



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE MEDICINA

Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos y etanólicos
obtenidos de granos andinos

Trabajo de titulación para optar el título de
MÉDICO GENERAL

Autores:

Bautista Suárez, Katherine Lizeth

Villavicencio Guerrero, Damaris Pamela

Tutor:

Dr. Pablo Djabayan Djibeyan

Riobamba, Ecuador. 2023

DERECHOS DE AUTORÍA

Nosotras, Bautista Suárez Katherine Lizeth con CI: 0550157127 , Villavicencio Guerrero Damaris Pamela con CI:1726095456, autoras del proyecto: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y ETANÓLICOS DE GRANOS ANDINOS , declaramos que el contenido basado en las ideas, expresiones, pensamientos y concepciones tomados de varios autores se han previamente interpretado y analizado para enriquecer el estado del arte, resultados, conclusiones y recomendaciones que son absolutamente de nuestra autoría.

De la misma manera concedemos los derechos de autor a la Universidad Nacional de Chimborazo, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual.

Atentamente:

Bautista Suárez Katherine Lizeth

CI: 0550157127

Villavicencio Guerrero Damaris Pamela

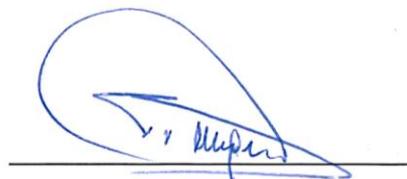
CI: 1726095456

DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Tutor y Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación: **Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de granos andinos**, presentado por Katherine Lizeth Bautista Suárez, con cédula de identidad número 0550157127 y Damaris Pamela Villavicencio Guerrero, con cédula de ciudadanía 1726095456, certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha asesorado durante el desarrollo, revisado y evaluado el trabajo de investigación escrito y escuchada la sustentación por parte de sus autoras; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba a la fecha de su presentación.

Dr. Enrique Ortega
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



Dra. Lucila De La Calle
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Dra. María Angelica Barba
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Dr. Pablo Djabayan Djibeyan
TUTOR



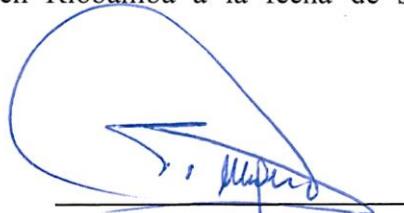
CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación: **Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de granos andinos**, presentado por Katherine Lizeth Bautista Suárez, con cédula de identidad número 0550157127 y Damaris Pamela Villavicencio Guerrero, con cédula de ciudadanía 1726095456, bajo la tutoría del Dr. Pablo Djabayan Djibeyan ; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba a la fecha de su presentación.

Dr. Enrique Ortega

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Enrique Ortega', written over a horizontal line.

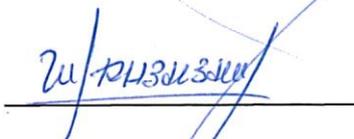
Dra. Lucila De La Calle

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lucila De La Calle', written over a horizontal line.

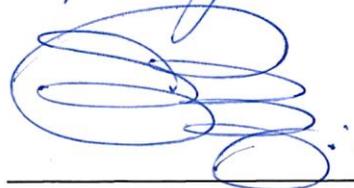
Dra. María Angelica Barba

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Angelica Barba', written over a horizontal line.

Dr. Pablo Djabayan Djibeyan

TUTOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pablo Djabayan Djibeyan', written over a horizontal line.

CERTIFICADO ANTIPLAGIO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO CID
Ext. 1133

Riobamba 09 de noviembre del 2023
Oficio N°171-2023-2S-URKUND-CID-2023

Dr. Patricio Vásconez
DIRECTOR CARRERA DE MEDICINA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA
SALUD UNACH

Presente.-

Estimado

Profesor:

Luego de expresarle un cordial saludo, en atención al pedido realizado por el **Dr. Pablo Djabayan**, docente tutor de la carrera que dignamente usted dirige, para que en correspondencia con lo indicado por el señor Decano mediante Oficio N°0995-D-FCS-ACADÉMICO-UNACH-2023, realice validación del porcentaje de similitud de coincidencias presentes en el trabajo de investigación con fines de titulación que se detalla a continuación; tengo a bien remitir el resultado obtenido a través del empleo del programa URKUND, lo cual comunico para la continuidad al trámite correspondiente.

No	Documento número	Título del trabajo	Nombres y apellidos de los estudiantes	% URKUND verificado	Validación	
					Si	No
1	0995-D-FCS-03-10-2023	Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de granos andinos	BAUTISTA SUÁREZ KATHERINE LIZETH VILLAVICENCIO GUERRERO DAMARIS PAMELA	12	x	

Atentamente,



PhD. Francisco Javier Ustáriz
Fajardo Delegado Programa
URKUND
FCS / UNACH
C/c Dr. Vinicio Moreno – Decano FCS

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar todo mi esfuerzo y dedicación a mis padres que fueron el apoyo más grande durante todo mi proceso académico sin mencionar además que son quienes me inculcaron de los valores y principios que hoy me identifican; también a mi hermano que siempre creyó mi hasta el final brindándome palabras de aliento que me ayudaron a no desmayar; a mi sobrinita hermosa quien me inspiró cada día con sus gestos de ternura e inocencia. En segundo lugar y no menos importante a todos mis tíos en especial a mi tía Anita quien estuvo siempre a mi lado en esta gran aventura. A mis primos, quienes estuvieron presentes desde el comienzo hasta el final en este largo recorrido y quienes son una parte vital en mi vida.

Quiero finalizar agradeciendo a mi novio Joel quien en todo este tiempo ha sido mi cómplice y compañero en este largo camino, por creer en mi cuando incluso yo dudaba y siempre estar para mí.

Katherine Lizeth Bautista Suárez

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi tesis con todo mi amor y cariño a las siguientes personas

A Dios y a mi abuelito Rafael Guerrero por enviarme ángeles para guiar mi camino y seguir con mis ideales, sé que desde el cielo festeja este triunfo y está muy orgulloso de mi porque he cumplido mi promesa de cuando yo era pequeña.

A mi abuelita Clotilde, mi madre Lorena y mis hermanos David y Darla por ser mi fuente de inspiración y quienes con sus palabras de aliento me impulsaban para que no decaiga y continúe con mi sueño de ser médico.

A mi padre Gonzalo por sus consejos y apoyo en todo lo que necesitaba para culminar mi carrera ya que si en el esto no sería posible y sobre todo por ser un ejemplo a seguir.

A mi novio Josueth por ser mi compañero incondicional en cada momento difícil de mi carrera y por brindarme su amor, ayuda y comprensión a pesar de la distancia.

Damaris Villavicencio

AGRADECIMIENTO

En primer lugar queremos agradecer a Dios por la fuerza y determinación que siempre nos ha brindado para no rendirnos a pesar de los múltiples obstáculos que se han presentado en nuestro camino y permitimos culminar esta hermosa pero a la vez demandante carrera; muchas gracias a todos los miembros de nuestra familia, por ser un pilar fundamental en cada una de nuestras decisiones, que a pesar de los infortunios e imprevistos presentes nunca nos dejaron solas y siempre tuvieron unas palabras de aliento y cariño que nos permitieron seguir adelante.

Queremos agradecer además a nuestra querida y célebre Universidad Nacional de Chimborazo y a todos los docentes que la componen, por haber impartido sus conocimientos a lo largo de nuestra formación académica, de igual manera agradecemos de manera muy especial al Dr. Pablo Djabayan tutor de nuestro proyecto de investigación quien con mucha sabiduría y paciencia nos guio en todo nuestro proceso investigativo para culminar el proyecto de la mejor manera.

No podíamos olvidarnos de nuestros queridos compañeros de la Universidad y amigos, quienes fueron un apoyo invaluable a lo largo de nuestra carrera. Junto a ustedes, compartimos risas, lágrimas y muchos momentos que nos ayudaron a mejorar como profesionales, así como sueños que nos motivaron a seguir avanzando sin rendirnos.

Katherine Lizeth Bautista Suárez

Damaris Pamela Villavicencio Guerrero

ÍNDICE GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	
DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DEL TRIBUNAL	
CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	
CERTIFICADO ANTIPLAGIO	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
CAPITULO I.....	13
INTRODUCCIÓN.....	13
Planteamiento del problema.....	13
Justificación.....	14
Objetivos.....	14
General.....	14
Específicos.....	14
CAPITULO II.....	15
MARCO TEÓRICO.....	15
Fitoquímica.....	15
Etimología.....	15
Objetivos generales de la fitoquímica.....	15
Proteínas de reserva y su función.....	15
Péptidos bioactivos en proteínas de reserva.....	16
Amaranto.....	16
Composición química.....	17
Lunasin.....	18
Función biológica en las células de mamíferos.....	18
El frijón de cabeza negra.....	18
Fenoles totales y capacidad antioxidante.....	18
Flavonoides.....	19
Lectinas.....	19
Actividad antimicrobiana del amaranto.....	20
Pruebas de coagulación.....	21
Terapia anticoagulante.....	21
Acción anticoagulante del amaranto.....	22
CAPITULO III.....	23
METODOLOGIA.....	23
Tipo de investigación:.....	23
Población:.....	23
Muestra.....	23
Variables de estudio:.....	23
Método de estudio:.....	23

Técnicas y procedimientos.....	23
Procesamiento estadístico	28
Consideraciones éticas	29
CAPITULO IV	30
RESULTADOS.....	30
Discusión	33
CAPITULO V.....	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
Conclusiones	35
Recomendaciones	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS.....	40
Actividad anticoagulante	41
Actividad hemoaglutinante	46
Actividad antibacteriana y antimicótica.....	48
Actividad citotóxica	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía del amaranto	17
Tabla 2: Taxonomía del frejol de cabeza negra	18
Tabla 3: Variables Dependientes.....	23
Tabla 4: Procedimiento para evaluar la actividad anticoagulante de los extractos acuosos sobre las proteínas de la coagulación de la vía extrínseca (TP) y la vía intrínseca (TTPa). 26	
Tabla 5: Porcentaje mortalidad de nauplios de Artemia salina por acción de las diluciones de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).	28
Tabla 6: Clasificación de la toxicidad (CL50) para extractos vegetales expresada en µg/mL.	28
Tabla 7: Actividad Hemoaglutinante	30
Tabla 8: Titulación de los extractos acuosos	30
Tabla 9: Actividad anticoagulante	31
Tabla 10: Actividad antibacteriana de los extractos acuosos obtenidos de los granos andinos estudiados contra especies ATCC bacterianas, medida como halos de inhibición en milímetros (mm).	31
Tabla 11: Actividad antimicótica	32
Tabla 12: Porcentaje mortalidad de nauplios de Artemia salina por acción del extracto acuoso y etanólico obtenido de granos de Amaranto.....	32
Tabla 13: Porcentaje mortalidad de nauplios de Artemia salina por acción del extracto acuoso de los granos del Frejol de cabeza negra	32
Tabla 14: Porcentaje mortalidad de nauplios de Artemia salina por acción del extracto etanólico de los granos del Frejol de cabeza negra	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Amaranthus caudatus L.....	17
Figura 2: Vigna unguiculata (L.) Walp T	18
Figura 3: Curva de calibración de la dosis de letalidad del SDS sobre nauplios de Artemia salina.....	28

RESUMEN

El uso indiscriminado de productos farmacéuticos, entre ellos: antibióticos, antiparasitarios, antimicóticos y anticoagulantes ha generado un problema importante de salud humana asociada a los efectos adversos que pueden llegar a presentar, es por lo que se ha buscado la identificación de componentes con actividad biológica de origen vegetal. Por tal motivo el objetivo del proyecto fue determinar la actividad biológica de los granos andinos, *Amaranthus candatus* L (amaranto.) y *Vigna unguiculata* L. Walp. (frejol de cabeza negra). El estudio fue de tipo exploratorio, cuasi - experimental, transversal, evaluando la actividad hemoaglutinante, anticoagulante, antimicrobiana y citotóxica de los extractos acuosos y etanólicos que se obtuvieron del amaranto y del frejol de cabeza negra. Los extractos acuosos de las semillas fueron capaces de aglutinar eritrocitos humanos de los grupos A, B y O, ambos extractos mostraron una fuerte aglutinación siendo mayor en el extracto de amaranto, en cuanto a la actividad anticoagulante ambos extractos acuosos poseen actividad anticoagulante al inhibir a los factores de la coagulación sanguínea de las vías extrínseca, intrínseca y común. Solo el extracto del amaranto exhibió actividad antibacteriana contra la cepa ATCC de *Klebsiella pneumoniae* comparable con los antibióticos utilizados como control positivo y nula actividad antifúngica en ambos extractos. Se demostró que el extracto etanólico obtenido de los granos del Frejol de cabeza negra posee una moderada actividad citotóxica sobre nauplios la *Artemia salina*.

Palabras clave: amaranto, frejol, actividad biológica, hemoaglutinante, anticoagulante antimicrobiano, citotóxico,

ABSTRACT

The indiscriminate use of pharmaceutical products, including antibiotics, antiparasitic, antifungals and anticoagulants, it has generated a substantial human health problem associated with the adverse effects that they may present, which is why the identification of components with biological activity has been pursued that originate from plants. For this reason, the objective of the project was to determine the biological activity of Andean grains, *Amaranthus candatus* L (amaranth.) and *Vigna unguiculata* L. Walp. (black-headed bean). The study was exploratory, quasi-experimental, cross-sectional, evaluating the hemagglutinating, anticoagulant, antimicrobial and cytotoxic activity of the aqueous and ethanolic extracts obtained from amaranth and black-headed beans. The aqueous extracts of the seeds were able to agglutinate human erythrocytes of groups A, B and O, both extracts showed a strong agglutination, being greater in the amaranth extract, in terms of anticoagulant activity, both aqueous extracts have anticoagulant activity by inhibiting blood coagulation factors of the extrinsic, intrinsic and common pathways. Only the amaranth extract exhibited antibacterial activity against the ATCC strain of *Klebsiella pneumoniae* comparable to the antibiotics used as a positive control and no antifungal activity in both extracts. It was demonstrated that the ethanolic extract obtained from the grains of the Black-headed Bean has a moderate cytotoxic activity on *Artemia salina* nauplii.

