrín P. Tratamiento del agua de desamargado del Chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. (Tesis doctoral en Bioquímica y Farmacia). Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias: 2003.
23. Sacsquispe R, Lucho J. Seis años de vigilancia de la resistencia antimicrobiana a bacterias de origen hospitalario. Boletín Semanal del Instituto Nacional de Salud. 2009; 6 (32):5
24. Kaper J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. Int. J. Medical Microbiol. 2005; 295 (1): 355-356.
25. Scheutz F. y Strockbine N.A. Genus I. *Escherichia*. In: Brenner, D.J., et al. (Eds.) The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. Springer. 2005; 2 (Part B) 607-623.
26. Edberg S, Rice E, Karlin R, Allen M. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. J. Appl. Microbiol. 2000; 88 (10): 106–116.
27. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Rev. Salud Pública de México. 2002, 44 (5): 464-475.

28. Nataro J.P. y Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Reviews. 1998; 11 (1):142-201.
29. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2004; 2(2): 123-140.
30. Domínguez, X. 1973. Alcaloides. Métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa, Nuevo León. pp. 211-226.
31. Zamora, N. et. al. 2002. In vitro Antifungal Activity of *Lupinus montanus* Extract and Lupanine on *Fusarium oxysporum* f. sp melonis. In: Proc. 10th Int. Lupin Conference. Van Santen E., M. Wink, S. Weissmann, and P. Romer (eds). Laugarvatn, Iceland. pp: 255-256.
32. Alcaloides quinolizídicos.
[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocuments/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$file/web_alcaloides.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocuments/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$file/web_alcaloides.htm)
 20070528
33. Diccionario Akal de términos biológicos, traducción de Rocío Codes Valcarce y Francisco Javier Espino Nuño. Duodécima Ed. Madrid. Ediciones Akal S.A. 2003.
34. Sacsquispe C, Velásquez, P 2002 Instituto de investigación manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión serie de Normas Técnicas N° 30 Lima – Perú.
35. Hernández Sampieri, Roberto; et al. Metodología de la Investigación. 2ª. ed. McGraw-Hill, 1998, México.
36. Duraffourd C, Hervicourt L, Lapraz J. cuadernos de fitoterapia clínica 4th ed. Barcelona: Masson; 1987.
37. Betran et al. 2015. Received: 27 February 2015; Accepted: 13 May 2015; Published: 21 June 2015.
38. CULTIVOS ANDINOS FAO 2007.
http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/cap03_1_3.htm.20070816

39. Carrillo C, Cavia M and Alonso-Torre S. 2012. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review *Nutrición Hospitalaria* 27(5): 1860-1865. <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v27n6/10revision09.pdf>
40. Coloma J M. Evaluación “*in vitro*” de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador; 2009.

Anexo 1: Matriz de consistencia

EFECTO ANTIBACTERIANO <i>IN VITRO</i> DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLAS DE “ <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ” (Chocho) FRENTE A CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA	INSTRUMENTOS
¿Cuál será el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739?	Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.	El extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) tiene efecto antibacteriano frente a las cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	TIPO	1. Ficha de observación 2. Técnica: Extracción de los alcaloides del Chocho (Extracción alcalina).
			Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho)	Prueba de Solubilidad. Marcha fitoquímica	Experimental Transversal	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	NIVEL	
1. ¿Qué clase de compuestos presenta con mayor concentración el extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho)? 2. ¿En qué concentración del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) posee efecto antibacteriano frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> ? 3. ¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) comparado con el fármaco Ciprofloxacino?	1. Determinar los compuestos con mayor presencia en el extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho). 2. Determinar la concentración del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) que posee efecto antibacteriano frente a cepa de <i>Escherichia coli</i> . 3. Comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) con el fármaco Ciprofloxacino.	1. El extracto acuoso del <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) contiene compuestos como alcaloides y flavonoides en mayor presencia. 2. Existe una concentración del extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> (chocho) con efecto antibacteriano frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> . 3. El extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Chocho) posee efecto antibacteriano comparado con el fármaco Ciprofloxacino frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> .	Efecto antibacteriano frente a la cepa <i>Escherichia coli</i>	Método de Difusión en agar en placas.	Quantitativo - Aplicativo	
					DISENO	Quasi experimental

