

**UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Actividad antimicótica de saponina de
Chenopodium quinoa Willd (quinua) frente a
Candida albicans ATCC 90028. Ayacucho 2020.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Presentado por la:

Bach. HUAYANCA RAMÍREZ, Ingrid Yaqueline

Ayacucho-Perú

2021

Quiero dedicar esta investigación a mi madre, ángel guardián que siempre cuida y protege mi vida, a su vez también a mi abuela Paula, la mujer que veló por mí durante toda mi infancia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por darme la oportunidad de estudiar en sus aulas, ser profesional y financiarme la tesis mediante el Proyecto FOCAM. A los profesores, que durante mi carrera universitaria aportaron en mi formación profesional con conocimientos y valores, garantía de mi sólida formación académica y profesional.

A mi asesora, Dr. R. Brita Anaya González, por su dedicación incansable y compromiso con el trabajo de investigación, brindarme su tiempo, conocimientos y guía para el logro de los objetivos planteados en el presente trabajo de tesis.

Al Dr. Alegría Valeriano Víctor y al Dr. Romero Gavilán Serapio, por su colaboración en la parte microbiológica de la presente investigación.

Al Mg. Reynán Condor Alarcón, por su apoyo en la parte estadística de la presente investigación.

A mi madre que me motivó y apoyó en mi formación profesional y en el desarrollo de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1. Antecedentes	13
2.2. Marco conceptual	17
2.3. Bases teóricas	19
2.3.1. La quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd)	19
2.3.2. Las saponinas	21
2.3.3. Factores que afectan el contenido de saponinas en las plantas	24
2.3.4. Las saponinas de la quinua	25
2.3.5. Bioactividad de las saponinas de la quinua	25
2.3.6. Mecanismo de acción de las saponinas frente a <i>Candida albicans</i>	27
2.3.7. <i>Candida albicans</i>	27
2.3.8. Cepas ATCC	30
2.3.9. Determinación de la actividad antimicótica	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Área de estudio	35
3.1.1. Ubicación política	35
3.1.2. Ubicación geográfica	35
3.2. Unidad de análisis	35
3.2.1. Muestra biológica	35
3.3. Metodología y recolección de datos	35
3.3.1. Recolección y preservación del material biológico	35
3.3.2. Ensayos preliminares:	36
3.3.3. Extracción de saponinas:	36

3.3.4. Determinación del porcentaje de rendimiento:	37
3.3.5. Caracterización cualitativa de saponinas	37
3.3.6. Cuantificación de saponinas por el método colorimétrico	38
3.3.7. Determinación del índice hemolítico	38
3.3.8. Determinación de la actividad antimicótica	39
3.4 Diseño de investigación	44
3.5. Análisis de datos	44
IV. RESULTADOS	45
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	64
VII. RECOMENDACIONES	65
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	74

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	23
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i> .	31
Tabla 3. Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.	45
Tabla 4. Escala de Duraffourd y Lapraz.	46
Tabla 5. Diluciones decrecientes de la saponina extraída de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y fungicida.	47
Tabla 6. Promedio del halo de inhibición de la saponina extraída a partir de los granos de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd a la concentración de 500 µg/mL, 250 µg/mL y de Fluconazol a la concentración de 15000 µg/mL frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. Ayacucho 2020.	50
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la saponina extraída de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” en las concentraciones de 500 µg/mL y 250 µg/mL. Ayacucho 2020.	52
Tabla 8. Evaluación del nivel de sensibilidad del efecto antimicótico de la saponina de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 50 µg/mL y 5 µg/mL frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028, mediante halos de inhibición en milímetros. Ayacucho 2020.	53
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) de la saponina extraída de granos de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	54
Tabla 10. Caracterización fitoquímica de las saponinas extraídas de las semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. Ayacucho-2020	55
Tabla 11. Porcentaje de rendimiento de la extracción de saponinas de las semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	58
Tabla 12. Prueba de hemólisis producida por saponinas extraídas de las semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Características botánicas de <i>Chenopodium quinoa</i> “quinua”.	25
Figura 2. Estructura general de una saponina (a). Estructura de la β -amirina, esqueleto base de las saponinas (b).	26
Figura 3. Estructura de <i>Candida albicans</i> .	33
Figura 4. Media de diámetro de halo de inhibición (mm) en las diferentes concentraciones de saponina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla) y de Fluconazol 15000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ayacucho 2020.	51
Figura 5. Espectro de absorción de la saponina de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	56
Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de saponinas. Ayacucho 2020.	57

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Documento de acreditación de cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028.	84
Anexo 2. Constancia de certificación de planta de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	85
Anexo 3. Lugar de muestreo para obtener las semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd (accesión amarilla). Distrito de Chiara, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.	86
Anexo 4. Flujograma para la obtención de saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. Ayacucho 2020.	87
Anexo 5. Flujograma para las reacciones de caracterización de saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. Ayacucho 2020.	86
Anexo 6. Flujograma para la determinación del índice hemolítico de las saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. Ayacucho 2020.	87
Anexo 7. Flujograma para la determinación de la actividad antimicótica de las saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. Ayacucho 2020.	88
Anexo 8. Preparación de la muestra de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	90
Anexo 9. Extracción hidroalcohólica de saponinas a través de un rotavapor y obtención del crudo de saponinas. Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.	91
Anexo 10. Desengrasado con éter de petróleo de la solución hidroalcohólica de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	92
Anexo 11. Eliminación de pigmentos de la solución hidroalcohólica de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	93
Anexo 12. Eliminación de compuestos fenólicos con acetato de etilo y última extracción con n-butanol de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	94
Anexo 13. Saponinas extraídas y desecadas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	95

Anexo 14.	Pruebas fitoquímicas de las saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”: Ayacucho 2020.	96
Anexo 15.	Determinación del índice hemolítico de las saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.	97
Anexo 16.	Determinación de la concentración de saponina por espectrofotometría. Ayacucho 2020.	98
Anexo 17.	Concentraciones del extracto hidroalcohólico de saponina para enfrentar a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. Ayacucho 2020.	99
Anexo 18.	Cultivo joven de la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028, en Agar Sabouraud y preparación del inóculo con escala de Mc Farland. Ayacucho 2020.	100
Anexo 19.	Inoculación de saponina en los pozos de agar. Ayacucho 2020.	101
Anexo 20.	Medición de los halos de inhibición frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. Ayacucho 2020.	102
Anexo 21.	Determinación de Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida. Ayacucho 2020.	103
Anexo 23.	Prueba de normalidad de Anderson-Darling. Ayacucho 2020.	104
Anexo 24.	Prueba de igualdad de varianzas de Levene. Ayacucho 2020.	105
Anexo 25.	Tabla estadística que refleja la media, error estándar y desviación estándar. Ayacucho 2020.	106
Anexo 26.	Prueba ANVA. Ayacucho 2020.	107
Anexo 27.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para los tratamientos de saponinas extraídas de las semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. Ayacucho 2020.	108
Anexo 28	Matriz de consistencia	109

RESUMEN

La presente investigación tiene por objetivo, determinar la actividad antimicótica de las saponinas de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd frente a *Candida albicans* ATCC 90028. El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra fue recolectada en el distrito de Chiara, provincia de Huamanga - Ayacucho. La extracción de saponinas se efectuó mediante el método descrito por Harinder *et al.* Se encontraron cualitativamente mayor cantidad de saponinas triterpénicas en comparación con las esteroidales. La actividad antimicótica se probó a concentraciones de saponina de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 50 µg/mL y 5 µg/mL enfrentando a una cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 (con un control positivo: Fluconazol 15000 µg/mL), mediante la técnica de sensibilidad en pozos de agar Sabouraud. La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida se determinó por el Método de Dilución en Caldo. La concentración de saponinas fue de 6.08 mg/mL. Se demostró con el análisis estadístico de ANVA 95% de confianza y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, que a una concentración de 500 µg/mL el efecto inhibitorio fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la concentración de 250 µg/mL, pero menor respecto al control. La Concentración Mínima Inhibitoria tuvo una equivalencia de 62.50 µg/mL y la Concentración Mínima Fungicida de 125 µg/mL. Se concluye que, bajo las condiciones experimentales desarrolladas, la saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd (accesión amarilla) posee actividad antimicótica.

Palabras clave: saponinas, *Candida albicans*, actividad antimicótica, *Chenopodium quinoa* Willd.

I. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las plantas tienen usos medicinales y muchas de ellas con fines terapéuticos, que deben ser probados experimentalmente (Huashuayo, 2015). A su vez, existe una esencial necesidad de abordar la problemática en salud de nuestro país, sobre todo en las zonas de áreas rurales y con escasos recursos; estos problemas no son atendidos y se agravan debido a los determinantes de la salud, los cuales incluyen a la pobreza, desigualdad social, discriminación, vivienda inadecuada, alimentos inseguros, malas condiciones de vida en la infancia y la falta de trabajo (Curipallo, 2014).

El aumento de la resistencia microbiana es alarmante, esto se produce debido a la inadecuada utilización de antibióticos, especialmente en los hospitales, lo que permite el desarrollo de cepas resistentes, lo que conlleva al tratamiento ineficaz de las de las infecciones. Esa es la razón por la que la OMS, en agosto del 2019, mediante el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, generó la aplicación de un protocolo de respuesta temprana para la inclusión de *Candida spp.* como problema que aflige a la Salud Pública, enfocándose en las infecciones del torrente sanguíneo originadas por las especies de levaduras del género *Candida* (candidemia) (OMS, 2019).

La candidiasis es considerada como una de las infecciones oportunistas más comunes en las personas. En los últimos 20 años su incidencia ha aumentado. *Candida* es responsable del 7.45 % de las micosis, el 25 % de las micosis superficiales y de 75 a 88 % de las infecciones fúngicas intrahospitalarias. La especie de *Candida albicans* es considerada como la más patógena, se atribuye la virulencia de esta a su capacidad de eludir los mecanismos de protección de las personas, de tolerar el tratamiento anti micótico o de producir lesiones en los tejidos y células a los que ingresa.

Diferentes genes monitorean los factores de virulencia, los cuales se denotan en un número concreto e instante determinado, estos van a establecer la virulencia de cada aislado y el fenotipo. La candidiasis vaginal es la segunda causa más común del síndrome de flujo vaginal (Muñoz, 2012).