Keywords: amaranth, bean, biological activity, hemagglutinant ,anticoagulant, antimicrobial, cytotoxic,



firmado electrónicamente por:

Revised by
Mario N. Salazar
CCL English Teacher

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de productos farmacéuticos, entre ellos: antibióticos, antiparasitarios, antimicóticos y anticoagulantes ha desencadenado un problema importante de salud global por los efectos adversos que causan, es por esto que se ha buscado la formulación de nutraceúticos con actividad biológica como producto natural de origen vegetal. Uno de los problemas principales que se han dado en los últimos tiempos y que tiene un riesgo potencial importante es la resistencia de las bacterias a los antibióticos (1) ya que en la actualidad las bacterias han logrado desarrollar resistencia a los fármacos tradicionales, además la producción y desarrollo de nuevas moléculas ha sido muy lenta llegando a presentarse casos donde al momento no existe tratamiento eficaz por la multiresistencia bacteriana (2). En respuesta a este problema y la necesidad de conseguir alternativas eficaces en muchos casos se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacología (3) ya que la gran cantidad de metabolitos secundarios que pueden presentarse en las plantas puede ofrecer una gigantesca posibilidad de hallar moléculas con un potencial de actividad biológica importante que puede alcanzarse mediante la síntesis química de los principios activos aislados de las plantas, ya que muchos de los metabolitos secundarios de estas tienen la capacidad de ser antibacterianos (4).

Además dentro de otros posibles efectos beneficiosos para la salud que se han encontrado en los compuestos secundarios de las plantas tenemos algunos con la capacidad de tratar el cáncer, obesidad, hipertensión y diabetes, ya que muchos grupos de péptidos con actividad biológica han presentado efectos contra estas patologías, además de que se han encontrado efectos antimicrobianos, antifúngicos, antihipertensivos, reguladores de colesterol, antitrombóticos, reguladores de absorción de minerales, inmunomoduladores, opioides y reguladores de funciones gastrointestinales (5).

Desde inicios de la historia, la Medicina Natural ha sido considerada como una forma de tratamiento de las personas y no específicamente de la enfermedad, es tanto así que, en diversos foros internacionales, como la Declaración de Chiang Mai, la OMS, el Convenio Mundial sobre la Diversidad Biológica y el Plan de Acción de la FAO, se ha remarcado la necesidad de preservar los recursos biológicos y los conocimientos asociados a la misma. Es por esto que se han destinado diversos estudios para plantear el uso de derivados de las plantas como fuente de compuestos útiles para la salud, como agentes antibióticos o como agente para control de diversas patologías asociadas a las características propias de cada planta, a su composición biológica y fitoquímica (6,7).

Planteamiento del problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos, que incluye antibióticos, antimicóticos, antiparasitarios y antivirales, es un fenómeno que se desarrolla de manera natural con el tiempo, en gran parte debido a cambios genéticos (8). Los microorganismos que se vuelven resistentes a estos tratamientos se encuentran en seres humanos, animales, alimentos, plantas y en el entorno, como el agua, el suelo y el aire.

Este problema tiene graves implicaciones a nivel global en la actualidad y puede amenazar el funcionamiento del sistema de salud tal como lo conocemos. Su aumento se debe en gran medida al uso incorrecto de los antimicrobianos, la automedicación y la falta de seguimiento de los planes de tratamiento. Se ha observado que los antibióticos, que solían ser efectivos para tratar ciertas infecciones, ya no funcionan de la misma manera. Se requiere un aumento en las dosis de antibióticos para lograr el mismo efecto que se obtenía con dosis más bajas en el pasado. Esto se ha vuelto especialmente evidente durante la pandemia, con un aumento del 94% al 100% en la utilización de antibióticos en entornos hospitalarios, a menudo optando por antibióticos de amplio espectro (9).

Justificación

La resistencia antimicrobiana es una problemática que se está observando en todo el mundo moderno, y muchos países están expresando una creciente preocupación al respecto. Algunos de ellos han elaborado planes nacionales de acción para abordar este problema, ya que tiene un impacto económico, afecta los medios de subsistencia y pone en riesgo la eficacia de los programas de atención médica.

En el caso de Ecuador, hasta el año 2019, no se disponía de datos sobre el consumo de antibióticos en el ámbito de la salud humana y animal en enfermedades infecciosas. Sin embargo, se observaba un aumento significativo en la resistencia a los medicamentos en entornos hospitalarios. Por este motivo, se implementó un plan nacional de prevención y control de la resistencia antimicrobiana con un enfoque principalmente preventivo (10). A pesar de esto, a nivel internacional se están realizando esfuerzos para desarrollar nuevos tratamientos, incluyendo alternativas farmacológicas. Es así como dentro de la acción antibiótica se han estudiado múltiples plantas evidenciando que se han logrado concentraciones mínimas inhibitorias cercanas a rangos de 1,5 a 2,5 cm con la utilización de extractos de *L. divaricata*, *L. cuneifolia* y *S. aphylla* por lo que por las características del amaranto y del frijol de cabeza negra se puede asumir que su capacidad para el desarrollo de compuestos químicos útiles para la salud es innegable (11).

Objetivos

General

- Determinar la actividad biológica de extractos obtenidos a partir de los granos andinos *Amaranthus candatus* L (amaranto.) y *Vigna unguiculata* L. Walp. (frejol de cabeza negra) para el desarrollo de compuestos químicos útiles para la salud.

Específicos

- Obtener los metabolitos secundarios mediante extractos acuosos y etanólicos de los granos seleccionados.
- Determinar la actividad hemoaglutinante, anticoagulante, antimicrobiana y citotóxica de las semillas de amaranto y frejol de cabeza negra.
- Interpretar y discutir los resultados obtenidos.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Fitoquímica

Se encarga de estudiar los compuestos químicos que tienen las plantas, especialmente los de origen secundario o productos naturales que son aquellos inherentes a un género o familia en específico.

Luckner et al. (2013) observó que en determinadas rutas biosintéticas en donde se veía incluido el metabolismo primario, este llevaba a la formación de los metabolitos secundarios que eran los que finalmente llevaban a la aparición y creación de una gran variedad de compuestos que variaban de acuerdo con la familia a estudiar e incluso a plantas específicas dentro de cada familia. Es así como la fitoquímica tiene como objeto principal de estudio la obtención de los compuestos elaborados por las plantas mediante procesos de extracción, aislamiento y purificación de la estructura química (12).

También estudia la caracterización de la actividad biológica de determinada sustancia estudiada y sus diversos usos tanto en pro del beneficio o del perjuicio en la salud humana

Etimología

El término fitoquímico sirve para hacer referencia al estudio de los compuestos bioactivos de las plantas con la finalidad de que, al estudiarlas químicamente, se logre encontrar nuevas estructuras que podrían ser útiles en la producción de nuevos medicamentos, además de otros usos como para la formulación de aromas, saborizantes, colorantes, espesantes, insecticidas, herbicidas, hormonas, entre otros (13).

Objetivos generales de la fitoquímica.

Los objetivos generales de la fitoquímica son 2:

- a) Reconocer e identificar los metabolitos secundarios de interés farmacológico, su origen, transformación y rol biológico.
- b) Valorar la importancia de los metabolitos secundarios para su uso en la vida del ser humano (13).

Proteínas de reserva y su función.

Durante el desarrollo de la planta, sus semillas sintetizan grandes cantidades de reservas de alimento que quedan atrapadas en los cotiledones o el endospermo. Durante la germinación estas son movilizadas y sus catabolitos se utilizan para mantener el crecimiento de la semilla hasta que pueda establecerse a sí misma como una planta fotosintética autotrófica. Posterior a esto la mayoría de las reservas se depositan en diferentes estructuras llamadas organelos de almacenamiento; proteínas en cuerpos proteínicos, lípidos en cuerpos lipídicos, almidón en gránulos de almidón, estas tienen la capacidad de que en situaciones especiales se sustituyan en metabolitos secundarios que tienen una capacidad externa que puede ser útil para el ser humano (14).

Péptidos bioactivos en proteínas de reserva.

Un parte importante de los alimentos funcionales son los péptidos bioactivos los cuales se definen como péptidos que cuentan con alguna actividad biológica y que se encuentran en alimentos ya sea de manera natural o son generados durante el procesamiento de los alimentos.

Estos péptidos bioactivos se componen generalmente de 3 a 20 aminoácidos de longitud y que además contienen secuencias con actividades potenciales tanto para plantas como para animales (15). Se ha observado que las proteínas de origen vegetal como la soya o el trigo aportan varios péptidos bioactivos de gran interés para el desarrollo y salud humana. Algunos de los mecanismos para su obtención son mediante digestión enzimática, hidrólisis química o síntesis in vitro, con el fin de obtener una cantidad suficiente y poder probar su actividad biológica. Dentro de estos se han estudiado algunos grupos que tiene el potencial de tener algún tipo de acción de interés biológica como:

- Antimicrobianos y antifúngicos: Han presentado acción sobre bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, así como también algunas levaduras y hongos.
- Reguladores de la integridad intestinal y antiinflamatorios: en este grupo se han encontrado algunos factores de crecimiento y péptidos que ayudan a mantener la integridad intestinal y prevenir la inflamación de la mucosa.
- Antihipertensivos: Se han encontrado diversos compuestos biológicos con actividad sobre la enzima convertidora de angiotensina y que tienen la capacidad de regular la presión sanguínea.
- Reguladores de colesterol: con efecto para ayudar a controlar o disminuir los niveles de colesterol en sangre.
- Antitrombóticos: péptidos con la capacidad de disminuir el riesgo de trombosis mediante la inhibición de la formación de agregados de plaquetas vía la inhibición de la ADP o bien al inhibir la unión del fibrinógeno humano a un receptor específico.
- Reguladores de absorción de minerales: péptidos con la capacidad de quelar minerales ayudando a mantenerlos solubles y facilitar su absorción.
- Inmunomoduladores: péptidos que pueden estimular o modular la acción del sistema inmunológico.
- Reguladores de funciones gastrointestinales: estos péptidos tienen una acción sobre el intestino mediante la regulación de hormonas (16).

Amaranto

Es un pseudocereal que fue cultivado por antiguas civilizaciones Mesoamericanas que se empleaba como parte importante en la dieta junto con el maíz y el frijol. En 1979 se propuso que debido a su alta calidad nutricional era un grano con gran potencial para su explotación comercial debido a su gran capacidad biológica. Se puede aprovechar de manera eficiente ya que tanto sus granos como sus hojas son comestibles y de alta calidad nutricional, esto ya que las semillas de amaranto tienen un alto contenido proteico con un 13 a 17% y su composición de aminoácidos es cercana al óptimo requerido en la dieta humana. Sus hojas también contienen niveles altos de proteína con un 28 a 49%, grasas insaturadas con un 45% de ácido linoléico, fibra con un 11 a 23% y minerales como hierro, magnesio y calcio (17).

Es por estas características que se ha estudiado de manera importante la bioquímica de proteínas de reserva del grano y su potencial sobre la salud humana y la posible generación de compuestos de interés biológico como es la utilización de amaranto para la preparación de alimentos, el uso en dietas en pacientes con hipercolesterolemia, mal nutrición o alergia al gluten, la sustitución de proteína animal por proteínas de amaranto, el desarrollo de películas comestibles para el empaque de alimentos además de su posible acción sobre la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados o hidrocarburos cíclicos tóxicos y presenta además algunos péptidos que pueden tener capacidad antifúngica, antimicrobiana y antiviral (18).

Tabla 1: Taxonomía del amaranto

Reino:	Plantae	
Subreino:	Tracheobionta	
División:	Magnoliophyta	
Clase:	Magnoliopsida	
Subclase:	Caryophyllidae	
Orden:	Caryophyllales	
Familia:	Amaranthaceae	
Subfamilia:	Amaranthoideae	
Tribu:	Amarantheae	
Género:	<i>Amaranthus</i> L.,	

Figura 1: *Amaranthus caudatus* L.
Tomado: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Amaranthus_tricolor0.jpg

Fuente: Chavez-Jauregui RN, Cardoso-Santiago RA, Pinto e Silva MEM, Areas JAG. 2003

Composición química

La semilla contiene aproximadamente 11.1% de proteína en promedio con un contenido de grasa relativamente alto con un 7.7%, aunque mucho menor que otras leguminosas consumidas como la soya que tiene hasta un 20.1%. Los análisis de composición han demostrado que en general los contenidos de proteína cruda, grasa, fibra y cenizas del amaranto son generalmente más altos que en otros cereales, sin embargo, el contenido de carbohidratos es más bajo (19).

Dentro del contenido de aminoácidos esenciales se encuentran aminoácidos azufrados con un 2.6 a 5.5% y lisina con 3.2 a 6.4%, siendo este último casi el doble de elevado que la cantidad que contiene tanto el maíz o el trigo de 2.2 a 4.5% y algo menos de lo encontrado en leguminosas importantes como chícharo, frijoles y soya un 1.4%. Esta composición es importante ya que el balance de aminoácidos es cercano al óptimo requerido en la dieta en adultos lo que hace de este grano una cosecha promisoría como alimento o fuente de proteínas en la dieta (20).