Anexo 2: Ficha de recolección de datos

GRUPOS DE PLACAS	CONTROLES		(Concentraciones) Muestras de semillas de " <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> " (Chocho)		
	Ciprofloxacino 150 mg/mL	DMSO	20 %	30%	40%
	DIÁMETRO DE INHIBICION (mm)				
1					
2					
3					

Anexo 3:
Resultados de análisis estadísticos del efecto antimicrobiano in vitro del extracto acuoso al 20% de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739

Descriptivos ^a					
	Grupos		Estadístico	Error estándar	
Halo de inhibición (mm)	Dosis al 20%	Media		11,960	0,3400
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	11,016	
			Límite superior	12,904	
		Media recortada al 5%		11,978	
		Mediana		12,100	
		Varianza		0,578	
		Desviación estándar		0,7603	
		Mínimo		10,9	
		Máximo		12,7	
		Rango		1,8	
		Rango intercuartil		1,5	
		Asimetría		-0,586	0,913
		Curtosis		-1,358	2,000
		Control positivo (Ciprofloxacino 150 mg/ml)	Media		29,840
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	28,700	
			Límite superior	30,980	
	Media recortada al 5%		29,822		
	Mediana		29,700		
	Varianza		0,843		
	Desviación estándar		0,9182		
	Mínimo		28,8		
	Máximo		31,2		
	Rango		2,4		
	Rango intercuartil		1,7		
Asimetría		0,687	0,913		
Curtosis		0,255	2,000		

a. Halo de inhibición (mm) de 1ra dosis es constante cuando Grupos de 1ra dosis = Control negativo. Se ha omitido.

Resultados de análisis estadísticos del efecto antimicrobiano in vitro del extracto acuoso al 30% de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739

Descriptivos ^a					
	Grupos		Estadístico	Error estándar	
Halo de inhibición (mm)	Dosis al 30%	Media		14,500	0,2345
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	13,849	
			Límite superior	15,151	
		Media recortada al 5%		14,506	
		Mediana		14,500	
		Varianza		0,275	
		Desviación estándar		0,5244	
		Mínimo		13,8	
		Máximo		15,1	
		Rango		1,3	
		Rango intercuartil		1,0	
		Asimetría		-0,260	0,913
		Curtosis		-1,332	2,000
	Control positivo (Ciprofloxacino 150 mg/ml)	Media		29,840	0,4106
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	28,700	
			Límite superior	30,980	
		Media recortada al 5%		29,822	
		Mediana		29,700	
		Varianza		0,843	
		Desviación estándar		0,9182	
		Mínimo		28,8	
		Máximo		31,2	
		Rango		2,4	
Rango intercuartil		1,7			
Asimetría		0,687	0,913		
Curtosis		0,255	2,000		

a. Halo de inhibición (mm) de 2da dosis es constante cuando Grupos de 2da dosis = Control negativo. Se ha omitido.

Resultados de análisis estadísticos del efecto antimicrobiano in vitro del extracto acuoso al 40% de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739

Descriptivos ^a					
	Grupos		Estadístico	Error estándar	
Halo de inhibición (mm)	Dosis al 40%	Media		20,560	0,2977
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	19,734	
			Límite superior	21,386	
		Media recortada al 5%		20,544	
		Mediana		20,400	
		Varianza		0,443	
		Desviación estándar		0,6656	
		Mínimo		19,8	
		Máximo		21,6	
		Rango		1,8	
		Rango intercuartil		1,1	
		Asimetría		0,943	0,913
		Curtosis		1,612	2,000
		Control positivo (Ciprofloxacino 150 mg/ml)	Media		29,840
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	28,700	
			Límite superior	30,980	
	Media recortada al 5%		29,822		
	Mediana		29,700		
	Varianza		0,843		
	Desviación estándar		0,9182		
	Mínimo		28,8		
	Máximo		31,2		
	Rango		2,4		
Rango intercuartil			1,7		
Asimetría			0,687	0,913	
Curtosis		0,255	2,000		

a. Halo de inhibición (mm) de 3ra dosis es constante cuando Grupos de 3ra dosis = Control negativo. Se ha omitido.