Chenopodium quinoa Willd, se considera una planta milenaria, alimenticia y nutritiva, que posee aminoácidos esenciales, oligoelementos y vitaminas, también posee saponinas triterpénicas, ubicados sobre todo en la cáscara de las semillas. Estas saponinas tienen diversas propiedades biológicas, como: actividad membranólítica, hipocolesterolémica, antiproliferativa, antiadipogénica, antinutricional, hemolítica, efecto adyuvante, citotóxica, surfactante, antiinflamatoria, antifúngica, antioxidante y molusquicida (Ahumada *et al.*, 2016).

Por las consideraciones mencionadas, es de vital importancia descubrir nuevos agentes antifúngicos, preferiblemente con nuevos modos de acción, que ayuden a controlar la resistencia microbiana producida por *Candida albicans*; para lo cual, el presente trabajo de investigación pretende demostrar la actividad antimicótica de las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” frente a *Candida albicans* ATCC 90028. Los objetivos planteados fueron los siguientes:

Objetivo General

Determinar la actividad antimicótica de las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de inhibición de las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd.
2. Determinar el nivel de sensibilidad de las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida de las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd.
4. Caracterizar fitoquímicamente y determinar cuantitativamente el contenido de saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd.
5. Determinar el porcentaje de rendimiento y el índice hemolítico de las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

A nivel internacional

Woldemichael (2001), investigó sobre la "Identificación y actividades biológicas de las saponinas triterpenoides de *Chenopodium quinoa*", en este trabajo se detectó al menos 16 saponinas en las semillas de *Chenopodium quinoa*. Las 5 saponinas principales fueron: 3-O-a-L-arabinopiranosil fitolaca éster 28-0-8-D-glucopiranosil del ácido cagénico, éster 28-0- # - D-glucopiranosil del ácido 3-0-9-D-glucopiranosil- (1-3) -aL-arabinopiranosil fitocagénico 28-0 - #. el éster 28-0-9-D-glucopiranosil del ácido 3-O-9-D-glucuronopiranosil oleanólico, 3-0 - # - D-glucopiranosil- (1-3) -a-L- arabinopiranosil hederagenina 28-0-fl-n-glucopiranosil éster, 3-0-a- L-arabinopiranosil hederagenina 28-0-fl-n-glucopiranosil éster, éster 28-0- # - D-glucopiranosil del ácido 3-0-9-D-glucopiranosil- (1-3) -aL-arabinopiranosil fitocagénico 28-0 - # y el ácido 3-0-9-D-glucopiranosil-(1-3)-a-L-arabinopiranosil fitocagénico, estas fueron extraídas y caracterizadas utilizando sobre todo espectroscopía de RMN, espectrometría de masas y procedimientos químicos. Con respecto a la actividad hemolítica, se apreció mayor actividad en los compuestos monodesmosídicos. Se encontró que la fracción de saponina total inhibió a *Candida albicans* a una concentración de 50 µg/mL, pero las saponinas individuales no mostraron ningún efecto. A su vez, los compuestos 1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 4a, y 6 denotaron valores de CMI de valores > 500 µg/mL, el compuesto 4 obtuvo un valor de CMI de 500 µg/mL, y el compuesto 5 evidenció una CMI de 100 µg/mL. El estudio de microdilución demostró que entre las saponinas mono y bidesmosidas, solo 5 tuvieron alguna actividad. *Candida albicans* no fue inhibido por la mayoría de saponinas incluso a concentraciones de 506 µg/mL. A su vez,

el agente fúngico de control, anfotericina B, demostró una CMI significativamente baja a 1 µg / mL.

Yang (2006), realizó una búsqueda de nuevos agentes antifúngicos, para lo cual investigó 22 saponinas esteroides C-27 y 6 sapogeninas esteroides aisladas de *Agave americana*, *Dioscorea parviflora*, *Polygonatum zanlanscianense* y *Polianthes tuberosa*, para probar la actividad antifúngica frente a los patógenos oportunistas *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*. Los resultados señalaron que las saponinas esteroides 1-4, 6, 11, 14, 17 y 19-20 tenían capacidad antifúngica frente a *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, mientras que las otras saponinas esteroides (compuestos 5, 7 a 10, 12, 13, 15, 16, 18, 21 y 22) y todas las sapogeninas esteroides (compuestos 23 a 28) no mostraron actividad antifúngica, incluso en la concentración de prueba más alta de 20 µg/mL.

Coleman (2010), indagó sobre la “Caracterización de productos naturales de saponina de origen vegetal frente a *Candida albicans*”, identificó 12 saponinas, de las cuales seis saponinas poliglucosiladas (A2, A7, A17, A19, A21 y A25) inhibieron completamente a *Candida albicans* y dos de ellas la inhibieron a concentraciones de 16 y 32 µg/mL. Varias de estas saponinas pudieron ofrecer un nivel de protección similar al obtenido con anfotericina B. No se observó hemólisis de glóbulos rojos a tres veces la CMI para *C. albicans*, lo que sugirió que estas saponinas tenían preferencia por unirse al ergosterol fúngico en comparación con el colesterol.

Es importante señalar, que son escasas las investigaciones que se parecen específicamente al tema estudiado, pero existen otras investigaciones sobre la actividad antimicótica de saponinas extraídas de otras plantas, así como:

Bader (2000), investigó sobre la “Citotoxicidad de las saponinas triterpenoides. Relaciones entre las estructuras de los glucósidos del ácido poligalácico y sus actividades contra las especies patógenas de *Candida*”, demostró la acción de las saponinas triterpénicas, específicamente de glicósidos del ácido polygalacic (2 beta, 3 beta, 16 alfa, ácido 23-tetrahidroxi-Olean-12-eno-28-oico) obtenidos de las

partes aéreas de *Solidago virgaurea* L. subsp. *virgaurea*, *Heteropappus altaicus* (Willd.) Novopokr. y *Heteropappus biennis* (Ldb.) Tamamsch, frente a cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*, utilizando un ensayo de micro-dilución. A su vez se encontró que la acción antifúngica puede verse influida por la variación de las unidades de glúcidos unidos eterglucosídicamente en C-3, a su vez por la unión del oligosacárido a la aglicona, mediante el C-28 (enlace acilglucosídico).

Tsuzukil (2007), investigó sobre la “Actividad antifúngica de los extractos y saponinas de *Sapindus saponaria* L.”, para determinar su actividad antifúngica contra aislados clínicos de levaduras de *Candida albicans* y otras, de secreciones vaginales de mujeres con candidiasis vulvovaginal. Se usaron cuatro aislados clínicos de *C. albicans* y un único aislado clínico de cada una de las especies *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y la cepa de *C. albicans* ATCC 90028. El extracto hidroalcohólico fue dirigido contra un aislado clínico de *C. parapsilosis* y mostró una fuerte actividad. El extracto de n-BuOH y una fracción exhibieron una fuerte actividad contra todos los aislamientos probados. La cromatografía en columna adicional sobre la separación de gel de sílice de esta fracción encontró dos saponinas acetiladas triterpénicas puras (3-O- (4-acetil-bD-xilopiranosil) - (1→3) -a-L-rhamnopiranosil- (1→2) -a-L- arabinopiranosil-hederagenina y 3-O- (3,4-di-acetil-bD-xilopiranosil) - (1→3) -a-L-rhamnopiranosil- (1→2) -a-L-arabynopiranosil-hederagenina). Las saponinas aisladas revelaron una fuerte actividad contra *C. parapsilosis*. Cabe resaltar que el extracto hidroalcohólico de *Sapindus saponaria* enfrentado a *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* originó un resultado no determinado.

Pardo (2011), realizó una investigación sobre la “Determinación de la actividad antifúngica de extractos de *Lantana camara* frente a *Candida* sp.”, en donde obtuvo fracciones de flavonoides con actividad antifúngica. Dicha actividad se evaluó frente a *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* y un aislamiento primario de *Candida albicans*. La metodología utilizada fue la observación de las curvas de crecimiento a 600 nm en suero humano. La fracción 2 (fracción del tallo) tuvo actividad frente a *Candida albicans* (aislamiento primario y cepa de referencia).

Cabe resaltar que algunas fracciones incrementaron el desarrollo de algunas especies de *Candida*.

Herrera (2014), investigó sobre la actividad antimicrobiana, antioxidante y antitopoisomerasa de los siguientes compuestos: cuatro triterpenos tipo oleano (2-5), triterpeno tipo baccarano (1) y saponinas bidesmódicas tipo oleano (6-17). Lo fundamental de esta investigación, es que se observó la actividad antimicrobiana por parte óxido de baccharis 1 al enfrentarse a *Candida albicans*, el cual arrojó una zona de inhibición en milímetros de 20.55 ± 0.92 , a su vez el ácido poligalácico 4 y las saponinas bidesmódicas 6, 7, 15 y 16 también inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* con una zona de inhibición en milímetros de 13.50 ± 0.71 ; 11.00 ± 0.00 ; 8.50 ± 0.71 ; 11.70 ± 0.14 ; 10.50 ± 0.71 , respectivamente.

Dentro de la revisión bibliográfica, también se encontraron algunas investigaciones que concuerdan con la primera fase de la metodología de nuestra investigación, la cual corresponde a la obtención y la posterior extracción de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd, algunas de estas son:

Monje (2006), realizó la "Determinación de la saponina total en quinua (*Chenopodium quinoa*) por el método espectrofotométrico", en donde extrajo saponina con la utilización de una mezcla de etanol (50%) y la posterior filtración al vacío. A su vez proporcionó coloración a la solución de saponina total obtenida, mediante la mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico (1:5). Concluyó que la máxima absorción se encuentra a 528 nm y la concentración final de las muestras, se encuentran en el rango de 0.18% (variedad 2) a 5.01% (variedad 8).

Lozano (2012), investigó sobre la "Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd", en la cual concluyó que el porcentaje de rendimiento de la metodología utilizada se encuentra en el rango de 36% a 39.4% (p/p), el porcentaje de saponinas presentes en el extracto es de 47.3% a 56.2% y el porcentaje de saponinas en el mojuelo es de 17.3% a 22.1%. La mejor combinación de extracción de muestra/volumen es de 1/9, la mezcla de EtOH/H₂O más óptima para la extracción es de 50/50, mientras que el mejor tiempo de extracción es de 72 horas. Finalmente observó que no hay una diferencia

significativa entre los tres métodos que utilizó, pero el método de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), es superior y debería utilizarse como un controlador para los otros métodos (espectrofotométrico y de espuma), a su vez indicó, que es de vital importancia la utilización de una saponina estándar, para la evaluación con cualquiera de los métodos.