Lunasin

Se encontró una proteína denominada Gm2S-1 que se codifica para una albúmina 2S en el amaranto, esta se denominó Lunasin y se ha especulado que puede tener alguna actividad fisiológica en el desarrollo de las semillas (21).

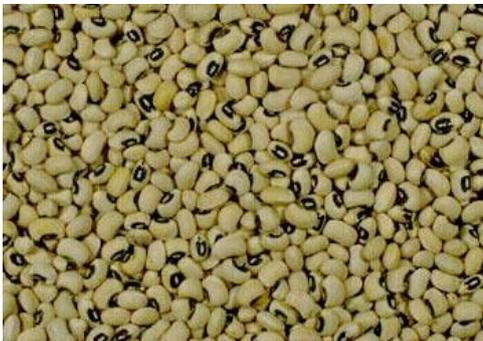
Función biológica en las células de mamíferos.

Lunasin fue reportado por primera vez en soya donde se demostró que cuando es transfectado en células de mamíferos, lunasin arresta la mitosis conduciendo a la muerte celular, caracterizada por una lisis celular y la fragmentación de los cromosomas, por lo que se cree que grandes cantidades del péptido lunasin puede influir en la formación del cinetocoro y los microtúbulos llevando a que estos fallen al unirse a los centrómeros permitiendo el arresto de la mitosis y eventualmente la muerte celular y se ha especulado que tiene capacidad para funcionar como el primer agente antimitótico para el manejo de desarrollo bacteriano además de manejo en casos de hiperdivisión celular (22).

El frijón de cabeza negra

Utilizado ampliamente como fuente de proteína, calorías, fibra, minerales y vitaminas por ser una gran fuente de carbohidratos y proteínas en la dieta humana además de que se ha demostrado que es rico en antioxidantes, fenoles, flavonoides, taninos y antocianina (23).

Tabla 2: Taxonomía del frejol de cabeza negra

Reino:	Plantae	Figura 2: <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp T Tomado: 
División:	Magnoliophyta	
Clase:	Magnoliopsida	
Subclase:	Rosidae	
Orden:	Fabales	
Familia:	Fabaceae	
Subfamilia:	Faboideae	
Tribu:	Phaseoleae	
Subtribu:	Phaseolinae	
Género:	<i>Vigna</i>	
Especie:	<i>unguiculata</i> <i>unguiculata</i> (L.) Walp.,	https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/96/BlackeyeBean.jpg

Fuente: Galvez AF, Chen N, Macasieb J, De Lumen BO. 2001

Fenoles totales y capacidad antioxidante

El contenido de fenoles totales (FT), osciló entre 11.15 y 19.04 mg con una capacidad antioxidante de 2.16 y 4.95 mg representando el 53.84% de las accesiones OXC01, HEC02, HEC03, OXC04, OXC05, CHE06 y PET08 (24).

Fenol y actividad antibiótica

Los polifenoles como los encontrados en el frejol de cabeza negra, muestran actividad antibacteriana contra una amplia variedad de bacterias debido a su capacidad para inhibir factores de virulencia bacteriana como enzimas y toxinas, interactuar con la membrana citoplasmática, suprimir la formación de biopelículas y potenciar el efecto de los antibióticos (24).

Los ensayos de tiempo hasta la muerte o las pruebas de concentración bactericida mínima (MBC) han demostrado que compuestos como el galato de epigallocatequina, la galangina y la 3-O-octanoil-(+)-catequina eliminaron las células bacterianas de MRSA -YK, las cepas *S. aureus*, mientras que la 3-O-octanoil-(-)-epicatequina también generó agregados pseudomulticelulares en cepas tanto resistentes como sensibles a la meticilina (25).

Flavonoides

Las propiedades antibacterianas de los flavonoides han sido reconocidas por más de un siglo, y su efecto tanto bacteriostático como bactericida ha sido extensamente documentado. Se sostiene que la actividad de los flavonoles se vincula con su habilidad para unirse a la bicapa lipídica de la membrana plasmática bacteriana además de ejercer una influencia indirecta al inhibir la biosíntesis de factores de virulencia en *S. aureus*, como la coagulasa o la toxina α , y al reducir la producción de moco y la formación de biopelículas. Además, los flavanoles estimulan la formación de conglomerados y la agregación en la pared celular de los estafilococos. Se ha comprobado que el galato de (-)-epicatequina y el galato de (-)-epigallocatequina pueden sensibilizar las cepas de MRSA a los antibióticos β -lactámico. Asimismo, el galato de epicatequina y el galato de epigallocatequina actúan como inhibidores del gen *norA*, reduciendo las CIM de los betalactámicos al punto de corte del antibiótico y mejorando, por tanto, sus efectos antibacterianos (26).

La capacidad del (-)-galato de epigallocatequina (EGCG) para potenciar la actividad antiestafilocócica de los antibióticos ha sido ampliamente comprobada ya que muestra un efecto sinérgico con varias clases de antibióticos, incluyendo los betalactámicos, frente a las cepas de MRSA (27).

Lectinas

Ha habido un creciente interés en estas moléculas ya que son fácilmente accesibles y económicas, dado que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, presentes en plantas, animales vertebrados e invertebrados, hongos, bacterias y virus.

Se ha investigado y documentado la actividad biológica de las lectinas en plantas, sobre todo las extraídas de diversas semillas de frutas, semillas de leguminosas, tubérculos y algas marinas verdes (28).

La detección de lectinas en extractos acuosos de plantas se realiza mediante su capacidad para aglutinar glóbulos rojos de vertebrados, utilizando soluciones salinas isotónicas. Es fundamental no confundir las lectinas con los polifenoles, que son metabolitos secundarios capaces de pseudoaglutinar (aglomerar superficialmente) eritrocitos. No obstante, se ha informado que los polifenoles aislados de *Gunnera tinctoria* Molina Mirb. (Peciolo de Nalca) presentan actividad antifúngica, lo que los convierte en una valiosa opción fungicida y una fuente prometedora de compuestos bioactivos (29).

En las semillas de *Amarantus caudatus* L. y *A. spinosus* L., las lectinas demuestran una capacidad de aglutinación no dirigida específicamente a los grupos sanguíneos A, B y O en humanos y ovejas. Por otro lado, se ha aislado una lectina de las semillas de arveja (*Pisum*

sativum L.), llamada V-2, con un peso molecular de 14,662 kDa y un punto isoelectrico de 7,5 que ha mostrado actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Esta lectina inhibió el crecimiento de estos microorganismos a una concentración de 1 mg (29).

Las lectinas extraídas de varios tubérculos exhiben potencial bioactivo, incluyendo funciones mitogénicas, antitumorales, antimicrobianas, inmunomoduladoras, antioxidantes, hipoglucemiantes, insecticidas y nematocidas. Además, se ha observado que estas lectinas poseen actividad anticoagulante, manifestando una inhibición parcial o total de las proteínas plasmáticas involucradas en la coagulación, abarcando las vías intrínseca, extrínseca y común de la cascada enzimática. Esto se evidencia en la prolongación de los tiempos de protrombina y tromboplastina parcial activada (30).

Los mecanismos de resistencia bacteriana frente a los antibióticos de uso generalizado han contribuido a que las enfermedades infecciosas se conviertan en un desafío de salud pública global. Se ha reportado la actividad antibacteriana de lectinas las cuales han demostrado inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. coli* ATCC 25922. Esta investigación resalta el potencial de las lectinas como una herramienta prometedora para abordar los desafíos de las enfermedades infecciosas resistentes a los antibióticos (31).

Actividad antimicrobiana del amaranto

Los extractos crudos de *Amaranthus* spp. consisten en una sustancia natural que comprende alcaloides (betacianinas y betaxantina), polifenoles (flavonoides, esteroides, ácido catecúico y taninos), terpenoides (cerasinona y ácido norecasantálico) y saponinas, se ha demostrado que *Amaranthus viridis*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus spinosus* y *Amaranthus caudatus* presentan una actividad antibacteriana de amplio espectro. Una evidencia significativa sugiere que el extracto crudo tricolor de *Amaranthus* (ATCE) exhibe actividad antimicrobiana, siendo compuesto por péptidos de pequeño tamaño con capacidad inhibitoria sobre proteasas como la tripsina. Estos péptidos podrían pertenecer a un nuevo grupo de compuestos que complementan el arsenal clínico. Además, su perfil podría indicar una baja tendencia al desarrollo de resistencia microbiana, lo que representa una ventaja en comparación con los antibióticos convencionales (32).

Se logró aislar un péptido antimicrobiano, denominado Ar-AMP, de 30 residuos a partir de las semillas de amaranto *Amaranthus retroflexus* L. Este proceso se llevó a cabo principalmente mediante una etapa de HPLC de fase inversa, en un procedimiento de un solo paso. Posteriormente, se examinaron sus actividades biológicas in vitro. La secuencia completa de aminoácidos de Ar-AMP se determinó utilizando degradación de Edman en conjunto con técnicas de espectrometría de masas. Además, se obtuvo y secuenció el cDNA que codifica para Ar-AMP. El cDNA contiene información para una proteína precursora que consta de una presunta secuencia señal N-terminal de 25 aminoácidos, un péptido maduro de 30 aminoácidos y una región C-terminal de 34 residuos que se elimina durante el procesamiento postraduccional. Basándose en similitudes de secuencia, se clasifica a Ar-AMP dentro de la familia de péptidos antimicrobianos similares a la heveína, con seis

residuos de cisteína. Aunque las semillas se recolectaron en 1967 y perdieron su viabilidad de germinación, Ar-AMP mantuvo sus funciones biológicas. Efectivamente inhibió el crecimiento de diversos hongos evaluados, como *Fusarium culmorum* (Smith) Sacc., *Helminthosporium sativum* Pammel., King et Bakke, *Alternaria consortiale* Fr. y *Botrytis cinerea* Pers. Además, provocó alteraciones morfológicas en *Rhizoctonia solani* Kühn a concentraciones micromolares y brindó protección a plántulas de cebada contra la infección por *H. sativum* (33).

Pruebas de coagulación

La evaluación del tiempo de trombina (TT) implica el análisis de la fase de formación de fibrina, midiendo el tiempo de coagulación de un plasma citratado en presencia de trombina. El tiempo de protrombina (TP) detecta alteraciones en los factores de la vía extrínseca, al registrar el tiempo de coagulación de un plasma citratado en presencia de tromboplastina y Ca^{+2} . Por otro lado, el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) identifica cambios en los componentes intrínsecos de la vía, involucrando la medición del tiempo de coagulación de un plasma citratado en presencia de componentes de fosfolípidos de tromboplastina (tromboplastina parcial), un activador y Ca^{+2} (34).

El proceso de coagulación de la sangre es una secuencia compleja que implica la convergencia de diversos factores y fenómenos. Este proceso está compuesto por tres fases superpuestas que contribuyen a la integridad del sistema circulatorio: la fase vascular, la fase plaquetaria y la fase de coagulación. La fase plaquetaria, también conocida como hemostasia primaria, implica la adhesión, activación y agregación de las plaquetas. En la fase de coagulación, denominada hemostasia secundaria, intervienen los factores de coagulación, muchos de los cuales son enzimas sintetizadas en el hígado en forma de zimógenos que, en una secuencia ordenada, llevan a la formación de coágulos. Esta cascada de coagulación se compone de dos vías activadoras, la extrínseca y la intrínseca, que convergen en una vía común (35).

Actividad antitrombótica de proteínas de semillas de *Amaranthus mantegazzianus* y otros péptidos de proteínas alimentarias, como carne de cerdo, colza y clara de huevo, ha sido documentada. Investigaciones previas confirmaron la existencia de posibles péptidos antitrombóticos presentes en las proteínas de amaranto, ya sea intrínsecamente o liberados tras la hidrólisis con alcalasa y tripsina. Entre las fracciones proteicas, la glutelina mostró la actividad antitrombótica más pronunciada ($\text{IC}_{50} = 80 \pm 3 \mu\text{g/mL}$), mientras que el aislado de amaranto presentó una actividad menor, observándose un aumento después de la proteólisis (36).

Terapia anticoagulante

Las aplicaciones son tan amplias que incluso abarcan funciones anticoagulantes. Un ejemplo de esto es la lectina cMoL, extraída de *Moringa oleifera*, cuyos efectos sobre la coagulación sanguínea se evaluaron mediante el uso de pruebas como el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y el tiempo de protrombina (TP). Los ensayos utilizaron plasma de donantes voluntarios sanos con valores normales de tiempos de coagulación como control positivo. La determinación del TTPa es especialmente útil para monitorizar el efecto de la heparina y

detectar deficiencias en los factores VIII, IX, XI y XII, mientras que el TP refleja la actividad de factores como el factor II (protrombina), V, VII y X, cuya deficiencia se asocia con una prolongación en el tiempo necesario para la formación del coágulo (37).

En las concentraciones ensayadas (3.0, 15, 30, 37.5, 45 y 60 µg/mL), la lectina cMoL prolongó de manera significativa tanto el TTPa (a más de 300 s) como el TP, siendo el TTPa el parámetro más afectado. Esta prolongación del TTPa sugiere una inhibición de la vía intrínseca y/o de la coagulación sanguínea común, mientras que la prolongación del TP indica una inhibición de la vía extrínseca. Cabe destacar que las vías intrínseca y extrínseca convergen en la formación del factor Xa. Otras lectinas también prolongaron significativamente ambos tiempos de coagulación. Por ejemplo, la lectina de semilla de *Cratylia mollis*, una lectina de unión a manosa/glucosa, indujo un aumento de casi el doble en los tiempos de coagulación. En contraste, la lectina de *Bauhinia forficata* (BfL) solo aumentó el tiempo de coagulación del TTPa, y este efecto no estuvo relacionado con la inhibición del factor Xa humano. En resumen, la lectina cMoL exhibió actividad anticoagulante, como se refleja al calcular la relación (R) entre el tiempo de coagulación de la muestra y el tiempo de coagulación del control, que fue superior a 1.0, llegando a una R de 10 para el TTPa y a una R de 1.5 para el TP (37).