Anexo 4. Certificado taxonómico de la planta



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 396-USM-2018

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

La muestra vegetal (semillas) **recibida de Cristina Flormira Trujillo Pablo y Edith Carmen Castillejo Mejía**; estudiante de la Universidad Inca Garcilaso de Vega, ha sido estudiada y clasificada como: ***Lupinus mutabilis Sweet*** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: FBALES

FAMILIA: FABACEAE

GENERO: *Lupinus*

ESPECIE: *Lupinus mutabilis Sweet*

Nombre vulgar: "Chocho"

Determinado por Mg. Asunción A. Cano Echevarría

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

Lima, 06 de noviembre de 2018




Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ódb


Anexo 5. Certificado de la cepa Escherichia coli ATCC 8739



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-639 Reference Number: ATCC® 8739™ [†] Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value (MAV): 45 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Megan C McClure Release Date: 2017/3/30
--	--

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, gray, mucoid, convex. Microscopic Features: Gram negative straight rod.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	---

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vittek®: Although the Vittek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(†) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologies, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

Anexo 6: Certificado de laboratorio



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Servicio de Control de Calidad

Lima, 15 de noviembre del 2018

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

S.D.

Mediante la presente se pone en conocimiento lo siguiente:

La Bachiller **Trujillo Pablo, Cristina Flormira y Castillo Mejía, Edith Carmen**, egresados de la facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la prestigiosa Universidad Inca Garcilaso de la Vega; están haciendo su tesis de Investigación en "Efecto Antimicrobiano del extracto acuoso del fruto de *Lupinus mutabilis* (Chocho) frente a cepa de *Escherichia coli* in vitro" en los laboratorios de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,

Q.F. ERIK OLIVAR GALLEGOS
Coordinador de Aseguramiento de la Calidad

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN
INVESTIGACIÓN

Anexo 7. Testimonio fotográfico

1.- Semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho)



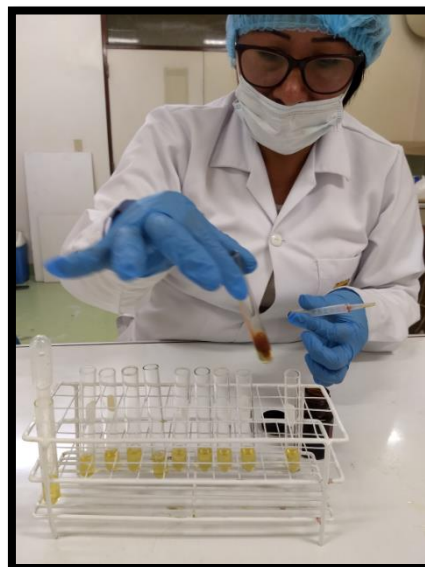
2.- Extracción Acuosa de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho)



3.- Filtrado del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho)



4.- Screening Fitoquímico del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho).



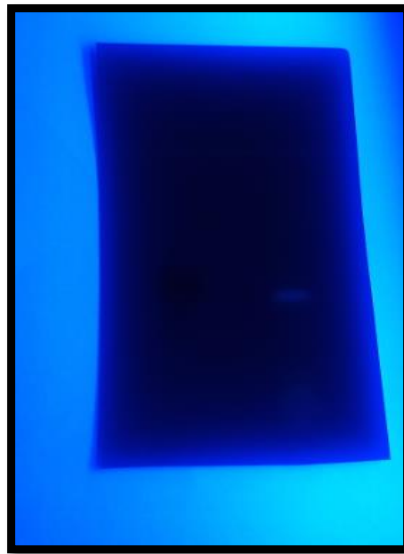
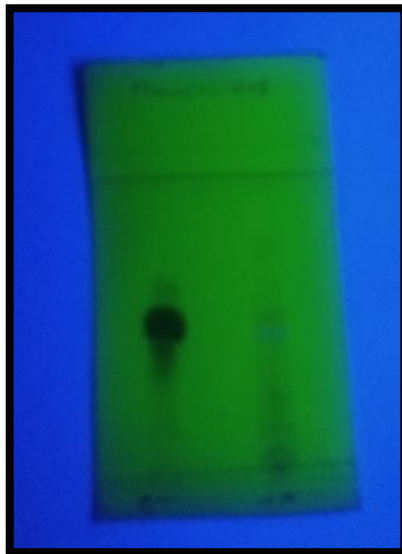
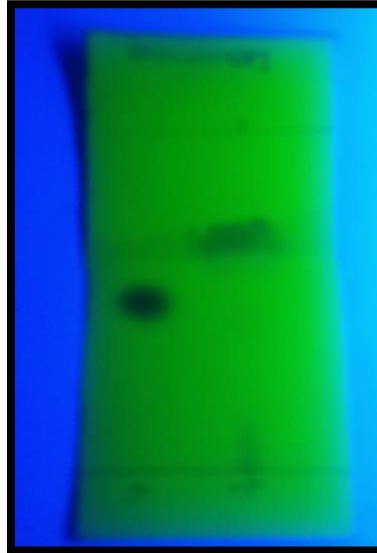
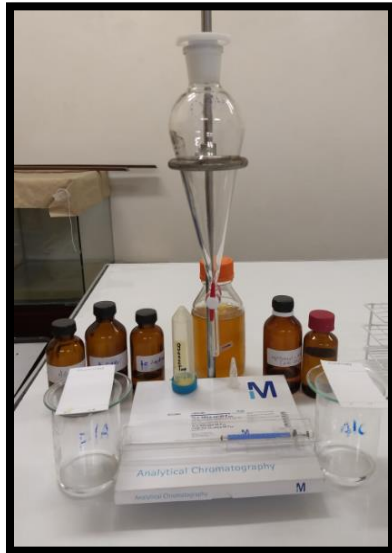
5.- Marcha Fitoquímica