A nivel local

Huamán (2018), estudió la forma de extracción hidroalcohólica de las saponinas, de quinua (*Chenopodium quinoa*) (variedad Pasankalla), utilizando mezclas de etanol y agua, la extracción se realizó con la ayuda del equipo de Soxhlet. Concluyó que la mejor extracción de saponina se da bajo los siguientes parámetros: Menor dimensión de partícula (diámetro medio < 200 Rm), relación solvente/muestra de 20mL/1 g de mojuelo y relación etanol/agua del 50%. Lo que arrojó un rendimiento de extracción de 75.75%. Cabe denotar que el porcentaje de alcohol del solvente posee un efecto significativo sobre el rendimiento de la extracción.

Pérez (2019), investigó sobre el “Efecto antimicótico de un jabón elaborado a base del extracto acuoso de los granos de *Chenopodium quinoa* (quinua) frente a *Candida albicans*”. Para lo cual utilizó el método de pozos en agar (medio Sabouraud), repitiendo por tres veces y con un grupo control positivo (Nistatina). Concluyó que el jabón, tuvo una mejor inhibición de *Candida albicans* a una concentración de 25 % (halo de 15.8 mm: sensible), en contraste a la concentración 15 % (12 mm), todo ello, en comparación al grupo control positivo (Nistatina) (halo de 15 mm), con lo cual demostró un efecto significativo del jabón a base de *Chenopodium quinoa* Willd frente a *Candida albicans*.

2.2. Marco conceptual

a) Saponina

Las saponinas son consideradas metabolitos secundarios, estructuralmente pueden estar conformadas por un anillo terpenoide o un anillo esteroidal (aglicona o sapogenina), poseen un carácter anfílico debido a la sustitución por oligosacáridos mediante enlaces glucosídicos. Se dividen según el número de reemplazos en: agliconas monoglicosiladas, diglicosiladas y triglicosiladas

(llamadas también: monodesmosídicas, didesmosídicas y tridesmosídicas) (Ahumada *et al.*, 2016).

b) Metabolitos secundarios

Son moléculas de bajo peso molecular sintetizadas por las plantas, producidas mediante el metabolismo secundario, varían según al grupo taxonómico al que pertenece la planta que los produce. Los metabolitos secundarios poseen diversas propiedades biológicas, funciones ecológicas y son utilizadas como fármacos, herbicidas, colorantes, insecticidas, perfumes y otros. Se les conoce también como productos naturales (Avalos *et al.*, 2017).

c) Actividad antimicótica

La actividad antimicótica es la capacidad de una sustancia de prevenir el crecimiento de hongos o de provocar su posterior muerte. Los hongos pueden producir un conjunto de enfermedades al ser humano, para lo cual se utiliza los compuestos antimicóticos como tratamiento para dichas enfermedades (Alenfermeria, 2010).

d) Extracto hidroalcohólico

Es aquella sustancia muy concentrada, es decir, la fracción no volátil que contiene los principios activos de las plantas. Algunos principios activos poseen la característica de no ser volatilizables (la temperatura los inestabiliza), por lo tanto, no pueden ser obtenidos mediante una destilación simple, para lo cual se recurre a la ayuda de un solvente (alcohol etílico), el cual disuelva a las sustancias activas molecularmente afines a la planta con que se está trabajando (Camacho, 2011).

e) *Candida albicans*

Pertenece al Phylum Ascomycota, es un hongo dimórfico, poseedor de blastoconidios esféricos, hifas y pseudohifas. Normalmente se encuentra relacionada a animales de sangre caliente, en el ser humano, se le encuentra colonizando la vagina, el tracto digestivo y el sistema respiratorio, además, que también puede colonizar las uñas, piel y membranas mucosas. Se puede observar un cuadro más complicado de la infección por *Candida albicans* en pacientes inmunosuprimidos (Vircell, 2018).

f) Cepas ATCC

Son microorganismos certificados, que se utilizan para controlar la calidad en microbiología. Pueden dividirse en función a su uso, en: de referencia (obtenidos a partir de una colección certificada), de trabajo (obtenidos a partir de los cultivos de las cepas de referencia) y de reserva (cepas idénticas obtenidas a partir de un subcultivo de las cepas de referencia) (TC Metrología, 2015).

g) *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”

La quinua es una planta dicotiledónea, que posee hojas anchas, es de desarrollo anual y puede alcanzar de 1 a 2 m de altura. El tallo central posee hojas quebradizas o lobuladas, pero depende de la variedad y de la densidad del sembrado para que pueda poseer ramas. La raíz principal puede alcanzar una longitud de 20 a 25 cm. Las panojas se encuentran localizadas en la parte superior de la planta y a veces en el tallo. El fruto mide aproximadamente 2mm (diámetro) y es seco. Las flores son bisexuales, auto fertilizantes, pequeñas y no poseen pétalos. Las semillas principalmente lisas, pueden ser de los siguientes colores: blanco, naranja, rosado, marrón, rojo y negro; el 60% del peso de la semilla lo constituye el embrión, el cual se encuentra formando un anillo alrededor del endospermo (MINAGRI, 2014).

h) Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es la concentración más baja (en µg/mL) de un antibiótico o sustancia que inhibe el crecimiento de una determinada cepa microbiana (IDEXX Laboratorios, 2018).

i) Concentración mínima fungicida (CMF)

Es el agente, también denominado solución, que en presencia del inóculo de un subcultivo puro de un hongo, reduce un 99.9% el desarrollo de este (Neyra *et al.*, 2018).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)

A. Identificación taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Chenopodium quinoa* Willd (Anexo 2).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta

Clase	Magnoliopsida
Sub Clase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Género	<i>Chenopodium</i>
Especie	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd
N.V.	Quinua

En el Perú, existen alrededor de tres mil ecotipos de *Chenopodium quinoa* Willd, de las cuales el INIA conserva el material genético de dos mil ecotipos, algunas de ellas son: INIA 427 – Amarilla Sacaca, Ayacuchana INIA, INIA 415 – Pasankalla, INIA 420 - Negra Collana, INIA 431 – Altiplano, Illpa INIA, Amarilla Marangani, Blanca de Juli, Cheweca, Quillahuaman INIA, Salcedo INIA, Blanca de Junín, Huancayo, Rosada de Yanamango, Hualhuas, Rosada Taraco, Kankolla, Rosada de Junín, Huacariz y Mantaro (Puentes, 2007; MINAGRI, 2014).

B. Descripción botánica

La quinua es una planta que posee características singulares (conducta en zonas agroecológicas, coloración y morfología), es adaptable a cualquier medio en el que se cultiva (nivel del mar – 4000 msnm) y tolera condiciones climáticas adversas (sequías, suelos salinos, friaje y otros). Se le considera una planta anual herbácea. La capacidad adaptativa de la quinua es muy alta, tal es así, que puede tolerar suelos ácidos (pH 4.5), suelos alcalinos (pH 9), precipitaciones (200-280 ml anual), suelos arenosos, suelos arcillosos, entre otros. Posee un periodo vegetativo de 90-240 días. El color de la planta de la quinua varía según las etapas fenológicas y el genotipo, adquiriendo colores como el verde, rojo, púrpura oscuro, amarillo, anaranjado granate, entre otros (Ip., Soluciones corporativas, 2020).



Figura 1. Características botánicas de *Chenopodium quinoa* “quinua” (Ip., Soluciones corporativas, 2020).

C. Características físicas y químicas

La quinua contiene un conjunto de sustancias que le otorgan propiedades distintas, estas son: fitonutrientes, antioxidantes (ferúlico, cumárico, hidroxibenzoico, y ácido vinílico), flavonoides, betacianina, fitonutrientes antiinflamatorios (ácido alfa-linolénico o ALA, y omega-3), saponinas y proteínas (Puentes, 2007).

Dentro del epispermo, comúnmente llamado cáscara, se localiza a la saponina de la quinua, la cual posee un sabor amargo y actividad hemolítica, por lo que es considerado como un factor antinutricional. La concentración de saponina varía según el método de obtención, granos escarificados, granos no escarificados y por la variedad (Puentes, 2007).

2.3.2. Las saponinas

Las saponinas contienen un núcleo lipofílico, que puede tener estructura triterpenoide o esteroideal y además posee una o varias cadenas de hidratos de carbono. El otro nombre que recibe el núcleo lipofílico es aglicón, debido a que es un grupo que se encuentra unido a un átomo de carbono, el cual puede estar unido a un oxígeno, dos oxígenos o a otro heteroátomo (nitrógeno). Las saponinas por lo general se conforman de carbono, hidrógeno y oxígeno, dentro de su constitución, por lo que se les denomina sustancias terciarias (Figura 2) (Mujica, 2007).

Existen dos tipos de saponinas: triterpenoides (consideradas como ácidas) y esteroides (consideradas como neutras), esto de acuerdo a la conformación del grupo aglicón, sapogenina o genina (Anaya, 2013).

A fin de constituir un acetal, ocurre lo siguiente: “El aglicón proporciona un grupo hidroxilo, un derivado que surge de la reacción entre un grupo funcional cetona o un aldehído, y dos moléculas de alcohol, con la pérdida de una molécula de agua” (Rodríguez , 2017, p. 11). Los hidratos de carbono que se enlazan al aglicón, deben configurarse como hemiacetal (Rodríguez , 2017).

Los carbohidratos también se pueden unir mediante una función éster. Dependiendo del número de cadenas de azúcares que contenga la molécula, se aplican los términos monodesmósido, bidesmósido y tridesmósido, para una, dos y tres cadenas respectivamente (en griego “desmos” quiere decir cadena) (Anaya, 2013).

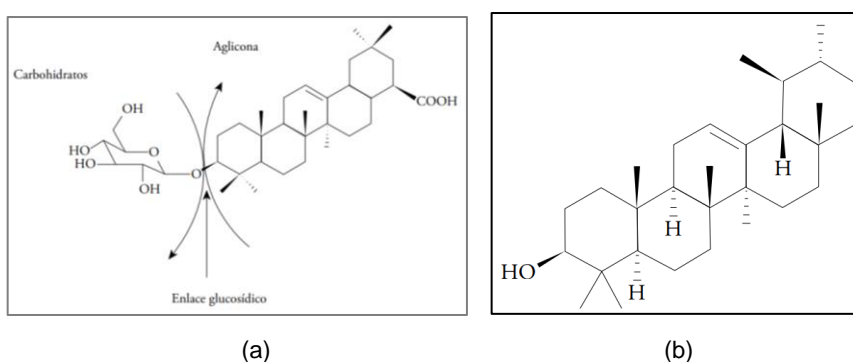


Figura 2. Estructura general de una saponina (a). Estructura de la β -amirina, esqueleto base de las saponinas (b) (Kuljanabhagavad, 2009).