Acción anticoagulante del amaranto

La acción anticoagulante de los extractos de granos andinos seleccionados se manifestó a través de cambios en los tiempos de coagulación del plasma humano. En el caso del extracto de *Amaranthus caudatus*, no se observaron modificaciones en el TP, pero sí se detectó un acortamiento del TTPa, indicando actividad procoagulante. Estos resultados contrastan en parte con los hallazgos presentes en el estudio de Ana Sabbione sobre la actividad antitrombótica de proteínas de amaranto, incluyendo la Aglutinina (*Amaranthus caudatus*). En ese estudio, se demostraron cambios hemostáticos compatibles con la anticoagulación, como la prolongación del tiempo de coagulación y tiempo de sangría, tanto in vitro como in vivo en pruebas de laboratorio en animales (38).

Actividad Citotóxica

Para la detección de la toxicidad de los extractos obtenidos a partir de especies vegetales se ha utilizado un género de crustáceo branquiópodos, identificado como *Artemia salina*, que se adapta a las condiciones de laboratorio con un ciclo de vida corto, tamaño pequeño, que se reproduce fácilmente eclosionando los quistes hasta la forma nauplios en estadio II y III en medios hipersalinos, que ha sido utilizado también para la alimentación de peces, crustáceos y en la evaluación de toxicidad en medios marinos (35).

Como ejemplo podemos citar la detección de esta actividad tóxica fue demostrada en extractos etanólicos obtenidos de las semillas del árbol Neem (*Azadirachta indica*) con una dosis tóxica de 476 µg/mL sobre los nauplios de *A. salina* (39).

CAPITULO III

METODOLOGIA

Tipo de investigación:

Se realizó un estudio de nivel exploratorio descriptivo con un diseño cuasi-experimental, transversal prospectivo.

Población:

Está constituida por los granos andinos que se expenden en los mercados populares del Cantón Riobamba.

Muestra

De la población de granos andinos que se expenden en los mercados de Riobamba se seleccionó: el amaranto (*Amaranthus candatus* L.) y del frejol de cabeza negra (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Por tener referencias de ser utilizados por la medicina tradicional andina.

VARIABLES DE ESTUDIO:

El sistema de variables aplicado en este estudio fue el siguiente, Dependientes: actividad hemoaglutinante, anticoagulante, antibacteriana y citotóxica; Independiente: las especies de granos andinos seleccionados; Intervinientes: lugar de producción de los granos andinos, la altitud, condiciones de cultivo o la época del año (Tabla 3).

Tabla 3: Variables Dependientes

Variables	Tipo	Escala	Definición operacional	Indicadores
Actividad Hemoaglutinante	Cualitativa nominal	Controlada	Formación de un complejo que aglutina células	Aglutina No aglutina
Actividad Anticoagulante	Cuantitativa continua	Controlada	Inhibición de las proteínas de la coagulación	Medir TP Medir TTP
Actividad Antimicrobiana	Cuantitativa continua	Controlada	Inhibir el crecimiento bacteriano y micótico	Sensibilidad Resistencia
Actividad Citotóxica	Cualitativa nominal Cuantitativa continua	Controlada	Acción de letalidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	Letal No letal

Fuente: Elaboración propia

Método de estudio:

El estudio se realizó por el método empírico mediante la observación y la experimentación para determinar la actividad biológica de hemoaglutinación, anticoagulación, antimicrobiana y citotóxica de los extractos acuosos en SSF y etanólicos.

Técnicas y procedimientos

Obtención de la muestra de estudio:

Se inició el estudio mediante la adquisición de los granos andinos seleccionados que se identificaron taxonómicamente (19,21) como: *Amaranthus candatus* L (amaranto) y *Vigna unguiculata* L. Walp del (frejol de cabeza negra).

Extracción de metabolitos secundarios:

Extracción acuosa:

Las lectinas se extrajeron triturando 25 g del grano andino en estudio utilizando un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino que se mezclaron con 50 mL de solución salina fisiológica estéril al 0,85% y se incubó a 4°C por 24 h para realizar una infusión en frío. Concluido el período de incubación la mezcla se filtró a través de un tejido de nylon fino para obtener el extracto acuoso que fue centrifugado a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos con el propósito de eliminar partículas finas microscópicas, alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf se conservaron a -20°C. (29)

Extracción etanólica al 96%:

Los metabolitos secundarios hidrofílicos se extrajeron triturando 25 g del grano andino en estudio utilizando un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino que se mezclaron con 100 mL de etanol grado reactivo al 96%, la mezcla fue agitada cada 24 h por espacio de 7 días y filtrada utilizando papel filtro Whatman No. 40. El filtrado de cada extracto se colocó en un matraz de destilación de 250 mL y se rota evaporó a una presión de vacío de 113 mbar con baño de maría a 60°C. Evaporado el solvente el extracto fue recuperado adicionando 5 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 99,99%, en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf se conservaron a 4°C.

Determinación de la actividad hemoaglutinante:

Preparación de la suspensión de eritrocitos al 5%:

Previo a la extracción de las muestras de sangre de los grupos sanguíneos A, B y O a las personas voluntarias seleccionadas, aparentemente sanas y mayores de edad, se obtuvo de cada uno el consentimiento informado, luego se extrajeron 5 mL de sangre de cada voluntario y se diluyeron con 10 mL de suero fisiológico estéril en tubos plásticos cónicos con tapa, los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm, el sobrenadante en cada tubo fue descartado repitiendo el procedimiento en tres ocasiones, con la finalidad de eliminar posibles interferentes presentes en el plasma. La suspensión al 5% aprox. de cada grupo sanguíneo se preparó mezclando 1 mL de glóbulos rojos sedimentados con 19 mL de SSF estéril (29).

Actividad Hemoaglutinante:

La detección de la actividad hemoaglutinante se realizó por triplicado combinando en tubos de ensayo 13x100 limpios y secos 0.1 mL de cada suspensión eritrocitaria de los grupos sanguíneos A,B,O humanos al 5% respectivamente con 0.1 mL de los extractos acuosos de los granos en estudio, dejándolos en reposo a temperatura ambiente durante 15 min, luego de este período, se centrifugaron a 5000 rpm por 1 min, la actividad hemoaglutinante se registró evaluando el grado de aglutinación propuesto por Boorman et al. en 1977 (40), donde 4+ representa una aglutinación muy fuerte, 3+ una aglutinación fuerte, 2+ una aglutinación moderada, 1+ una aglutinación débil, ½+ una aglutinación muy débil y 0+ ninguna aglutinación.

El título de hemoaglutinación se determinó en los extractos que exhibieron actividad mediante una dilución doble seriada de 0,1 mL de los extractos acuosos utilizando 0,1 mL de SSF al 0,85% estéril como diluyente hasta una dilución 1/2048 en tubos de ensayo 13x100 limpios y secos, a cada tubo de ensayo con el extracto acuoso diluido se le agregó 0,1 mL de la suspensión de eritrocitos A, B, O humanos al 5% respectivamente a cada serie de tubos, siguiendo luego el procedimiento descrito para la detección de la actividad hemoaglutinante, el título de hemoaglutinación se determinó como el inverso de la última dilución en la que hubo aglutinación de los eritrocitos, siguiendo el grado de aglutinación propuesto por Boorman et al. (40).

Evaluación de la Actividad Anticoagulante:

Preparación del pool de plasma humano:

Previo a la extracción de las muestras de sangre de las cinco personas donante voluntarias seleccionadas, aparentemente sanas y mayores de edad, se obtuvo de cada uno el consentimiento informado, luego se extrajeron 5 mL de sangre de cada voluntario en tubos venojet® tapa azul con citrato de sodio al 3.8%, los tubos fueron centrifugados a 2500 rpm para obtener plasma citratado pobre en plaquetas, los plasmas obtenidos fueron mezclados y alícuotas de 1 mL se conservaron en tubos eppendorf a -20°C. La actividad anticoagulante se demostró mediante el aumento en el Tiempo de Protrombina y/o del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado.

Estimación del Tiempo de Protrombina (TP) del Pool de Plasma Citratado:

Para verificar las condiciones de ensayo y la calidad del reactivo, este tiempo se pudo establecer aplicando el procedimiento establecido por el fabricante del reactivo tromboplastina D (Pacific Hemostasis®). 1 mL del reactivo vertido en un tubo de ensayo limpio y seco fue incubado a 37°C en baño de maría por 3 minutos, en otro tubo limpio y seco 0,1 mL del pool de plasma citratado se precalentó por 1 minuto, transcurridos los 3 minutos se agregó al plasma citratado incubado 0,2 mL de tromboplastina D precalentada, activándose simultáneamente el cronómetro, la verificación de la formación de las mallas de fibrina se comenzó a partir de los 6 segundos hasta aparecer las primeras mallas de fibrina deteniendo de inmediato el cronómetro y registrando el tiempo, la prueba se realizó por triplicado.

Estimación del TP del Plasma Citratado + el extracto acuoso de los granos andinos seleccionados:

Con el mismo procedimiento explicado en el párrafo anterior se evaluó la actividad anticoagulante de los extractos acuosos, previamente se debió establecer un valor de referencia que permitiera corregir el efecto de dilución del plasma al ser mezclado con los extractos acuosos, por lo tanto, 0,1 mL del pool de plasmas se mezcló con 0,1 mL de suero fisiológico estéril, luego con 0,1 mL de esta mezcla se le estimó el TP, cuyo valor se tomó como referencia. Obtenido el valor de referencia se procedió a determinar el TP del plasma citratado mezclado con los extractos obtenidos del amaranto y del frejol de cabeza negra, la prueba se realizó por triplicado, siguiendo el protocolo establecido en la Tabla 4).

Estimación del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) del Pool de Plasma Citratado:

De igual manera, para verificar las condiciones de ensayo y la calidad del reactivo, este tiempo se pudo establecer aplicando el procedimiento establecido por el fabricante del reactivo ATTP-XL (Fosfolípidos)-ácido elálgico (Pacific Hemostasis®). 0,1 mL del reactivo más 0,1 mL del plasma citratado se mezclaron en un tubo de ensayo limpio y seco, la mezcla fue incubada a 37°C en baño de maría por 3 minutos, en otro tubo limpio y seco 1 mL de Cloruro de Calcio (CaCl₂) en solución (CaCl₂ 0.02 M Pacific Hemostasis ®) se precalentó por 1 minuto, transcurridos los 3 minutos se agregó a la mezcla precalentada 0,1 mL CaCl₂ precalentado, activándose simultáneamente el cronómetro, la verificación de la formación de las mallas de fibrina se comenzó a partir de los 19 segundos hasta aparecer las primeras mallas de fibrina deteniendo de inmediato el cronómetro y registrando el tiempo, la prueba se realizó por triplicado.

Estimación del TTPa del Plasma Citratado + el extracto acuoso de los granos andinos seleccionados:

Con el mismo procedimiento explicado en el párrafo anterior se evaluó la actividad anticoagulante de los extractos acuosos, previamente se debió establecer un valor de referencia que permitiera corregir el efecto de dilución del plasma al ser mezclado con los extractos acuosos, por lo tanto, 0,1 mL del pool de plasmas se mezcló con 0,1 mL de suero fisiológico estéril, luego con 0,1 mL de esta mezcla se le estimó el TTPa, cuyo valor se tomó como referencia. Obtenido el valor de referencia se procedió a determinar el TTPa del plasma citratado mezclado con los extractos obtenidos del amaranto y del frejol de cabeza negra, la prueba se realizó por triplicado, siguiendo el protocolo establecido en la Tabla 4).

Tabla 4: Procedimiento para evaluar la actividad anticoagulante de los extractos acuosos sobre las proteínas de la coagulación de la vía extrínseca (TP) y la vía intrínseca (TTPa).