6.- Cromatografía en capa fina de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) – (Flavonoides y Alcaloides)



7.- Cromatografía en capa fina de extracto de semillas de *Lupinus mutabilis*
Sweet (Chocho)



8.- Preparación y estandarización de los inóculos de cepa *Escherichia coli*



Nefelómetro de Mac Farland
(1.5×10^8 UFC/mL)



Cepa suspendida en caldo
Tioglicolato, a partir de este se
realizó una dilución con solución
salina fisiológica estéril y/o caldo
Tioglicolato

9.- Preparación del medio de cultivo



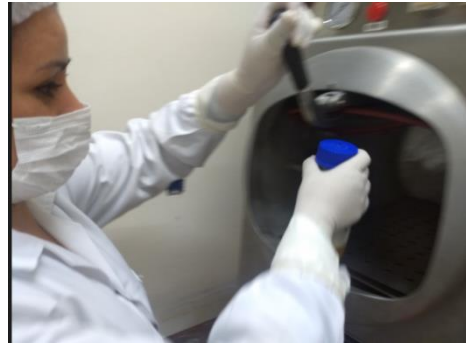
Medio de Cultivo Agar Soya Tripticasa
TSA



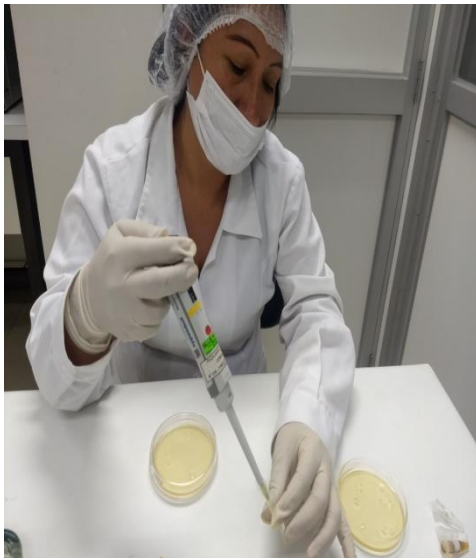
Pesar y colocar el medio de cultivo TSA
en un frasco 250 mL



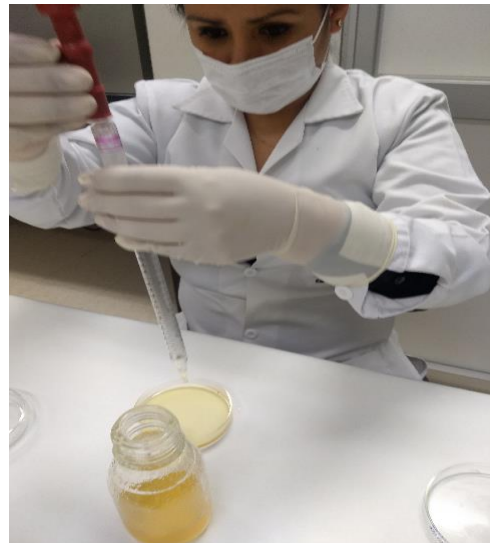
4,0 g de medio Agar Soya Trypticasa TSA por cada 100 mL de agua destilada, homogenizar.