Se le denomina saponinas, debido a sus características parecidas a la de un jabón, estas se encuentran conformadas por: estructura triterpenoide o esteroide (soluble en lípidos) y un azúcar (soluble en agua) (Ahumada *et al.*, 2016).

Las características generales de las saponinas que ayudan en su identificación son: generación de espuma en solución acuosa al ser agitadas, producción de hemólisis de los eritrocitos (algunas de ellas), generación de parálisis branquial en

los peces (índice de pez), prueba de Liebermann- Burchard positiva (Jove *et al.*, 2021).

Las saponinas son tóxicas, esta característica es considerada como un mecanismo de defensa para la propia planta, la toxicidad procede de la capacidad configurativa con los esteroides, esto podría originar un proceso de lisis en la membrana celular después de ingresar al torrente sanguíneo (falla asimilativa por el sistema digestivo). Algunas plantas que poseen saponinas son: quinua, *Tribulus terrestris*, yuca, quillay y el ginseng (Ahumada *et al.*, 2016).

El sabor amargo de los granos de quinua proviene de la presencia de saponinas triterpénicas, lo que conlleva que para el consumo de las mismas se tenga que recurrir a procedimientos de remoción, los cuales pueden ser: secos, mixtos o húmedos. Según la cantidad de saponina presente en las distintas variedades de quinua, se pueden distinguir a la variedad dulce que contiene < 0,11 % de saponina y la variedad amarga > 0,11 % de saponina (Gee *et al.*, 1993).

A. Las Saponinas triterpenoides

Se define a las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd como glucósidos triterpenoidales, ubicados en el pericarpio de las semillas y que solubles en metanol y agua (Ramiro, 2017).

Dentro de la categoría de saponinas compuestas, podemos hallar a las saponinas triterpenoides. La composición de los triterpenos radica en una configuración de 4-5 anillos, 30 átomos de carbono enlazado con varios oxígenos (Ahumada *et al.*, 2016).

Dentro de los granos de quinua se han logrado identificar 4 estructuras de agliconas primordiales: hederagenina, ácido serjánico (30-O-methylspergulenato), ácido oleanólico y ácido fitolacagénico. Los hidratos de carbono identificados son: arabinosa, galactosa y glucosa. De la planta de *Chenopodium quinoa* se han logrado aislar 20 saponinas triterpénicas, presentes en la cubierta de las semillas, semilla, flores y frutos (Gianna, 2013).

Una de las propiedades de la saponina es su actividad hemolizante frente a los hematíes y también su toxicidad elevada para los animales (sangre fría) (Gianna, 2013).

B. Saponinas esteroidales

Dentro de la estructura de las saponinas esteroidales podemos identificar al núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica formada por unidades de monosacáridos (Guerra, 2015).

Las saponinas esteroidales se encuentran presentes en muchas familias de plantas, especialmente en la familia Agavaceae. Estas sustancias poseen como característica principal la capacidad de formar espuma en presencia de soluciones acuosas, propiedad hemolítica, toxicidad frente a los peces y creación de compuestos con el colesterol (Guerra, 2015).

2.3.3. Factores que afectan el contenido de saponinas en las plantas

Debido al carácter de metabolitos secundarios de las saponinas, su contenido en las plantas depende de muchos factores, algunos de ellos son:

A. La propia planta. Las saponinas triterpenoides están presentes primordialmente en las plantas dicotiledóneas, como los miembros de la familia Leguminosae, pero también se han encontrado en algunas monocotiledóneas. En las plantas monocotiledóneas podemos observar principalmente a las saponinas esteroidales (García, 2010).

B. La edad del vegetal. En una misma especie por lo general las plantas jóvenes poseen más saponinas que las plantas adultas (García, 2010).

C. La fase de crecimiento. Durante la fase reproductiva se pueden observar variaciones considerables en las distintas partes de las plantas, donde los contenidos más altos están principalmente en los órganos reproductivos (flores, semillas) o en raíces laterales (García, 2010).

D. La ubicación geográfica de la planta. Dependiendo de la ubicación la planta puede estar sometida a un tipo determinado de estrés ambiental. En zonas secas

las plantas al no recibir la cantidad suficiente de agua, no producen la misma cantidad de saponinas en comparación a otras que no están sometidas al mismo estrés hídrico (García, 2010).

2.3.4. Las saponinas de la quinua

En los últimos 30 años se han aislado cerca de 40 tipos de estructuras de saponina proveniente de *Chenopodium quinoa* Willd (Khadija *et al.*, 2020). Configurativamente son complejos provenientes de la β -amirina (Figura 2). La saponinas de la quinua se encuentran constituidas por una mezcla de glucósidos triterpénicos derivados del ácido oleanólico, hederagenina, ácido fitolacagénico, ácido deoxifitolacagénico, ácido serjanico, y ácido $3\beta,23,30$ -trihidroxi olean-12-eno-28-oico, con los grupos hidroxilo y carboxilato en el C-3 y C-28 (Kuljanabhagavad, 2009). Dentro de la complejidad de las saponinas, se forman enlaces glucosídicos con: glucosa, ácido glucurónico, arabinosa, galactosa, ramnosa (excepción: metilpentosa) y xilosa (Madl, 2006).

2.3.5. Bioactividad de las saponinas de la quinua

La literatura documenta muchas propiedades atribuidas a las saponinas de la quinua, entre ellas están: “actividad hemolítica, antiadipogénica, inmunoadyuvante, citotóxica, antifúngica, antiinflamatoria, hipocolesterolémica, surfactante, antioxidante y molusquicida” (Hernández, 2014, p. 7). A continuación se detalla las propiedades biológicas de la saponina pertinentes a esta investigación.

A. Actividad antifúngica

Se entiende por antifúngico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte. Según indagaciones, se observó que la actividad antifúngica de las agliconas es mejor que el de las saponinas, esto se puede explicar porque: “hay una influencia por el grupo funcional de los esqueletos de aglicona” (Kuljanabhagavad *et al.*, 2009, p. 485).

En la posición del C-3 se encuentra un oligosacárido que toma un papel vital en el desempeño de la actividad antifúngica, así como también en la permeabilización (Kuljanabhagavad, 2009).

Stuardo et al., investigaron y probaron la actividad antifúngica de la saponina (procedentes de la quinua, puros, crudos y con álcali; con o sin incubación térmica) frente a *Botrytis cinerea*. Concluyendo que el tratamiento alcalino fue mejor que el tratamiento normal, a una dosis de 5 mg/mL (saponina), el cual inhibió el 100% de la germinación conidial (hasta pasada las 96 h / 20°C). A su vez, ensayos de tinción manifestaron un rompimiento de la membrana fúngica, en aquellos hongos tratados con solución alcalina, los hongos que fueron expuestos al tratamiento con saponinas sin solución alcalina, permanecieron intactos (Ahumada *et al.*, 2016).

Bibliografía consultada, reporta un conjunto de saponinas utilizadas como agentes protectores de las plantas (papa y tomate) frente a enfermedades originadas por hongos (*Taphrina sp.*, *T. deformans* y *Venturiaceae*) y bacterias (Ahumada *et al.*, 2016).

C. Actividad hemolítica

La determinación hemolítica se realiza para aquellos compuestos que son candidatos a nuevos fármacos que pueden atravesar la membrana celular e interactuar con la hemoglobina. Las agliconas presentes en la saponina generan alteración en la membrana celular (permeabilidad y fluidez), debido a que poseen una atracción por la parte lipídica, los hidratos de carbono y las glicoproteínas que conforman a la membrana. Las saponinas monoglicosiladas poseen un mayor efecto sobre la membrana celular (rompimiento) en comparación con las saponinas diglicosiladas y triglicosiladas, esta diferencia, se debe sobre todo, a la limitación estérica que poseen estos últimos componentes en su estructura (Kuljanabhagavad, 2009).

La actividad hemolítica de las saponinas se ha reportado en glóbulos rojos, células de animales, bacterias y hongos. Las saponinas monoglicosiladas poseen una mayor facilidad de formar micelas y provocar el rompimiento celular. A su vez, se conoce que: “el número, tipo de monosacáridos y la presencia de los grupos hidroxilo o carboxilo sobre el anillo E esteroideal son determinantes en el aumento o disminución de la capacidad hemolítica” (Ahumada *et al.*, 2016, p.454).

Esto se debe, a la configuración tridimensional que posee cada estructura, el cual ayuda a una mejor interacción de la aglicona (saponina) y el colesterol (membrana

celular), lo que desemboca en el rompimiento de la membrana y la posterior liberación de la hemoglobina (Ahumada *et al.*, 2016).

La forma exacta en la que se lleva la actividad hemolítica es aún desconocida. Pero se puede atribuir al carácter anfílico de la saponina (estructura) (Verza, 2012).

Investigaciones realizadas por Woldemichael *et al.* (2001), demostraron la actividad hemolítica de la saponina bidesmosídica (ácido 3-O- β -glucuronopiranosil oleanólico 28-O- β -glucopiranosil éster) a 260 $\mu\text{g/mL}$ (actividad hemolítica débil).

2.3.6. Mecanismo de acción de las saponinas frente a *Candida albicans*

Mediante la investigación realizada por Herrera *et al.*, (2007), se pudo evidenciar los cambios ultraestructurales de *Candida* originados por SC-2 (saponina de *Solanum chrysotrichum*), los cuales fueron:

- Daño en la membrana citoplásmica y orgánulos.
- Cambios en la morfología y densidad de la pared celular, con separación de la membrana citoplasmática de la pared celular y desintegración de esta última.
- Degradación total de componentes celulares y muerte. Los cambios se manifestaron a partir de las 6 h de incubación, alcanzando su efecto máximo a las 48 h. La SC-2, posee un efecto detergente que disminuye la tensión superficial, causando daño a la pared celular y desintegración de las células fúngicas (Herrera *et al.*, 2007).

2.3.7. *Candida albicans*

A. Identificación taxonómica

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Candida albicans*.