Tiempo de Protrombina (TP)	Tiempo en segundos (s)
100 µL de Plasma + 200 µL de Tromboplastina D (Pacific Hemostasis ®) (37°C)	Sin dilución para evaluar el reactivo
100 µL de Plasma + 100 µL SSF (37°C) 100 µL de la mezcla anterior + 200 µL de Tromboplastina D (37°C)	Valor de referencia control
100 µL de Plasma + 100 µL del extracto de la especie vegetal (37°C) 100 µL de la mezcla anterior + 200 µL de Tromboplastina D (37°C)	Valor del efecto anticoagulante
Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa)	Tiempo en segundos (s)
100 µL de Plasma + 100 µL de ATTP-XL (Fosfolípidos) + ác. elálgico (Pacific Hemostasis ®) (37°C) + 100 µL de CaCl ₂ (0,02 M) (37°C)	Sin dilución para evaluar el reactivo
100 µL de Plasma + 100 µL SSF (37°C) 100 µL de la mezcla anterior + 100 µL de e ATTP-XL (Fosfolípidos) + ác. elálgico (37°C) + 100 µL de CaCl ₂ (0,02 M) (37°C)	Valor de referencia control
100 µL de Plasma + 100 µL del extracto de la especie vegetal (37°C) 100 µL de la mezcla anterior + 100 µL e ATTP-XL (Fosfolípidos) + ác. elálgico (37°C) + 100 µL de CaCl ₂ (0,02 M) (37°C)	Valor del efecto anticoagulante

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana:

Se evaluó la actividad antimicrobiana utilizando el método de difusión en agar mediante la implementación de la técnica de Kirby-Bauer (41), determinando la capacidad de los

extractos acuosos de los granos andinos para inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas ATCC: *Staphylococcus aureus* 25923, *Proteus mirabilis* 25933, *Klebsiella pneumoniae* 70063, *Salmonella enterica* 35664, *Escherichia coli* 25922 y *Enterococcus faecalis* 29212. De igual manera la inhibición de cepas ATCC del género *Candida*: *C. albicans* 1023, *C. tropicalis* 66029, *C. krusei* 14243, *C. parapsilosis* 22019 y *C. glabrata* 4843. Se prepararon inóculos bacterianos y micóticos a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL ajustando la turbidez al patrón 0,5 de McFarland. Para la prueba de actividad se inocularon placas de Petri con agar Müeller Hinton y agar Sabouraud Dextrosa azul de metileno respectivamente dejando secar a 4°C, equidistantemente se colocaron discos estériles impregnados con los extractos acuosos y etanólicos, discos estériles con antibióticos y antimicóticos: Ciprofloxacina (10 µg) Oxoid™ y Tetraciclina (30 µg) Oxoid™ para las cepas bacterianas y para las levaduras Fluconazol (75 µg) Oxoid™ como control positivo y SSF estéril como control negativo. Las placas inoculadas se incubaron en estufa aeróbica a 37°C por 24 horas, la aparición de halos de inhibición del crecimiento bacteriano o micótico permitió determinar la actividad antimicrobiana (42).

Evaluación de la Actividad Citotóxica:

Obtención de los nauplios de *Artemia salina*:

Para la obtención de los nauplios 100 mg de cistos de *A. salina* (MacKay Marine Artemia Cysts) se añadieron en un vaso de precipitados a un litro de agua de mar artificial en preparada a una concentración de 3% mezclando 30 g de cloruro de sodio (NaCl) a 1000 mL de agua destilada ajustando el pH a 8.0 agregando 2 g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) a la solución. Este bio-generador se colocó en una estufa de cultivo microbiológico con aireación permanente y en oscuridad por 48 h.

Preparación de los extractos acuosos y etanólicos:

Para poder evaluar la actividad citotóxica se realizó la dilución de los extractos acuosos y etanólicos obtenidos de los granos andinos estudiados en agua de mar artificial a concentraciones de 1, 10, 100, 1000 µg/mL. Así mismo, se realizaron las diluciones del Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) a concentraciones similares, partiendo de una solución con una concentración de 1000 µg/mL, las cuales fueron utilizadas como control y como control negativo se utilizó el agua de mar artificial (43).

Determinación de la actividad citotóxica:

Con la finalidad de evaluar la actividad citotóxica de los extractos acuosos y etanólicos obtenidos de los granos andinos amaranto y frejol de cabeza negra se utilizaron nauplios de *Artemia salina* en estadio II y III de evolución, aplicando las técnicas propuestas por Meyer et al. (44) y McLaughlin et al. (45). En una placa plástica de cultivo celular se agregaron las diluciones realizadas tanto de los extractos como de los controles, a los que se incorporaron 10 nauplios de *Artemia salina* que se incubaron a 37°C en una estufa de cultivo, la mortalidad fue evaluada a las 0, 6, 12 y 24 horas. El ensayo fue realizado por triplicado, y considerado como valido si el porcentaje de mortalidad en la solución de control negativo no superó el 10%. Con los valores de mortalidad obtenidos del control positivo utilizando SDS, se construyó una curva de calibración que contrastó el porcentaje de mortalidad versus la

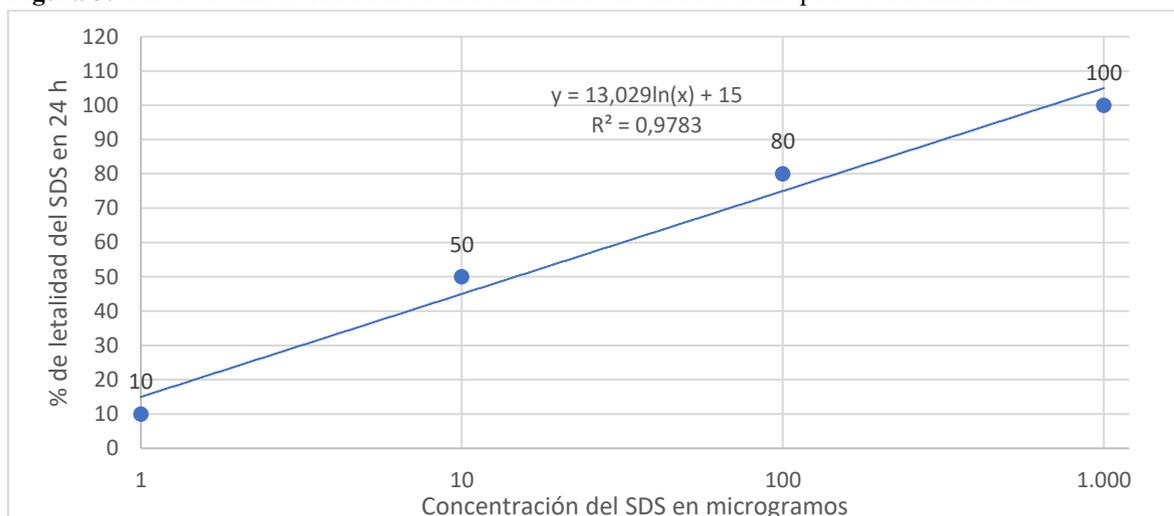
concentración de los extractos en 24 horas para calcular la Concentración Letal 50 (CL50), ver Tabla 5 y Figura 3. El grado de toxicidad se determinó utilizando la categoría propuesta por el CYTED (46) (Tabla 6).

Tabla 5: Porcentaje mortalidad de nauplios de Artemia salina por acción de las diluciones de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

Tiempo (h)	Concentración del SDS en microgramos (µg/mL)				Control Neg (-)
	Control Pos (+)	1	10	100	
0	0	0	0	0	0 %
2	0	0	20 %	100 %	0 %
4	0	20 %	40 %	100 %	0 %
6	0	30 %	60 %	100 %	0 %
24	10 %	50 %	80 %	100 %	0 %

Fuente: Elaboración propia

Figura 3: Curva de calibración de la dosis de letalidad del SDS sobre nauplios de Artemia salina.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6: Clasificación de la toxicidad (CL50) para extractos vegetales expresada en µg/mL.

No.	Grado de toxicidad	Valore de CL50 en µg/mL
I	Extremadamente tóxico	1-10
II	Altamente tóxico	10-100
III	Moderadamente tóxico	100-500
IV	Ligeramente tóxico	500-1000
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

Fuente: CYTED (46)

Procesamiento estadístico

En la presente investigación no se requirió procesamiento estadístico.

Consideraciones éticas

Se brindó información a los miembros del equipo de investigadores donantes voluntarios sobre el proyecto de investigación para obtener el consentimiento informado de los mismos, debido a la necesidad de extracción de muestras sanguíneas, documentos que se adjuntarán en la sección de anexos. El estudio no involucró la experimentación en seres humanos u otros seres vivos.

CAPITULO IV

RESULTADOS

Determinación de la actividad hemoaglutinante:

Actividad Hemoaglutinante:

Los resultados demostraron que los extractos acuosos de los granos andinos estudiados poseen lectinas que fueron capaces de aglutinar eritrocitos humanos de los grupos A, B y O, ambos extractos mostraron una fuerte aglutinación siendo mayor en el extracto de amaranto (Tabla 7).

Tabla 7: Actividad Hemoaglutinante

Nombre científico	Tipo de eritrocitos + extracto acuoso			Control Tipo de eritrocito + SSF		
	A	B	O	A	B	O
Frejol de cabeza negra	3+	3+	3+	0+	0+	0+
Amaranto	4+	4+	4+	0+	0+	0+

Fuente: Elaboración propia. **Leyenda:** (4+) = muy fuerte aglutinación, (3+) = fuerte aglutinación, (2+) = moderada aglutinación, (1+) = débil aglutinación y (½+) = muy débil aglutinación. GR= Glóbulo Rojo

Los resultados de la titulación demostraron que la dilución doble seriada de los extractos acuosos de los granos andinos permitió establecer la concentración de las fitohemoaglutininas (lectinas) la cual resultó ser variable, siendo esta el inverso de la dilución que presentó aglutinación, el extracto acuoso obtenido de las semillas del Amaranto posee una concentración elevada de lectinas, la cual fue de: 1024 para el grupo sanguíneo A, 256 para el grupo sanguíneo B y 512 para el grupo sanguíneo O, mientras que en el extracto acuso obtenidos del frejol de cabeza negra se evidenció una baja concentración, a pesar de que la actividad hemoaglutinante fue demostrada en el extracto (Tabla 8).

Tabla 8: Titulación de los extractos acuosos

Frejol de cabeza negra (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.)											
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
GR	Grado de aglutinación										
A	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
B	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
O	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
Amaranto (<i>Amaranthus candatus</i> L.)											
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
GR	Grado de aglutinación										
A	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	0+
B	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	0+	0+	0+
O	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	0+	0+

Fuente: Elaboración propia. **Leyenda:** (4+) = muy fuerte aglutinación, (3+) = fuerte aglutinación, (2+)= moderada aglutinación, (1+) = débil aglutinación y (½+) = muy débil aglutinación. GR= Glóbulo Rojo

Evaluación de la Actividad Anticoagulante:

Aplicando el procedimiento establecido en la metodología, se determinó la actividad anticoagulante de los extractos acuosos obtenidos de los granos andinos en estudio, los

resultados de este ensayo revelaron que ambos extractos acuosos poseen actividad anticoagulante al inhibir a los factores de la coagulación sanguínea de las vías extrínseca, intrínseca y común. Con el extracto de amaranto se demostró una inactivación de la formación de la fibrina, con un TP de 20 segundos mientras que con el frejol un TP de 24 segundos, con lo que se demuestra una discreta actividad anticoagulante sobre las proteínas plasmáticas de la coagulación de las vía extrínseca y común. Con el extracto de amaranto se demostró una inactivación de la formación de la fibrina, con un TTPa de 300 segundos mientras que con el frejol un TTPa de más de 300 segundos, con lo que se demuestra una fuerte actividad anticoagulante sobre las proteínas plasmáticas de la coagulación de las vía intrínseca y común, los cuales son mostrados en la Tabla 9.

Tabla 9: Actividad anticoagulante

Evaluación de la actividad anticoagulante mediante la medición del TP y TTPa			Promedio (TP)	Promedio (TTPa)
Control = 100 µL + Plasma + 100 µL S.S.F al 0,85%			15 seg	47 seg
No.	Nombre Común	Nombre científico		
1	Amaranto	<i>Amaranthus candatus</i> L.	20 seg	300 seg
2	Frejol de cabeza negra	<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.	24 seg	> 300 seg

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana:

A continuación, siguiendo el procedimiento descrito en la metodología se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y etanólicos de los granos andinos estudiados sobre bacterias y levaduras ATCC, que se muestran en las tablas 10 y 11 respectivamente.

Actividad antibacteriana:

Los hallazgos indicaron que el extracto acuoso del Amaranto inhibió el crecimiento solo contra *Klebsiella pneumoniae* con un halo de inhibición comparable con los discos de antibióticos utilizados, evidenciado así poseer una fuerte actividad antibacteriana, por el contrario, el extracto de frejol de cabeza negra no presentó ninguna actividad antibacteriana (Tabla 10).

Tabla 10: Actividad antibacteriana de los extractos acuosos obtenidos de los granos andinos estudiados contra especies ATCC bacterianas, medida como halos de inhibición en milímetros (mm).

Actividad antibacteriana			Bacterias ATCC. Inhibición en mm.					
			<i>S. aureus</i> 25923	<i>Proteus mirabilis</i> 25933	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 70063	<i>Salmonella enterica</i> 35664	<i>E. Coli</i> 25922	<i>E. faecalis</i> 29212
Ciprofloxacina 10 µg			29	32	30	10	30	24
Tetraciclina 30 µg			30	0	24	0	32	26
Nº	Nombre común	Nombre científico						
1	Amaranto	<i>Amaranthus candatus</i> L.	0	0	25	0	0	0
2	Frejol de	<i>Vigna</i>	0	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

Actividad antimicótica:

Los hallazgos de las pruebas para valorar la actividad antimicótica indicaron que los extractos acuosos de Amaranto y frejol negro no presentaron ninguna actividad contra las levaduras inoculadas (Tabla 11).

Tabla 11: Actividad antimicótica

Actividad antimicótica			Halos de inhibición en mm.				
			<i>C. albicans</i> 1023	<i>C. glabrata</i> 4843	<i>C. parapsilosis</i> 22019	<i>C. krusei</i> 14243	<i>C. tropicalis</i> 66029
Fluconazol 75 µg			40	27	30	30	36
Nº	Nombre común	Nombre científico					
1	Amaranto	<i>Amaranthus candatus</i> L.	0	0	0	0	0
2	Frejol de Cabeza Negra	<i>Vigna unguiculata</i> L.Walp.	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

Evaluación de la Actividad Citotóxica:

Para valorar la actividad citotóxica sobre los nauplios de *Artemia salina*, se aplicó el procedimiento utilizando concentraciones de los extractos de: 1, 10, 100 y 1000 µg/mL y realizando la evaluación de la actividad a las: 0, 2, 6 y 24 horas teniendo como control de actividad positiva, diluciones de Sodium Dodecyl Sulfate preparadas a las mismas concentraciones y como control negativo agua marina artificial + DMSO

Tabla 12: Porcentaje mortalidad de nauplios de *Artemia salina* por acción del extracto acuoso y etanólico obtenido de granos de Amaranto

Tiempo (h)	Concentración del extracto acuoso en (µg/mL)				Control Neg (-)
	1	10	100	1000	
0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
6	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
24	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
SDS	10 %	50 %	80 %	100 %	0 %

No tóxico Valor > 1000 (µg/mL)

El resultado de la evaluación de la actividad citotóxica del extracto acuoso y etanólico de los granos de Amaranto reveló que no posee ningún grado de toxicidad.