Autoclavar del medio de cultivo a 121°C y 15 lb de presión por un periodo de 15 minutos.



Empleando la micropipeta un volumen de 100 μ L del inculo estandarizado de *Escherichia coli* por cada 100 mL de agar preparado, homogenizando con movimientos circulares.



Empleando una pipeta de 25 MI depositamos el Agar Soya Trypticasa TSA que contiene el inculo estandarizado de *Escherichia coli* en placas individuales.

Dejar solidificar por un lapso mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente.

10.- Determinación de la actividad Antibacteriana



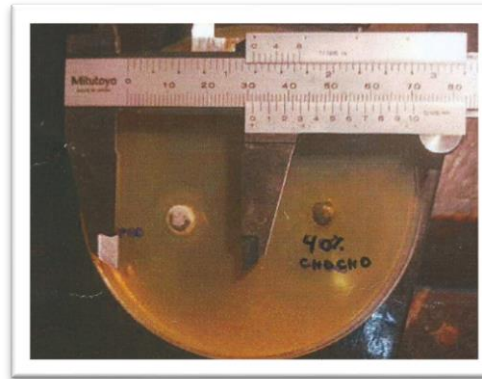
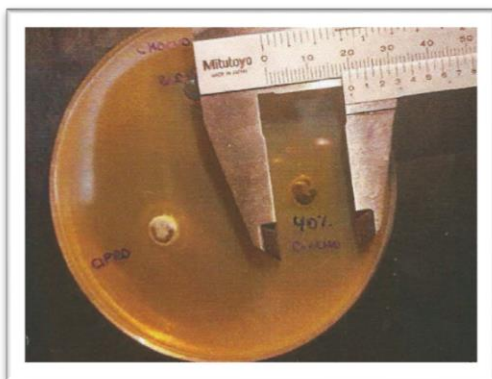
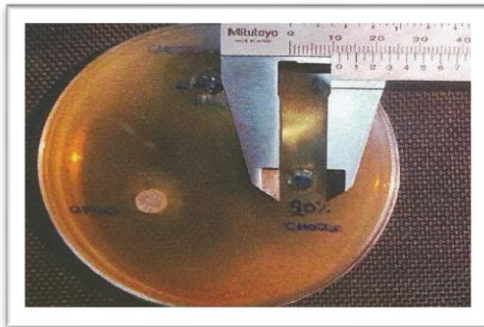
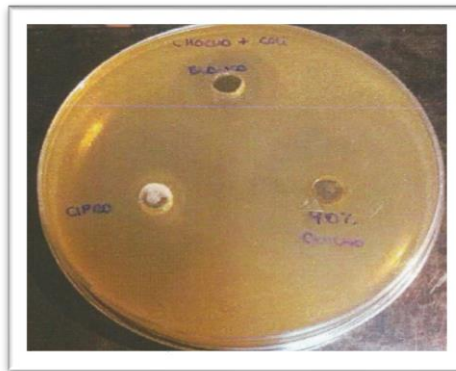
Se hicieron excavaciones en número de tres por cada placa de 8mm de diámetro y 8 mm de profundidad empleando un sacabocado estéril.



Inoculación del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet “Chocho” (concentraciones de 20%, 30% y 40%) en placas que contienen la cepa estandarizada de *Escherichia coli*, Dimetil Sulfoxido DMSO y Ciprofloxacino. Rotular cada una de las placas y proceder a incubar las placas a 37°C por un periodo de 24 horas.

11.- Lectura de Resultados

Lectura de resultados en las Placas que contienen extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* "Chocho" (concentraciones de 20%, 30% y 40%), cepa estandarizada de *Escherichia coli*, Dimetil Sulfóxido DMSO y Ciprofloxacino.



Una vez transcurrido el tiempo de incubación, retirar las placas de la incubadora y proceder a medir los diámetros de los halos de inhibición empleando el vernier.