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Ascomycotina
Clase	Ascomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>

Especie	<i>Candida albicans</i>
---------	-------------------------

Fuente: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Existen otros tipos de especies de *Candida*, las cuales son: *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* (Instituto Nacional de Salud, 2017).

B. Características

Se considera como un hongo dimórfico, debido a que se desarrolla como levadura (37°C, huésped) o como hongo filamentoso (25°C, naturaleza). Integra el Phylum Ascomycota, de reproducción asexual (gemación). Cuando se presenta en forma de levadura, posee un aspecto de células ovaladas o redondas (3-8 x 2-7 micras aproximadamente), asociadas en grupos pequeños, por el contrario, cuando se presenta en la forma de hongo filamentoso, se pueden apreciar células alargadas y adoptando el aspecto de pseudohifas, pseudomicelios o filamentos (INSST, 2012).

Tiene la capacidad de eludir los mecanismos de defensa del hospedero debido a su dimorfismo. Puede comportarse como saprófita (simbiosis con el hospedero), cuando se encuentra en forma de levadura, mientras que también se puede comportar como parásito patógeno (afectando al hospedero) cuando se encuentra en forma de hongo filamentoso. Forma colonias blancas, cremosas, blandas y lisas cuando crece en medio de agar Sabouraud (INSST, 2012).

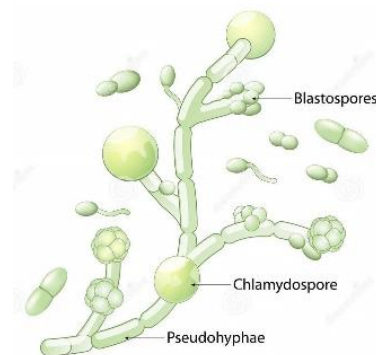


Figura 3. Estructura de *Candida albicans* (INSST, 2012).

C. Estructura antigénica

Se pueden distinguir dos tipos de serotipos de *Candida albicans*: A (que incluye *Candida tropicalis*) y B; aunque existen otros tipos de antígenos, por ejemplo: “proteasas secretadas, enolasas inmunodominantes y proteínas de choque calórico” (Jawetz et al., 2014).

D. Patogenicidad de *Candida albicans*

Candida albicans (levadura comensal) puede encontrarse colonizando las mucosas de los seres humanos y de los animales (sangre caliente), específicamente en la cavidad oral, urogenital y tracto gastrointestinal. Puede convertirse en patógeno debido a la modificación del equilibrio del sistema inmunológico (hospedero) y la microbiota, por lo que se le considera como un patógeno oportunista. Depende del estado fisiológico del ser humano u otro hospedador para que se conviertan las levaduras comensales en levaduras patógenas, provocando infecciones. *Candida albicans* tiene una alta capacidad de adaptación, sobreviviendo a distintos entornos con diferentes presiones del medio ambiente, por lo que genera una mayor diseminación e incidencia de enfermedades producidas por esta especie (Lopez, 2001).

Se denomina candidiasis, a la infección ocasionada por las distintas especies del género *Candida*, como son: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, y *Candida lusitaniae*. También son consideradas otras especies como: *Issatchenkia orientalis*, *Pichia guillermondii* y *Debariomyces hanseii* (Lopez, 2001).

E. Factores de virulencia

Con respecto a los factores de virulencia, se puede indicar que: “Las interacciones del hongo con el hospedador son críticas para determinar la evolución hacia un proceso infectivo, siendo determinantes los mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia del hospedador” (Laforet, 2009).

El estado inmunológico del hospedador determina la habilidad patogénica del género *Candida*, ya que cuenta con un conjunto de características que le brindan esta capacidad. En la relación patogénica hongo-hospedador, confluyen un conjunto de determinantes fúngicas de virulencia que se enfrentan a las barreras

y a la cadena de respuesta inmunológica del hospedero. Dentro de los diferentes estadios de infección se encuentran múltiples factores de virulencia. En cada etapa de la infección por el hongo (colonización o invasión), son distintos los requerimientos en cuanto a las características biológicas, que necesita el hongo para desarrollarse. En el proceso infeccioso por *Candida*, podemos señalar principalmente a los siguientes factores de virulencia: “receptores y moléculas implicadas en la adhesión al hospedador o a catéteres, la secreción de enzimas hidrolíticas, variabilidad antigénica, cambios fenotípicos y el dimorfismo” (Laforet, 2009, p. 9).

F. Adhesión

Para el éxito durante el proceso de infección y colonización, es necesario que ocurra el reconocimiento específico y adhesión a las células del huésped. Hasta la actualidad se han descrito algunos receptores fúngicos (naturaleza manoproteica), que se encuentran en la superficie del hongo y que se unen a los ligandos específicos del hospedero, estos son: “proteínas de matriz extracelular y moléculas superficiales de células epiteliales y endoteliales” (Laforet, 2009, p.11).

G. Viabilidad, propagación y transmisión

El sujeto de reserva es el ser humano, específicamente en la cavidad oral, piel, tracto gastrointestinal, sistema genitourinario y las deposiciones (Laforet, 2009).

H. Candidiasis

Es aquella infección superficial que afecta a las personas con el sistema inmunológico bajo, específicamente a las mucosas (oral, digestiva o genitourinaria), piel (intertrigo) y las uñas (perionixis o paroniquia). Los síntomas frecuentes en personas con esta infección son: picazón, enrojecimiento y malestar. La infección se puede volver sistémica en pacientes con SIDA, personas con cáncer o trasplantes, que de no tratarse a tiempo podría llegar a ser mortal. Hasta la actualidad se conoce los siguientes tipos de candidiasis: cutánea y de mucosas, sistémica y mucocutánea crónica (Laforet, 2009).

2.3.8. Cepas ATCC

Se denomina cepas ATCC a aquel material biológico que posee referencia certificada. Es decir, se asegura que la cepa proporcionada es un cultivo puro y

que ha pasado satisfactoriamente las pruebas correspondientes (morfológicas, bioquímicas y moleculares). Se trata de microorganismos identificados, de origen conocido, caracterizados y catalogados. La sigla ATCC significa: Cepas de Colección de Tipo Americano (*American Type Culture Collection*). Las cepas ATCC se utilizan para validar metodologías microbiológicas (evaluación de sensibilidad), evaluación de la calidad de los medios de cultivo y aseguramiento de la calidad de los procedimientos de laboratorio (Técnicas de control metrológico S.L., 2019).

2.3.9. Determinación de la actividad antimicótica

A. Halo de inhibición

Es la zona que se forma alrededor del disco, que contiene el antibiótico, en donde no existe crecimiento del microorganismo en cuestión, dicho procedimiento se realiza en una placa de agar. También se puede definir como la respuesta (potencia) del antibiótico al ser enfrentado a un determinado microorganismo. En donde, una vez inoculado el microorganismo y colocado los discos, se procede a realizar la medición del halo de inhibición, por la parte posterior de la placa, para finalmente determinar la sensibilidad del microorganismo a dicho antibiótico (García, 2017).

El halo de inhibición formado (tamaño) varía según las siguientes variables (parámetros): concentración de la droga, sensibilidad bacteriana, coeficiente de difusión de la droga, tiempo, temperatura de incubación, pH, composición del medio y tamaño del inóculo (García, 2017).

Existen tres categorías de interpretación cuando se realiza un antibiograma, estas son: sensible, intermedio y resistente. La primera de ellas, hace referencia, a que existe una gran zona de inhibición, producida por el antibiótico. La segunda categoría, nos indica que el halo formado es menor o más reducido y la última, que no se ha formado el halo de inhibición o la medida es demasiado pequeña (García, 2017).

B. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se considera como CMI, a la mínima concentración de una serie de diluciones (antibiótico) que inhibe el desarrollo bacteriano (simple vista). Se utiliza para

evaluar el nivel de sensibilidad de una bacteria (otro microorganismo) enfrentada a un antibiótico. También se puede considerar como el estimado principal que se toma como referencia para establecer distintos niveles de actividad del antibiótico probado, en presencia de la bacteria en cuestión (García, 2017).

Dentro del laboratorio, se maneja un conjunto de metodologías para determinar la concentración mínima inhibitoria, algunas de ellas son: manuales, automatizadas y semiautomatizadas. Dichas metodologías nos permiten clasificar a una cepa bacteriana, de acuerdo a su sensibilidad (presencia del antibiótico probado) en: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R) (García, 2017).

Según el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), se clasifica a una cepa bacteriana, dependiendo de su sensibilidad frente al antibiótico, en:

- Sensible: cuando hay mayor probabilidad de éxito de un tratamiento, a la dosis normal.
- Resistente: cuando no existe o es muy pequeña la probabilidad de éxito frente al tratamiento.
- Intermedia: Cuando el éxito del tratamiento es fortuito, es decir, solo se puede lograr bajo ciertos parámetros (mayores concentraciones administradas localmente o aumento de la dosis) (García, 2017).

C. Concentración Mínima Fungicida

Se denomina concentración mínima fungicida (CMF) al: “agente o solución que disminuye en 99.9 % el crecimiento del hongo a partir de un inóculo de subcultivo puro” (Neyra *et al.*, 2018).

D. Fluconazol

D.1. Características y mecanismo de acción

Se considera como una alternativa en el tratamiento de las infecciones fúngicas, es un complejo triazólico, actúa inhibiendo la enzima lanosterol 14- α demetilasa en el complejo citocromo P- 450 (hongo), inhibe la conversión a ergosterol (a partir de lanosterol) y la posterior reducción del mismo, con la conjunta acumulación de los precursores y la destrucción de la membrana del hongo. Se conoce que los imidazoles y los triazoles (escala variable) se relacionan con el complejo P – 450

de los seres humanos, estimulando la ocurrencia de obstrucciones metabólicas con fármacos metabolizados u otras hormonas, que se encuentran en este mismo sistema (Fica, 2004).

D.2. Microbiología

Se utiliza al fluconazol para la inhibición de los siguientes microorganismos patógenos: "*Blastomyces dermatitidis*, *Candida* spp. (excepto *C. krusei* y *C. glabrata*), *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton* spp, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium* spp. y *Trichophyton* spp" (Fica, 2004).