Tabla 13: Porcentaje mortalidad de nauplios de *Artemia salina* por acción del extracto acuoso de los granos del Frejol de cabeza negra

Tiempo (h)	Concentración del extracto acuoso en (µg/mL)				Control Neg (-)
	1	10	100	1000	
0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

6	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
24	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
SDS	10 %	50 %	80 %	100 %	0 %

No tóxico Valor > 1000 (µg/mL)

El resultado de la evaluación de la actividad citotóxica del extracto acuoso de los granos del Frejol de cabeza negra reveló que no posee ningún grado de toxicidad.

Tabla 14: Porcentaje mortalidad de nauplios de *Artemia salina* por acción del extracto etanólico de los granos del Frejol de cabeza negra

Tiempo (h)	Concentración del extracto acuoso en (µg/mL)				Control Neg (-)
	1	10	100	1000	
0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
6	0 %	0 %	50 %	100%	0 %
24	0 %	0 %	90%	100 %	0 %
SDS	10 %	50 %	80 %	100 %	0 %

Moderadamente tóxico valor entre 100-500 (µg/mL)

El resultado de la evaluación de la actividad citotóxica del extracto etanólico los granos del Frejol de cabeza negra reveló que existe un moderado grado de toxicidad ya que el 90% de los nauplios de *Artemia salina* murieron a una concentración de 100 µg/mL, en un tiempo de 24 horas, utilizando como referencia la tabla de toxicidad propuesta por el CYTED (46)

Discusión

Determinación de la actividad hemoaglutinante:

Los resultados de este estudio indican que los granos andinos evaluados contienen lectinas que se han identificado a través de su capacidad de hemoaglutinación contra eritrocitos humanos, estos resultados de la actividad de hemoaglutinación en el extracto acuoso de las semillas de amaranto coinciden con los informados por Mengoni (47), Dandeu (48), Rodríguez (49) en donde reportan la presencia de actividad de hemoaglutinación en eritrocitos humanos de los grupos A, B y O, aunque con una ligera diferencia en la intensidad de la aglutinación, posiblemente relacionada con las diluciones y especies diferentes empleadas, además de que se desconocen las condiciones ambientales, de cultivo y estacionales que podrían influir en la producción de las lectinas en los granos evaluados lo que puede alterar también su concentración y potencia, aunque existe diferencia en cuanto a la intensidad de la hemoaglutinación con una mucho menor respuesta sobre el tipo B a diferencia del tipo A y O.

Evaluación de la Actividad Anticoagulante:

A pesar de la escasa información disponible sobre la actividad anticoagulante en granos andinos en la literatura científica, los resultados de este estudio revelan la presencia de actividad anticoagulante en los extractos acuosos de las semillas de Frejol negro, así como del amaranto, Sabbione et al. en el 2016 (38) estudiaron esta actividad anticoagulante coincidiendo con lo evidenciado en nuestro estudio que da cuenta de la existencia de una

importante prolongación de los tiempos de coagulación, principalmente en el TTPa.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana:

Actividad antibacteriana:

En cuanto a la actividad antibacteriana, se observó que solo el extracto de amaranto presentó actividad antibacteriana inhibiendo solo el desarrollo de *Klebsiella pneumoniae* con una actividad similar a la presentada por la tetraciclina y ciprofloxacina, sin embargo, no presentó actividad contra las otras cepas bacterianas estudiadas, además el frejol de cabeza negra no presentó actividad antibacteriana, esto contrasta con lo reportado por Maiyo (50), Guo (51), Harsha (52) quienes indicaron que el amaranto presentó actividad contra múltiples bacterias, posiblemente en relación con las diluciones que utilizaron.

Actividad antimicótica:

En nuestro estudio no se evidenció ninguna actividad antifúngica con ninguno de los extractos de ambos granos estudiados, sin embargo, Jadhav y Biradar. (53) indicaron que el amaranto sí presentó actividad contra múltiples levaduras, esto podría tener relación con el diluyente utilizado en el proceso de extracción hidroalcohólica, que en su caso fue metanol, y la especie del grano estudiado que pudo tener diferentes condiciones de cultivo, que pudieron influir en la producción de metabolitos secundarios con una mejor actividad biológica.

Evaluación de la Actividad Citotóxica:

En cuanto a la evaluación de la actividad citotóxica se pudo evidenciar que los extractos acuosos de ambos granos andinos en estudio no exhibieron actividad citotóxica, por otra parte, tampoco se evidenció esta actividad en el extracto etanólico obtenido de los granos del Amaranto, sin embargo, sí se pudo evidenciar una moderada actividad citotóxica en el extracto etanólico obtenido de los granos de Frejol cabeza negra a concentraciones entre 1000 y 100 µg/mL a las 24 horas. Prajitha y Thoppil (54) demostraron que los extractos de amaranto indujeron aberraciones citogenéticas, tales como: rotura citoplasmática, desintegración citoplasmática, contracción citoplasmática, retroceso del citoplasma, vacuolación citoplasmática, células enucleadas, vacuolación nuclear, fragmentación y desintegración nucleares por lo que indicaron que su actividad citotóxica es importante. Por su parte Valadez-Vega et al. (55) también indicaron similares resultados con inducción a la destrucción celular a la exposición a extractos de amaranto, resultados que no coinciden con los reportados en nuestro estudio en el que el extracto de amaranto no afectó la integridad de los nauplios de *Artemia salina*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

La extracción de lectinas de semillas es posible mediante la aplicación de disrupción mecánica y el uso de la técnica de infusión en frío logrando posteriormente evaluar su actividad biológica.

Las hemaglutininas derivadas de las semillas de amaranto y frejol de cabeza negra mostraron tener una actividad hemoaglutinante significativa contra los tres grupos sanguíneos humanos A, B y O siendo más potente en el extracto obtenido de los granos del amaranto.

Ambos extractos demostraron tener efecto sobre la capacidad coagulante del plasma al evidenciarse un incremento en el tiempo de protrombina (TP) de forma discreta y en el tiempo parcial de tromboplastina (TTPa) de manera importante.

La actividad antimicrobiana de estos extractos fue muy débil, solo se demostró una importante actividad antibacteriana sobre la especie de *Klebsiella pneumoniae* expuesta al extracto de amaranto, con el resto de los microorganismos estudiados no se demostró actividad antibacteriana y antifúngica.

Se demostró que el extracto etanólico obtenido de los granos del Frejol de cabeza negra posee una moderada actividad citotóxica a las 24 horas de incubación con una letalidad del 90% a una concentración de 100 µg/mL sobre nauplios la *Artemia salina*.

Recomendaciones

Seguir con investigaciones detalladas en cuanto al poder anticoagulante y hemoaglutinante de ambos extractos ya que presentaron una actividad importante pudiendo tener aplicaciones en salud pública.

Realizar mayores pruebas con diferentes diluciones del extracto de amaranto para el estudio de su actividad antibacteriana pudiendo funcionar como coadyuvante en el manejo de procesos infecciosos.

Valorar la relación de riesgo beneficio de la actividad citotóxica del frejol de cabeza negra para una posible utilidad en salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis.* 2003;36(1):511–523.
2. Soto L. Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit.* 2003;(1):44-48.
3. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Española Quimioterapia.* 2003;(4):385-393.
4. Jawetz y col. *Microbiología Médica; XVII Edición, Ed. Manual Moderno.* 2002;163-172.
5. Rutherford-Markwick KJ, Moughan PJ. Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International.* 2005;88(3):955-966.
6. ONU. Conferencias de Naciones Unidas sobre el Medio ambiente y el Desarrollo (CNUCED). 1992.
7. ONU. DECLARACIÓN DE CHIANG MAI. “Salve plantas, para salvar vidas. 1988
8. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. 2021
9. Maguiña-Vargas Ciro, Ugarte-Gil César Augusto, Montiel Marco. Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta méd. peruana.* 2006;23(1):15-20.
10. Ministerio de Salud Pública. Plan Nacional para la Prevención y Control de la Resistencia Antimicrobiana. 2019.
11. Zampini I, Cudmani N, Isla M. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007;41(3):385-93
12. Luckner M, Nover L, Böhm H. Secondary metabolism, and cell differentiation. Vol. 23. Springer Science & Business Media, 2013.
13. Leonora F. Fitoquímica. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 2022.
14. Olivoto T, Nardino M, Carvalho IR, Follmann DN, Szarecki VJ, Ferrari M, de Pelegrin A Jr, de Souza VQ. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African Journal of Agricultural Research.* 2017;12:71-84.
- 15.- Cabello-Ruiz ED, Núñez-González MA, Torres de la Cruz VM. Actividad biológica de proteínas y péptidos. En Rivas-Morales C, Oranday-Cardenas MA, Verde-Star MJ. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica.* Barcelona, España: Omnia Science. 2016: pp. 313-350.
16. Alghamdi SS, Khan MA, Migdadi HM, El-Harty EH, Afzal M, Farooq M () Biochemical and molecular characterization of cowpea landraces using seed storage proteins and SRAP marker patterns. *Saudi Journal of Biology Science* 2019;26:74-82.
17. Silva-Sánchez C. Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí. [Doctoral tesis] México: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. 2007.
18. Ling WT, Gao YZ. Promoted dissipation of phenanthrene and pyrene in soils by amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). *Environmental Geology.* 2004;46(5):553-560.
19. Chavez-Jauregui RN, Cardoso-Santiago RA, Pinto e Silva MEM, Areas JAG. Acceptability of snacks produced by the extrusion of amaranth and blends of chickpea and bovine lung. *International Journal of Food Science and Technology.* 2003;38(7):795-798.

20. Rascon-Cruz Q, Sinagawa-Garcia S, Osuna-Castro JA, Bohorova N, Paredes-Lopez O. Accumulation, assembly, and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize. *Theoretical and applied genetics*, 2004;108(2):335-342.
21. Galvez AF, Chen N, Macasieb J, De Lumen BO. Chemopreventive property of a soybean Peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Res.* 2001;61:7473-7478.
22. Jeong HJ, Lam Y, De Luman BO. Barely Lunasin suppresses rasinduced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *J. Agric Food Chem.* 2002;50:5903-5908.
23. Gerrano AS, Van Rensburg WSJ, Venter SL, Shargie NG, Amelework BA, Shimelis HA, Labuschagne MT. Selection of cowpea genotypes based on grain mineral and total protein content. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science.* 2019;69:155-166.
- 24.- Mikłasińska-Majdanik M, Kępa M, Wojtyczka RD, Idzik D, Wąsik TJ. Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(10):2321.
- 25.- Aldulaimi OA. General overview of phenolics from plant to laboratory, good antibacterials or not. *Pharmacogn Rev.* 2017;11:123–127.
- 26.- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;29:5:e47.
- 27.- Kyaw BM, Arora S, Lim CS. Bactericidal antibiotic-phytochemical combinations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol.* 2012;43:938–945.
- 28.- Djabayan-Djibeyan, Pablo, González-Ramírez, Luisa C., Ustariz, María E. Lucena-de, & Valarezo-García, Carlos. Aislamiento y actividad biológica de lectinas obtenidas de semillas de frutas, granos y tubérculos de plantas andinas. *Información tecnológica.* 2022; 33(2):21-36.
- 29.- Djabayan-Djibeyan P, Carpenter B, Medina-Ramírez G, Andueza-Leal F, León-Leal A, Djabayan-Russo A, Jaramillo-Abril D, Valarezo-García C, Araujo-Baptista L. Cold steeping infusion, a novel lectin extraction technique for the isolation, purification, and partial characterization of lectins from the green Venezuelan marine alga *Caulerpa serrulata*. *Nat Prod Commun.* 2018;13(12):1715-1719.
- 30.- Kee NLA, Mnonopi N, Davids H, Naudé RJ, Frost C L. “Antithrombotic/anticoagulant and anticancer activities of selected medicinal plants from South Africa”. *African Journal of Biotechnology.* 2018;7(3):217-223.
- 31.- Kamolvit W, Nilsén V, Zambrana S, Mohanty S, Gonzales E, Östenson CG, Brauner A. *Lupinus mutabilis* edible beans protect against bacterial infection in uroepithelial cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018;2018(1098015):1-8.
- 32.- Cáceres-Huambo, A., Determinación de la estructura primaria de la lectina V-2 de semillas de arveja (*Pisum sativum* L.) y su efecto antibacteriano en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, *Idesia (Arica).* 2017;35(1):11-18
- 33.- Lipkin A, Anisimova V, Nikonorova A, Babakov A, Krause E, Bienert M, Grishin E, Egorov T. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry.* 2005;66(20):2426-2431.
- 34.- Janssen F, Anneleen P, Rombouts I, Janssens K, Lomme D, Delcuor J. Proteins of amaranth (*Amaranthus* spp.), buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and quinoa (*Chenopodium*