D.3. Farmacocinética

El tiempo de absorción del Fluconazol es de dos horas. No se interfiere significativamente con la biodisponibilidad por el ingreso acompañado de alimentos o la utilización de ranitidina (antagonistas H₂). La concentración plasmática (parecida a concentración del esputo, saliva y fluido vaginal) del fluconazol es diez veces menor que la concentración en orina y la piel (dosis estándar de 100 mg a 400 mg/día). En cuanto a la eliminación (vida media) del Fluconazol, se continúa con una cinética de orden cero, el 90% de la eliminación del fluconazol se hace a través de la orina y el sudor, el otro 10%, es a través del metabolismo. Se corre el riesgo de sobredosis en aquellos pacientes que sufren función renal impar o que consumen warfarina (Fica, 2004).

D.4. Uso clínico

Puede ser utilizado en aquellas infecciones, en donde otros antifúngicos, no dieron buenos resultados, tales como: candidiasis (razas susceptibles de *Candida*), *Tinea corporis*, *Tinea cruris* o *Tinea pedis*, Onicomycosis y meningitis criptocócida. También se puede utilizar como antifúngico de primera línea en: Coccidioidomycosis, Criptococosis, Histoplasmosis, profilaxis de candidiasis en sujetos inmunocomprometidos (Fica, 2004).

D.6. Resistencia de levaduras del género *Candida* al Fluconazol

El desarrollo de la resistencia se da por tres mecanismos:

1. Transformación del enzima blanco.

2. Limitado o nulo alcance de la concentración conveniente del antibiótico (sitio de acción), debido a la existencia del sistema de bombeo activo y las barreras de permeabilidad.

3. Modificación del antibiótico (inactivación) (Gómez, 2018).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

3.1.1. Ubicación política

Región: Ayacucho

Provincia: Huamanga

Los lugares de recolección de muestras y centro de análisis, fueron:

- Lugar de recolección de material biológico: distrito de Chiara.
- Laboratorio de Bioquímica, ubicado en la Unidad de Laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria - UNSCH.

3.1.2. Ubicación geográfica

Laboratorio de Bioquímica. Unidad de los Laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria - UNSCH. (Coordenadas UTM: 584425.95 m E; 8546618.55 m S; 2791 msnm).

Distrito de Chiara, Provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho (13°52'05"S 73°40'03"O).

3.2. Unidad de análisis

10 kilogramos de granos de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" (accesión amarilla).

3.2.1. Muestra biológica

Cepa de *Candida albicans* ATCC 90028, repicada en medio Agar Sabouraud.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Recolección y preservación del material biológico

La recolección de los granos de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” (accesión amarilla), fue realizada en horas de la mañana. Los granos recolectados, fueron secados sobre papel, limpiados de otros contaminantes visibles (espinas, restos vegetales, otros.) y almacenados en frascos de vidrio hasta su uso. Todo ello realizado en un ambiente limpio y con buena ventilación.

3.3.2. Ensayos preliminares:

Se vertió una pequeña cantidad de semillas (3 g aprox.) a un tubo de ensayo, adicionando agua, se agitó por 2 min. Se confirmó la presencia de saponina con la formación de espuma abundante.

3.3.3. Extracción de saponinas:

Se usó el método descrito por Harinder P, Siddhuraju y Klaus B. (2010) con las modificaciones adecuadas.

A. Secado y pesado. Se secó las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd (accesión amarilla) en un horno a 40°C x 24 h. Luego se realizó la molienda en un mortero de porcelana hasta pulverizarlas y se pesó 60 g en una balanza simple.

B. Primera extracción. Se realizó con 600 mL de solución Et-OH: H₂O (7.0:3.0) x 30 min con agitación continua en rotavapor. A continuación, se filtró la muestra, utilizando papel filtro.

C. Segunda extracción. La muestra se sometió a una segunda extracción con 300 mL de Et-OH: H₂O (7.0:3.0) x 30 min. Se volvió a filtrar, recepcionando en el mismo beaker, obteniendo un volumen final de 600 mL.

D. Concentración. Se concentró la muestra en un rotavapor Yamato BO410. Modelo: RE301, a una temperatura no mayor de 45°C, hasta un volumen final de 300 mL.

E. Eliminación de lípidos. La muestra se desengrasó con 100 mL de éter de petróleo, utilizando para tal fin una pera de separación. Se agitó vigorosamente por 30 min. Y se dejó reposar para ver la separación. Recepcionando solo la fase acuosa.

F. Eliminación de pigmentos. En una pera se agregó 100 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 60 min y dejó separar las dos fases por 24 horas. Se recuperó la fase acuosa en la cual se encuentran las saponinas. Seguido esto, se concentró en el rotavapor.

G. Extracción con N-butanol. Se reconstituyó la muestra con 60 mL de Et-OH: H₂O (7.0:3.0) y agregó 20 mL de N-butanol. Una vez realizada la extracción, se trasvasó a una placa Petri pesada y se concentró a sequedad en estufa modelo Labor Muszeripari, type: lp-303 y se halló el peso final de saponinas.

3.3.4. Determinación del porcentaje de rendimiento:

Se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso (g) del extracto}}{\text{Peso (g) de semillas}} \times 100$$

3.3.5. Caracterización cualitativa de saponinas

Prueba de Liebermann-Burchard

“Se tomó una pequeña cantidad de muestra de saponina y se añadió 2 mL de anhídrido acético, 2 mL de cloroformo y se enfrió a 0 °C. Se agregó 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado” (Valencia, 2017, p. 34). De presentarse una coloración rosada púrpura, es indicativo de la presencia de saponinas triterpénicas y azul verdoso es indicativo de la presencia de saponinas esteroidales (reacción positiva).

Prueba de Salkowski

“Se tomó una pequeña cantidad de muestra de saponina y se añadió 2 mL de cloroformo y 2 mL de ácido sulfúrico. Una coloración anaranjada indica reacción positiva, es decir, la presencia de grupos de esteroides” (Valencia, 2017, p. 34).

Prueba del α naftol

“En un tubo de ensayo se colocó una pequeña cantidad de muestra de saponina seco y se añadió 2 mL de etanol y 2 gotas de solución 0.1 % de α – naftol, y 2 mL de ácido sulfúrico (por la pared del tubo)” (Valencia, 2017, p. 34). Se considera como reacción positiva cuando en la interfase se forma un anillo de color violeta, indicativo de la presencia de azúcares.

3.3.6. Cuantificación de saponinas por el método colorimétrico

A. Reacción de Liebermann-Burchard (Curva espectral)

- El reactivo de Liebermann-Burchard (ácido sulfúrico concentrado: anhídrido acético concentrado, 5:1) se preparó midiendo el volumen necesario de ácido sulfúrico.
- Se tomó 1.0 mL de la solución de saponina y se le agregó lentamente 3.5 mL del reactivo de Liebermann-Burchard (preparado recientemente).
- La solución se agitó en un vórtex 3 seg. repitiendo a intervalos regulares durante 30 minutos, antes de los 50 minutos, se procedió a medir la absorbancia, desde 400 a 550 nm de longitud de onda, en el espectrofotómetro UV visible marca Thermofisher Scientific. Genesys 10SVIS.
- Finalmente se determinó la longitud de onda de la máxima absorción (λ max), que fue de 432 nm (Gianna, 2013).

B. Curva de calibración

- Se usó como patrón saponinas de *Quillaja saponaria* (Sigma®) purificadas tres veces por recristalización y secadas con vacío a 60°C.
- Se preparó la solución patrón concentrada (0.5 %) con mucha precisión y se disolvió en un matraz aforado con etanol al 96 %.
- A partir de la solución patrón se realizó diluciones con el mismo solvente. A 1.0 mL de estas diluciones se adicionó el reactivo de Liebermann-Burchard en relación 2:7 siguiendo el procedimiento antes detallado.
- Se midió la absorbancia a 432 nm entre los 30 y los 50 minutos. Con el conjunto de datos y utilizando Excel se realizó la gráfica y se obtuvo por correlación lineal la ecuación que relaciona la concentración de saponinas con la absorbancia (Gianna, 2013).

3.3.7. Determinación del índice hemolítico

A. Lavado de glóbulos rojos

Se extrajo 10 mL de muestra de sangre de una persona voluntaria, siguiendo todos los parámetros de bioseguridad, en un tubo con EDTA, se procedió a centrifugar por 5 min, después se descartó el plasma. Se añadió SSF al 9 % en el mismo volumen del paquete globular, se procedió a centrifugar por 5 minutos y se repitió

este procedimiento de lavado tres veces, enrazando cada vez con SSF hasta 10 mL.

Al finalizar se obtuvo los glóbulos rojos lavados, de los cuales se extrajo 2 mL y se añadió a una fiola de 100 mL y enrazó con SSF.

B. Preparación de solución de saponina (muestra)

Se pesó 0.1 g de muestra de saponina y se le añadió 10 mL de SSF, obteniendo una concentración final de 1 %.

C. Enfrentamiento de glóbulos rojos a la saponina

En 10 tubos de ensayo se colocó 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mL respectivamente de la solución de saponina preparada, se completó con SSF, hasta llegar a un volumen de 5 mL. Se adicionó 5 mL de la suspensión de glóbulos rojos, se homogenizó y se dejó en reposo por 24 h. Al tubo N° 11 solo se colocó 5 mL de SSF y 5 mL de la suspensión de glóbulos rojos, siendo este el control.

Se observó a partir de las 15 h, el tubo en el cual comenzó la hemólisis (color rojo tenue). En los tubos donde no hubo hemólisis los glóbulos rojos sedimentaron, quedando el líquido incoloro o ligeramente coloreado.

3.3.8. Determinación de la actividad antimicótica

Para la determinación de la actividad antimicótica del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinoa”, frente a *Candida albicans*, se utilizó el Método de Difusión de Pozos en Agar (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017; Picazo, 2010).

A. Preparación de las concentraciones hidroalcohólicas de saponinas

Se pesó 5 mg de saponina extraída de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinoa” por separado, luego se disolvió en 10 mL de agua destilada estéril, obteniéndose una concentración de 500 µg/mL. Luego se realizó las diversas diluciones (250 µg/mL, 50 µg/mL, 5 µg/mL), obteniendo al final cuatro concentraciones (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017).

B. Activación de la cepa

Se utilizó la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028, brindada por el Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho, la cual fue sembrada por estrías en una placa Petri conteniendo Agar Sabouraud Glucosado al 2%, a continuación se incubó a 37°C por 24 horas, de esta manera se obtuvo un cultivo joven (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017).

C. Preparación del inóculo

Se partió de las cepas jóvenes, en donde se preparó el inóculo, para esto se transfirió una asada de la levadura joven a un tubo conteniendo cloruro de sodio estéril (solución salina 0.85 %) hasta alcanzar la turbidez del estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017; Huashuayo, 2015).

D. Preparación del medio de cultivo

Se pesó 26 g de medio de cultivo Agar Sabouraud (Merck), se disolvió en 400 mL de agua destilada. Se llevó a calor hasta la formación de la solución transparente. Después se midió el pH y se ajustó hasta un pH óptimo 5.6 ± 0.2 , se esterilizó y se procedió a verter 20 mL aproximadamente a cada placa (grosor del agar en la placa de 4 mm aproximadamente), el agar se dejó solidificar por un tiempo suficiente para que se enfríe y la humedad en exceso se evapore (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017; Perez, 2019).

E. Sembrado en placas

Una vez solidificado el agar y con la ayuda de un hisopo estéril empapado de inóculo, se sembró en tres direcciones con el inóculo correspondiente y se secó durante 10 a 15 minutos en una estufa, a 36 ± 2 °C, transcurrido este tiempo se realizó los pozos en el agar con ayuda de un sacabocado de 6 mm de diámetro, a su vez se realizó 5 orificios equidistantes en cada placa (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017; Huashuayo, 2015).

F. Inoculación de la saponina extraída

Finalmente en cada pozo rotulado previamente se agregó 50 μ L (0.05 mL) de las diferentes concentraciones de saponinas extraídas de las semillas de

Chenopodium quinoa Willd “quinoa” (accesión amarilla) y de la solución de Fluconazol (15000 µg/mL), de la siguiente forma:

- Pozo 1: se aplicó 50 µL de solución de Fluconazol (15000 µg/mL) (Salas, 2015).
- Pozo 2, 3, 4 y 5: se aplicó 50 µL de las concentraciones de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 50 µg/mL y 5 µg/mL respectivamente en cada pozo.

Se realizó tres repeticiones, una vez realizado este proceso se dejó difundir por un espacio de una hora a temperatura ambiente. Al final, se llevó a incubar por 24 horas a 37°C (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017; Huashuayo, 2015).

G. Lectura de placas

Después del tiempo de incubación de 24 y 48 horas, se procedió a examinar cada placa y se midió los diámetros de los halos de inhibición completa alrededor de cada pozo, empleando para ello una regla milimetrada (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Huashuayo, 2015).

H. Cálculo del porcentaje de inhibición

Una vez obtenidas las medidas de los diámetros de los halos de inhibición se procedió a realizar los cálculos, en este caso para determinar el porcentaje de inhibición, se utilizó la siguiente fórmula (Martinez, 1996; Huashuayo, 2015):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro del halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

Para la clasificación de los resultados del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente tabla:

Tabla 3: Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición (Quispe et al., 2018).

Actividad antimicrobiana	Porcentaje de inhibición
Inactivo	< 40 %
Poco activo	40-50 %
Moderadamente activo	51-75 %
Buena actividad	> 76 %

I. Determinación del nivel de sensibilidad

Para determinar el nivel de sensibilidad producido por las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd, se tomó como referencia la escala de Duraffourd y Lapraz, la cual sirve para evaluar cualitativamente el efecto antimicótico según los halos de inhibición formados (Duraffourd *et al.*, 1987).

Tabla 4. Escala de Duraffourd y Lapraz (Duraffourd *et al.*, 1987).

Categoría		Medida en mm
Nula	(-)	≤ 8 mm
Sensible	(+)	> 8 mm ≤ 14 mm
Muy sensible	(++)	> 14 ≤ 20 mm
Sumamente sensible	(+++)	> 20 mm

J. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Método de dilución)

“CMI es la es la dilución más baja de antimicrobiano en la que no se observa crecimiento bacteriano” (Cercenado *et al.*, 2009, p.215). La concentración mínima inhibitoria es fundamental en el diagnóstico de laboratorio para ratificar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.

El cultivo de *Candida albicans* ATCC 90028 se ajustó al estándar de 0.5 de escala de Mc Farland. Para hallar la CMI se prepararon 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al 15. A continuación se detalla el procedimiento (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Huashuayo, 2015):

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 15 se agregó 1 mL de Caldo Sabouraud.
- Se agregó 1mL de la concentración (500 µg/mL) con mejor efecto antimicótico de la saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” al tubo N° 1, a partir del cual se traspasó 1 mL al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 14, se extrajo 1 mL y se descartó. El Tubo N° 15 no recibió la saponina, siendo este el control.
- Luego se agregó 1mL del inoculó de *Candida albicans* ATCC 90028 a todos los tubos. Se llevó todos los tubos a incubación a 37 °C por 24 horas, al cabo del cual se observó los resultados.

Interpretación: Se considera CMI como la concentración correspondiente al tubo con menor concentración, donde no hubo desarrollo bacteriano, demostrándose por la ausencia de turbidez (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002; Instituto Nacional de Salud, 2017; Huashuayo, 2015).

Tabla 5. Diluciones decrecientes de la saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y fungicida.

N° de tubo	Saponina ($\mu\text{g/mL}$)
1	500
2	250
3	125
4	62.50
5	31.25
6	15.625
7	7.81
8	3.91
9	1.95
10	0.98
11	0.49
12	0.244
13	0.122
14	0.061
15	CONTROL

K. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

Para determinar la concentración mínima fungicida se procedió a partir de la concentración mínima inhibitoria (CMI), realizándose de la siguiente manera:

- Luego de observar la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar con un hisopo estéril el tubo anterior de la CMI que no presenta turbidez en agar Sabouraud, considerándose la concentración de este tubo como la CMF.
- Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.
- Lectura: se determinó la CMF verificando si hubo o no crecimiento del hongo en las placas sembradas. La placa que no presentó crecimiento de las colonias se

considera como la Concentración Mínima Fungicida (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002).

3.4 Diseño de investigación

Diseño de tipo experimental.

- Ge X Oe
- Gc C Oc

Dónde:

Ge: Grupo experimental

Gc: Grupo control

X: Aplicación de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”

C: Aplicación de Fluconazol (control positivo)

O: Crecimiento fungicida (halos de inhibición)

Para el presente trabajo, en cada placa se trabajó con 4 concentraciones de saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” (500 µg/mL, 250 µg/mL, 50 µg/mL y 5 µg/mL) y un control (Fluconazol 15000 µg/mL), cada concentración con tres repeticiones, se enfrentó a *Candida albicans* ATCC 90028.

Para determinar el efecto antimicótico se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la muestra y del control positivo, los que nos permitió determinar la concentración ideal que muestra una mayor eficacia antimicótica en relación al Fluconazol tomado como patrón (control positivo). Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula (Martinez, 1996):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro del halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

3.5. Análisis de datos

Fueron elaboradas tablas y figuras estadísticas del tipo descriptivo para representar los distintos resultados hallados, los datos del análisis microbiológico fueron sometidos al análisis de varianza simple y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para comparar las variaciones existentes entre los tratamientos, para ello se utilizó el programa SPSS Statistics 26 (IBM Corp., 2017)

IV. RESULTADOS

Tabla 6. Promedio del halo de inhibición de la saponina extraída a partir de los granos de *Chenopodium quinoa* Willd a la concentración de 500 µg/mL, 250 µg/mL y de Fluconazol a la concentración de 15000 µg/mL frente a *Candida albicans* ATCC 90028. Ayacucho 2020.

Tratamientos	N° de muestras	Medida halo de inhibición a las 24 horas (mm)	Medida halo de inhibición a las 48 horas (mm)
Saponina 500 µg/mL	Placa 01	28	28
	Placa 02	26	26
	Placa 03	27	27
	Promedio	27	27
	Desviación estándar	1	1
Saponina 250 µg/mL	Placa 01	16	16
	Placa 02	20	20
	Placa 03	22	22
	Promedio	19.33	19.33
	Desviación estándar	3.06	3.06
Fluconazol 15000 µg/mL	Placa 01	38	38
	Placa 02	36	36
	Placa 03	38	38
	Promedio	37.33	37.33
	Desviación estándar	1.15	115

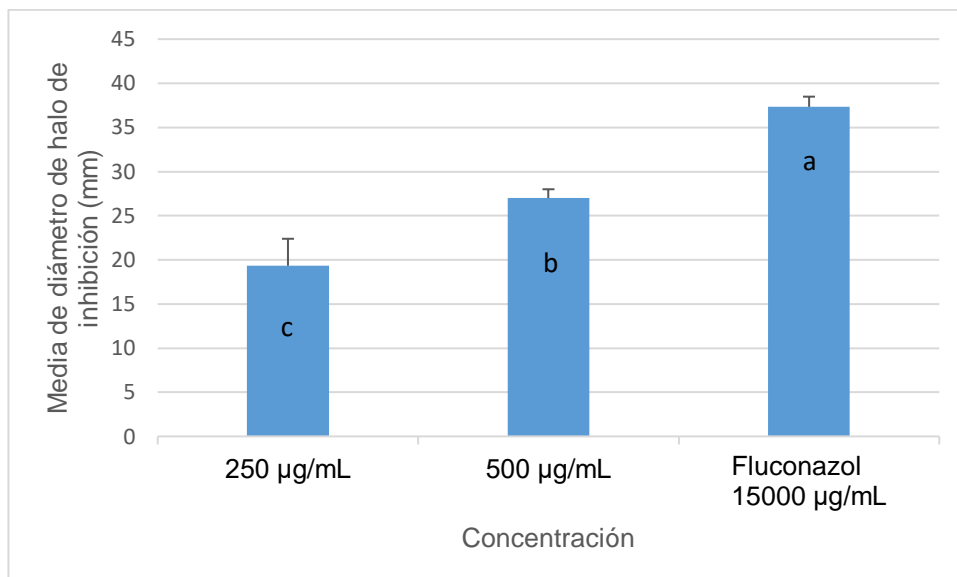


Figura 4. Media de diámetro de halo de inhibición (mm) en las diferentes concentraciones de saponina (250 µg/mL y 500 µg/mL) de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” (accesión amarilla) y de Fluconazol 15000 µg/mL. Ayacucho 2020.

LEYENDA:

(a), (b) y (c): Existe diferencia significativa, $\alpha = 0.05$.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” en las concentraciones de 500 µg/mL y 250 µg/mL. Ayacucho 2020.

Concentración de saponina	Porcentaje de inhibición de la muestra	Actividad antimicrobiana (resultado)
500 µg/mL	72.32 %	Moderadamente activo
250 µg/mL	51.79 %	Moderadamente activo

Leyenda:

Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición: Inactivo: < 40 %, poco activo: 40 – 50 %, moderadamente activo: 51 - 75 % y buena actividad: > 76 % (Quispe *et al.*, 2018).