- spp.): A food science and technology perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;16(1):39-58.
- 35.- Sabbione AC, Scilingo A, Añón MC. "Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates". *LWT - Food Science and Technology*. 2018;60(1):171-177.
 36. Orosco E. Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos. Facultad de Ciencias Exactas-UNLP. 2013
 37. Luz Lda. Caracterização Estrutural E Aplicações Biológicas Da Lectina Coagulante De Sementes De *Moringa Oleifera* (Cmol). Centro De Ciências Biológicas. 2013.
 38. Sabbione AC, Rinaldi G, Añón MC, Scilingo AA. Antithrombotic Effects of *Amaranthus hypochondriacus* Proteins in Rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2016;71(1):19-27.
 39. Ávalos-Soto J, Treviño-Neávez JF, Verde-Star MJ, Rivas-Morales, Oranday-Cárdenas A, Moran-Martínez J, ... Morales-Rubio ME. Cytotoxic evaluation of *Azadirachta indica* (A. Juss) ethanolic extracts against different cells lines. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 2014;45(3):39-44.
 40. Boorman, J., Mellor, P.S., Boreham, P.F.L., y Hewett, R. S. A latex agglutination test for the identification of blood-meals of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of Entomological Research*, 1977;67(2):305-311.
 41. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *AJCP*. 1966;45(4):493-496.
 - 42.- Velazco J, Araque M, Araujo E, Longa A, Nieves B, Ramírez, A, et al. Manual práctico de Bacteriología Clínica. Colección Temas Universitarios. Venezuela: Universidad de los Andes; 2008
 43. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 198;15(3):382-387.
 44. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DJ, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 1982;45(05):31-34.
 45. McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal*, 1998;32(2):513-524.
 46. CYTED. (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. España: Editor Pinzón;; p 45-49, 1995.
 47. Mengoni A. Purificación y caracterización de una lectina de *Amaranthus hypochondriacus*, un compuesto antiproliferativo. *INNOTEC*. 2016; 11(1): pp. 27-35,
 48. Dandeu L. Análisis de la actividad aglutinante de extractos de semillas del género *Amaranthus* cultivados en la Región Semiárida Pampeana frente a eritrocitos seleccionados. Universidad de Concepción del Uruguay- Facultad de Ciencias Médicas Dr. Bartolomé Vassallo, Gualeguaychú. 2018
 49. Rodríguez MV, Riquelme B, Valverde J, Gattuso S. Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. *ANALES AFA*. 2014;16 (1):247-248.
 50. Maiyo Z, Ngure R., Matasyoh J. Chepkorir R. Phytochemical constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of three *Amaranthus* plant species. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(21):3178-3182

51. Guo L, Wang Y, Bi X, Duo K, Sun Q, Yun X, Zhang Y, Fei P, Han J. Antimicrobial Activity and Mechanism of Action of the *Amaranthus tricolor* Crude Extract against *Staphylococcus aureus* and Potential Application in Cooked Meat. *Foods*. 2020;9(3):359.
52. Harsha S. In Vitro Antibacterial Activity Of *Amaranthus spinosus* Root Extracts. *Pharmacophore*. 2011;2(5):229-234
53. Jadhav V, Biradar. SD. Evaluation of Antifungal Activity of *Amaranthus spinosus* L. (Amaranthaceae). *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2016;5(9):38-43.
54. Prajitha V, Thoppil JE. Cytotoxic and apoptotic activities of extract of *Amaranthus spinosus* L. in *Allium cepa* and human erythrocytes. *Cytotechnology*. 2017;69(1):123-133.
55. Valadez-Vega C, Lugo-Magaña O, Morales-González J., Delgado-Olivares L. Phytochemical, cytotoxic, and genotoxic evaluation of protein extract of *Amaranthus hypochondriacus* seeds, *CyTA - Journal of Food*. 2021;19:1:701-709,

ANEXOS

Anexo 1: Procesamiento de los granos seleccionados con el fin de obtener los de Amaranto y Frejol de cabeza negra



Fuente: Elaboración propia

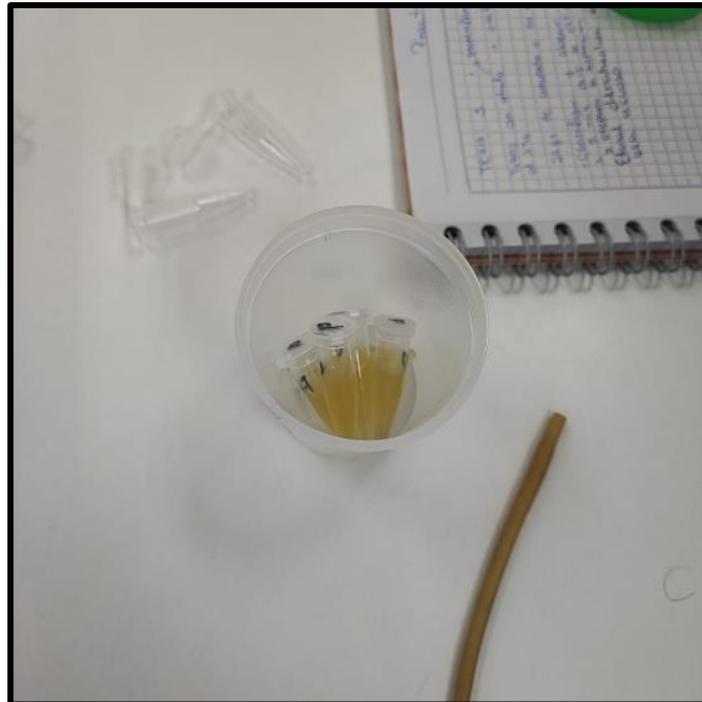
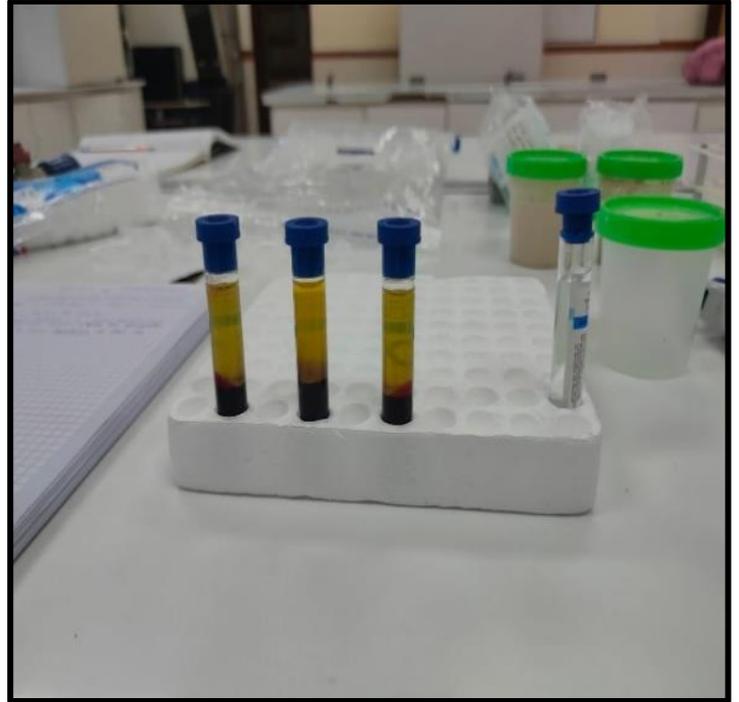
Actividad anticoagulante

Anexo 2: Obtención de sangre de donantes de tipo A, B Y O



Fuente: Elaboración propia

Anexo 3: Obtención de plasmas de donantes



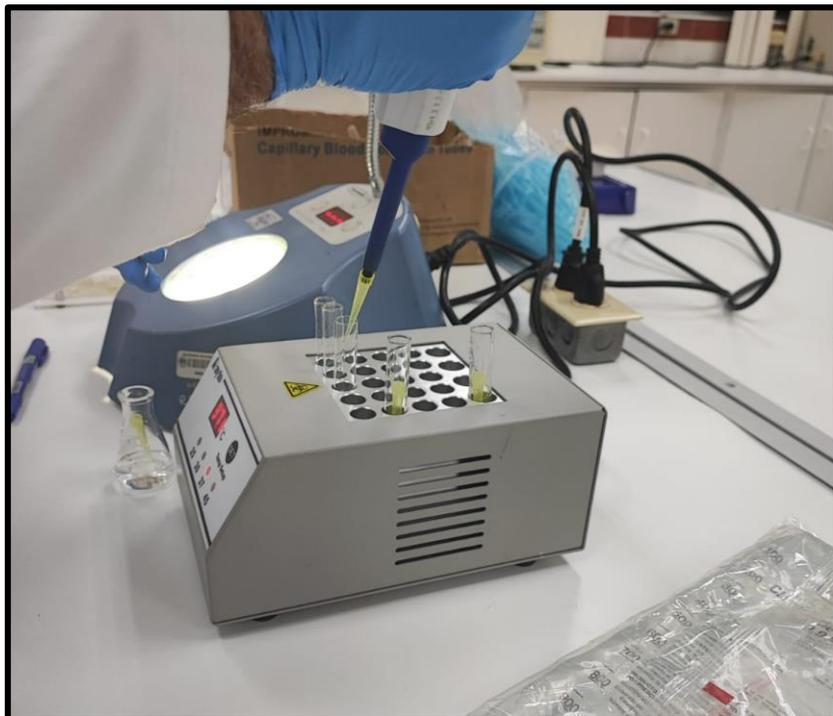
Fuente: Elaboración propia

Anexo 4: Obtención de pool de plasmas pobres en plaquetas



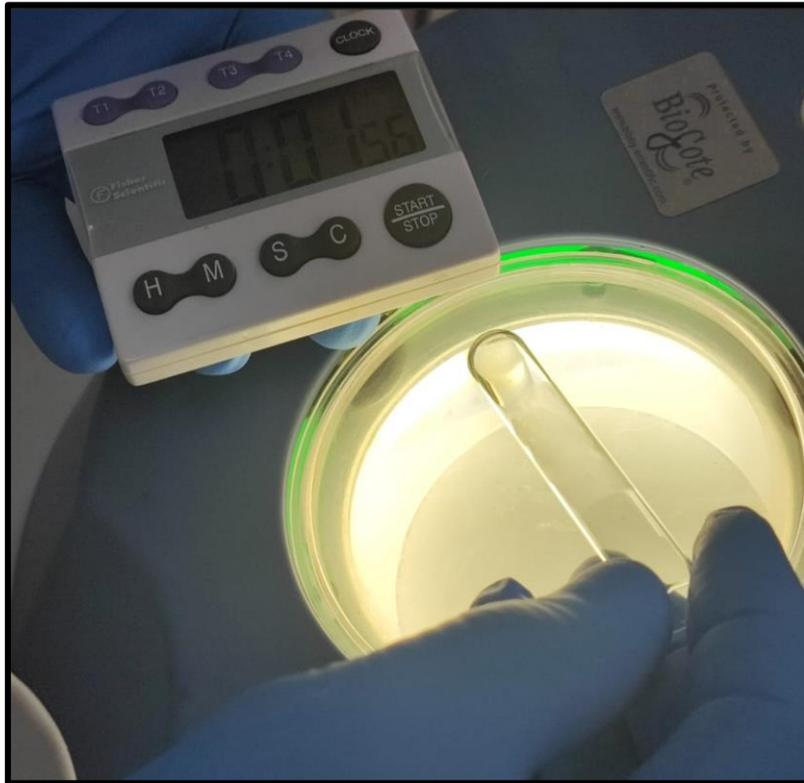
Fuente: Elaboración propia

Anexo 5: Calentamiento del tubo de ensayo a la mezcla de reactivo tromboplastina D



Fuente: Elaboración propia

Anexo 6: Registro de tiempo que tardo en coagular las mezclas



Fuente: Elaboración propia

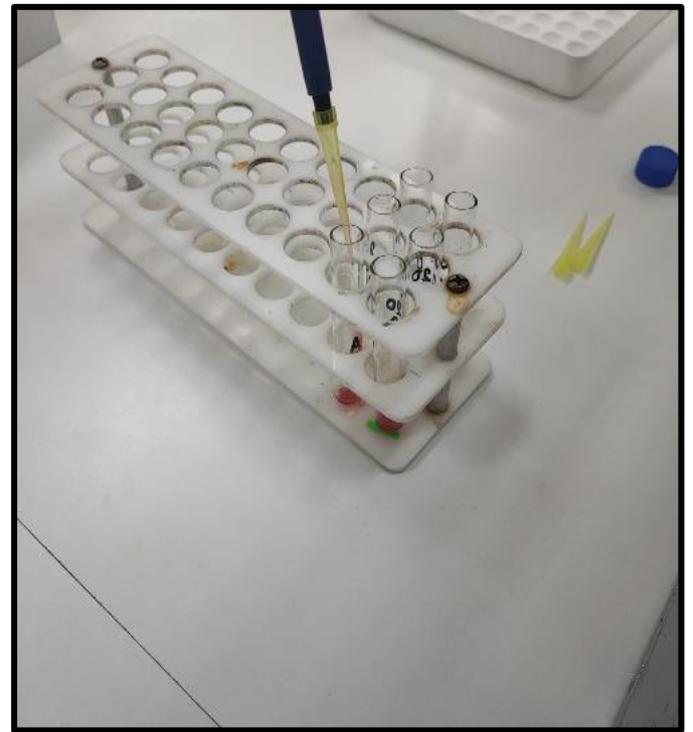
Anexo 7: Evaluación de resultados de tiempos de coagulación



Fuente: Elaboración propia

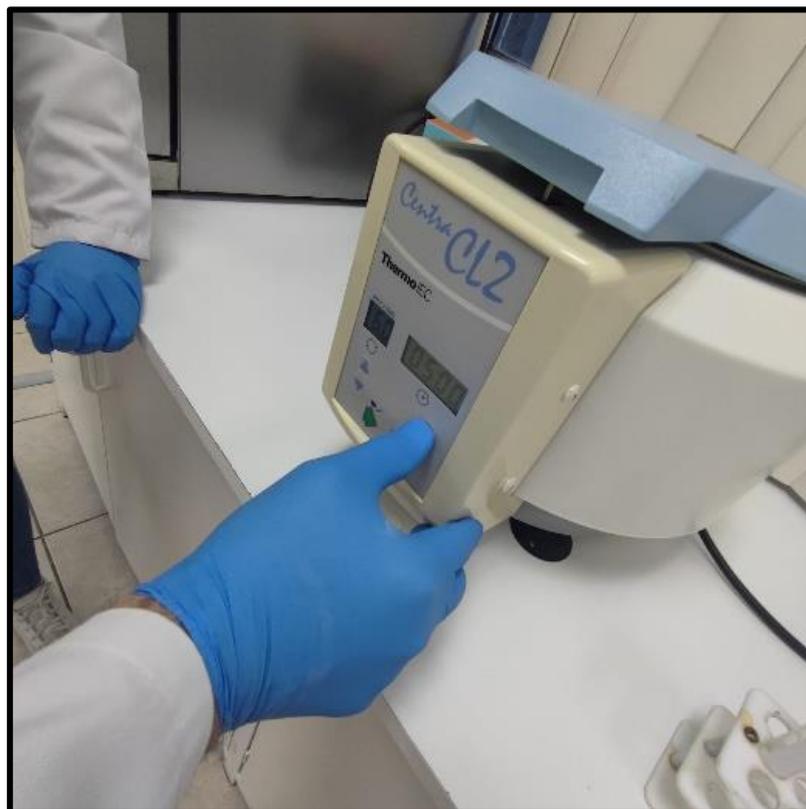
Actividad hemoaglutinante

Anexo 8: Combinación de suspensión eritrocitaria con extractos acuosos



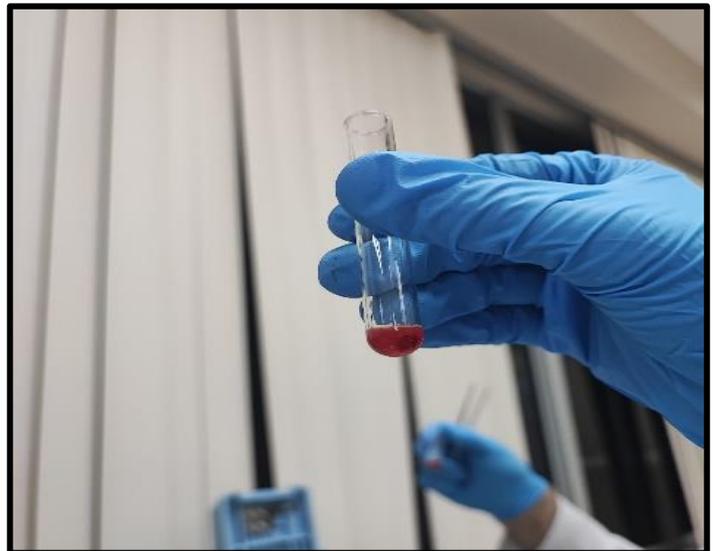
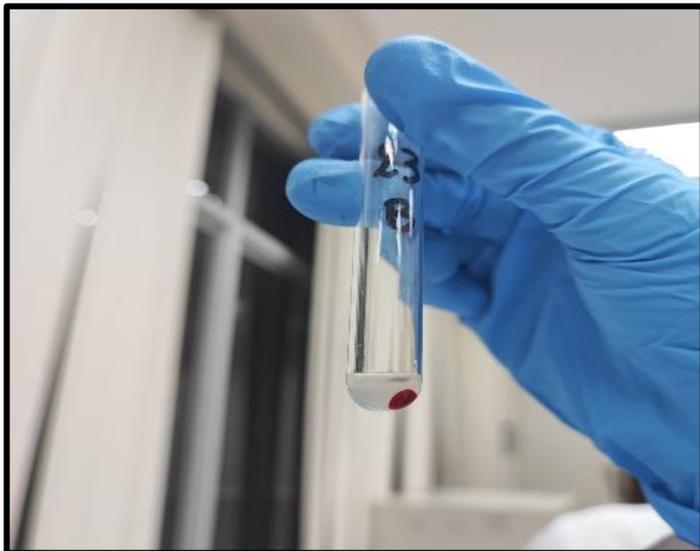
Fuente: Elaboración propia

Anexo 9: centrifugación de suspensión eritrocitaria con extractos acuosos



Fuente: Elaboración propia

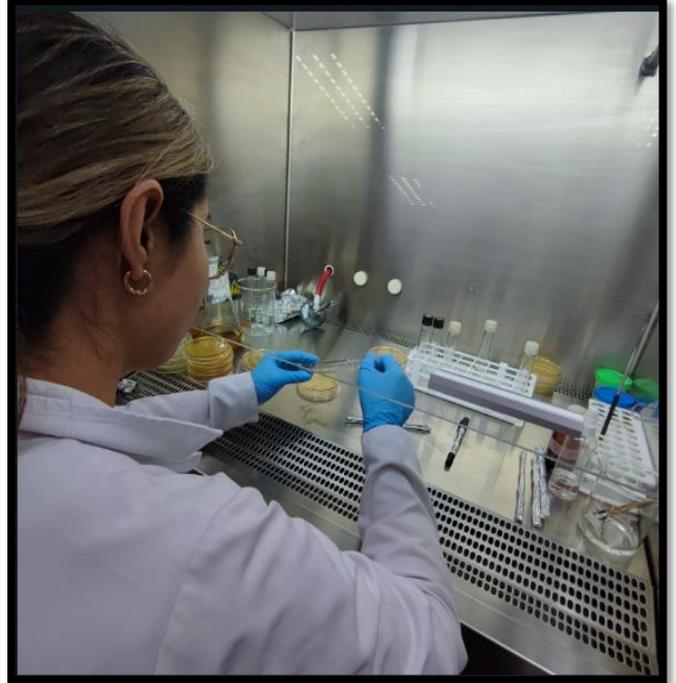
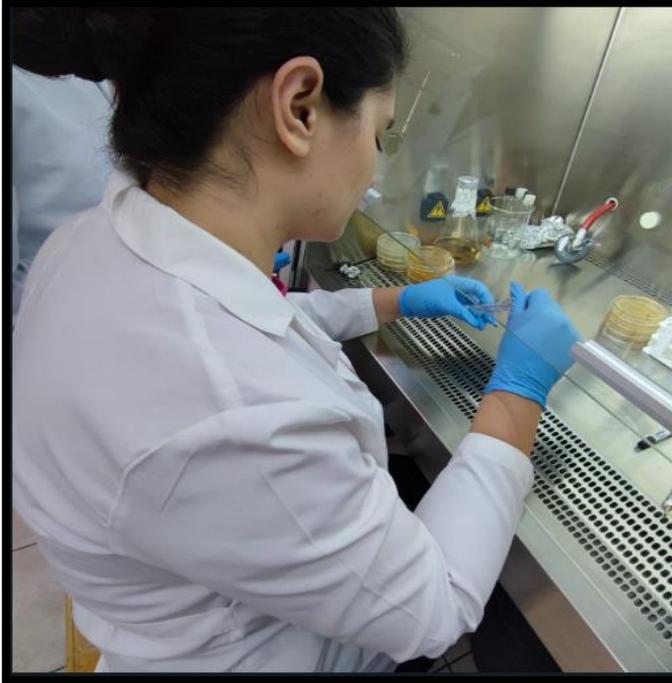
Anexo 10: Evolución de resultados de hemoaglutinación



Fuente: Elaboración propia

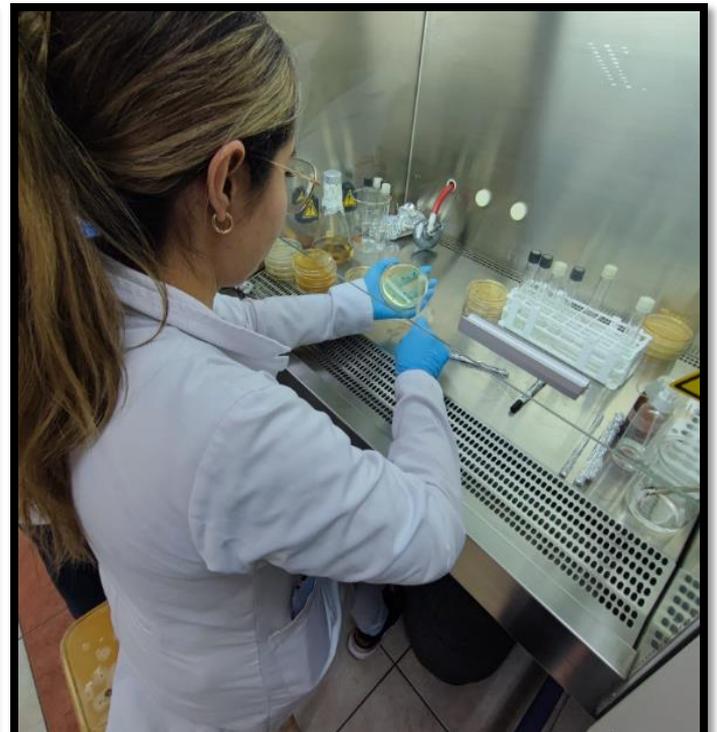
Actividad antibacteriana y antimicótica

Anexo 11: Preparación de inóculos de cada cepa



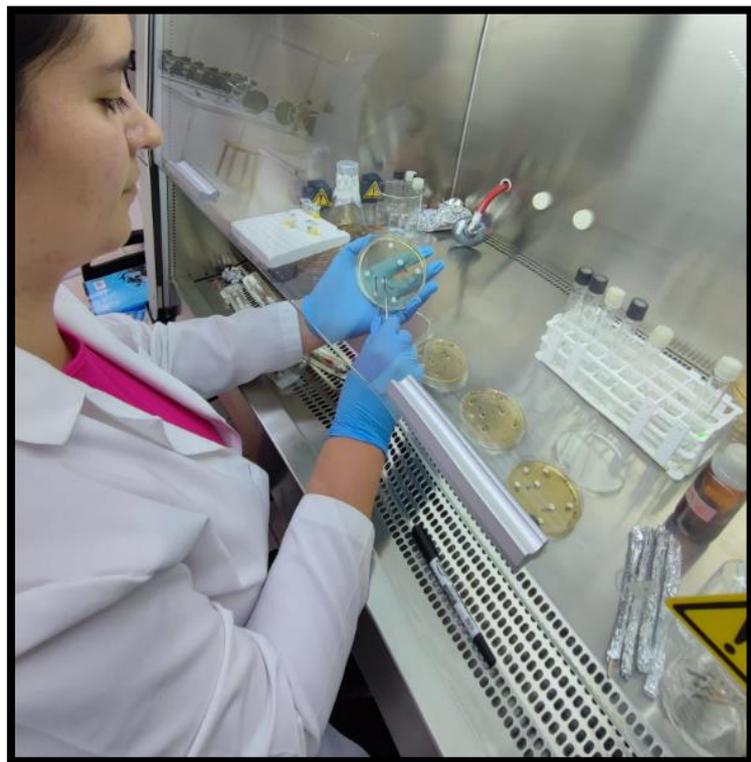
Fuente: Elaboración propia

Anexo 12: Siembra de las cepas en agar cerebro corazón



Fuente: Elaboración propia

Anexo 13: Colocación de discos de extracto acuoso, antibiótico y antimicótico.



Fuente: Elaboración propia

Anexo 14: Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica



Anexo 15: Preparación solución de agua de mar artificial al 3%



Fuente: Elaboración propia

Anexo 16: Crecimiento de los quistes de Artemia salina



Fuente: Elaboración propia

Anexo 17: Diluciones de los extractos acuosos con agua de mar artificial y colocación de las Artemias.



Fuente: Elaboración propia

Anexo 18: Evaluación de mortalidad de las Artemias



Fuente: Elaboración propia

Anexo 19: Consentimientos informados

 **Unach**
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CAJAMARCA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación: "Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de granos andinos"

Fecha: 09 de 06 de 2023.
Nombre: Katharine Deth Bautista S. Edad: 25 Grupo sanguíneo: A RH +
Tutor responsable: Dr. Pablo Djabayan Djibeyan

Yo: Katharine Deth Bautista S. con C.C.: 0550157127 Se me

ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre y su utilización en el presente estudio. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.


Firma

 **Unach**
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CAJAMARCA

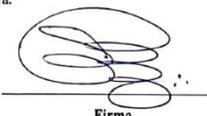
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación: "Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de granos andinos"

Fecha: 09 de 06 de 2023.
Nombre: Pablo Djabayan Djibeyan Edad: 63 Grupo sanguíneo: B...
Tutor responsable: Dr. Pablo Djabayan Djibeyan

Yo: Pablo Djabayan Djibeyan con C.C.: 1757202773 Se me

ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre y su utilización en el presente estudio. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.


Firma

 **Unach**
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CAJAMARCA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación: "Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de granos andinos"

Fecha: 09 de 06 de 2023.
Nombre: Damián Pineda Ulloa con C.C.: 66219 Edad: 29 Grupo sanguíneo: O RH +
Tutor responsable: Dr. Pablo Djabayan Djibeyan

Yo: Damián Pineda Ulloa con C.C.: 1772605456 Se me

ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre y su utilización en el presente estudio. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.


Firma

Fuente: Elaboración propia