Tabla 8. Evaluación del nivel de sensibilidad del efecto antimicótico de la saponina de *Chenopodium quinoa* Willd de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 50 µg/mL y 5 µg/mL frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, mediante halos de inhibición en milímetros. Ayacucho 2020.

Concentración de saponinas	Halo de inhibición promedio (mm)	Sensibilidad
500 µg/mL	27	Sumamente sensible (+++)
250 µg/mL	19.33	Muy sensible (++)
50 µg/mL	8	Nula (-)
5 µg/mL	6	Nula (-)

Leyenda:

Escala Duraffourd y Lapraz: Nula (-): ≤ 8 mm, sensible (+) > 8mm ≤ 14mm, Muy sensible (++) > 14 ≤ 20 mm y sumamente sensible (+++) > 20 mm (Duraffourd *et al.*, 1987).

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) de la saponina extraída de granos de *Chenopodium quinoa* Willd (accesión amarilla). Ayacucho 2020.

N° DE TUBO	SAPONINA (µg/mL)	Turbidez
1	500	NO
2	250	NO
3	125	NO (CMF)
4	62.50	NO (CMI)
5	31.25	SI
6	15.62	SI
7	7.81	SI
8	3.91	SI
9	1.95	SI
10	0.98	SI
11	0.49	SI
12	0.24	SI
13	0.12	SI
14	0.06	S
15	Control	SI

Leyenda:

SI: presencia de turbidez

NO: ausencia de turbidez

Tabla 10. Caracterización fitoquímica de las saponinas extraídas de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”. Ayacucho-2020

Prueba fitoquímica	Saponinas
Lieberman-Buchard	+++
Salkowski	+
α naftol	++

LEYENDA:

(+): Escaso.

(++): Moderada.

(+++): Abundante (Coras , 2018).

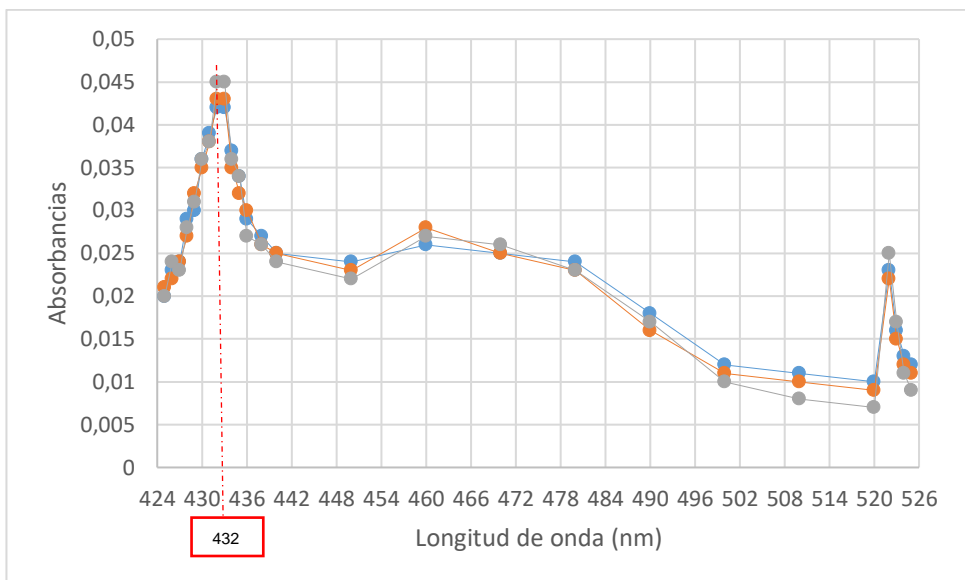


Figura 5. Espectro de absorción de la saponina de *Chenopodium quinoa* Willd (accesión amarilla). Ayacucho 2020.

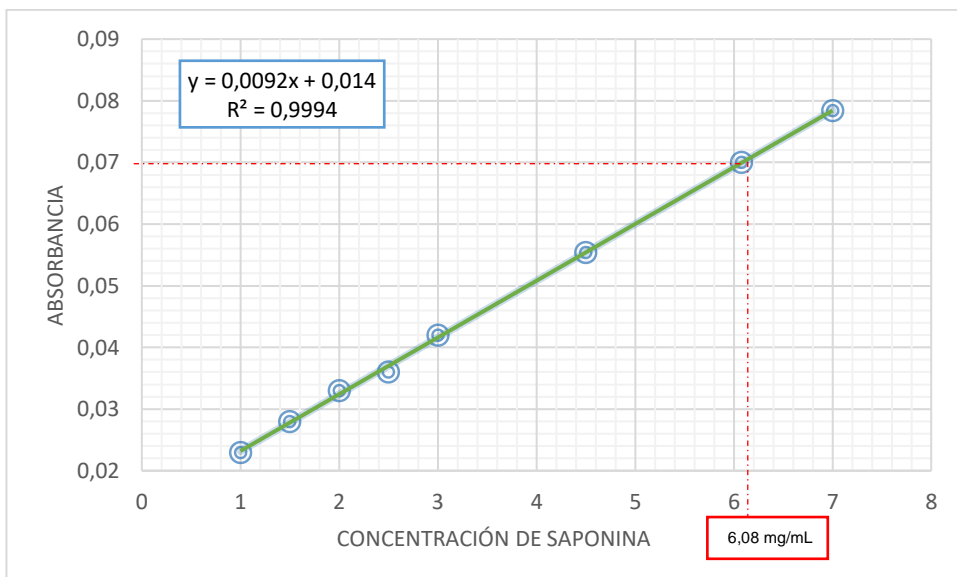


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de saponinas. Ayacucho 2020.

Tabla 11. Porcentaje de rendimiento de la extracción de saponinas de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.

Muestra	Peso (g) extracto	Peso (g) semillas	Porcentaje de rendimiento de la extracción (Método Harinder)
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	10.8 g	60 g	18%

Tabla 12. Prueba de hemólisis producida por saponinas extraídas de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” (accesión amarilla). Ayacucho 2020.

N° DE TUBO	SAPONINA 1% (mL)	SSF (mL)	GLÓBULOS ROJOS (mL)	HEMÓLISIS
1	0.1	4.9	5	NO
2	0.2	4.8	5	SI
3	0.3	4.7	5	SI
4	0.4	4.6	5	SI
5	0.5	4.5	5	SI
6	0.6	4.4	5	SI
7	0.7	4.3	5	SI
8	0.8	4.2	5	SI
9	0.9	4.1	5	SI
10	1.0	4.0	5	SI
11	-	5	5	CONTROL (-)

LEYENDA:

(NO): Los glóbulos rojos no fueron hemolizados.

(SI): Los glóbulos rojos fueron hemolizados.

V. DISCUSIÓN

El método de difusión en pozos de agar, es el más recomendado en la actualidad para la investigación de propiedades biológicas de extractos vegetales (compuestos polares) y posee mayor sensibilidad en comparación al método de discos (Ramirez *et al.*, 2009). La tabla 6 nos muestra los diámetros de los halos de inhibición de las dos concentraciones de saponina (500 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$) del extracto hidroalcohólico de *Chenopodium quinoa* Willd", cuyos promedios son 27 mm (Desviación estándar: 1) y 19.33 mm (Desviación estándar: 3.06) respectivamente. Cabe resaltar que en las concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$, no se observó la formación de halos de inhibición. Woldemichael (2001), encontró que la fracción de saponina total de *Chenopodium quinoa* inhibe el crecimiento de *Candida albicans* a 50 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, las saponinas individuales no exhibieron ningún efecto comparable. Esta diferencia se debe a que: "hay una influencia por el grupo funcional de los esqueletos de aglicona. El oligosacárido en C-3 juega un papel importante y crítico, tanto en la permeabilización, como en la propiedad antifúngica de las saponinas" (Kuljanabhagavad *et al.*, 2009, p. 485). Debido a que la cadena de azúcares se linealiza, cuando la saponina pierde un azúcar terminal, es por ello que se pierde la capacidad antifúngica. Esta disminución de la capacidad antifúngica concuerda con lo investigado para glucósidos provenientes del ácido oleanólico y hederagenina con carbohidratos de cadenas cortas sacados de los guisantes y hojas de la betarraga (raíz). Palomino (2000), indica que la formación de un halo de inhibición, aunque sea pequeño cuando se experimenta con material vegetal, indica evidente actividad del extracto, la que puede ser optimizada con la innovación de nuevas técnicas de extracción, con el fin de obtener principios activos concentrados y lograr resultados destacados. Cuadrado (2015), reporta esta disminución de la capacidad antifúngica, experimentando con la saponina (extractos crudos)

proveniente de 3 accesiones de quinua (INIAP Tunkahuan, blanca, morada), inoculada a *Candida albicans*, suscitando halos de inhibición de 7 y 8 mm de diámetro frente a la cepa de *Candida albicans*, exponiendo así una disminución de la capacidad antimicótica de la saponina. Es por ello que, durante la presente investigación, se experimentó un conjunto de metodologías para la extracción satisfactoria de la saponina de *Chenopodium quinoa* Willd, hasta encontrar un procedimiento que favorezca la permanencia de la capacidad antifúngica, lo que tomó un tiempo prolongado para su obtención.

En la tabla 6, se observa el diámetro de halo de inhibición del Fluconazol a una concentración de 15000 $\mu\text{g/ml}$, con un promedio de 37.333 mm (Desviación estándar: 1.155). Este resultado concuerda con lo señalado por el Instituto Nacional de Salud (2017), en donde se manifiesta que el diámetro de sensibilidad del Fluconazol esperado es de 28 a 39 para *Candida albicans* ATCC 90028.

Es importante también señalar que la formación del halo de inhibición es inducida por varios factores, los cuales son: capacidad de difusión del compuesto, medio de cultivo en que se realiza la prueba, sensibilidad al antibiótico, tiempo de generación del microorganismo, cantidad de inóculo y periodo de incubación (Ramirez *et al.*, 2009).

En la figura 4 se observa un gráfico de barras, el cual muestra que el efecto inhibitorio de Fluconazol es significativamente mayor ($p < 0.05$) a las concentraciones de saponinas extraídas de quinua. Sin embargo, se puede apreciar que a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ el efecto inhibitorio es significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado es el esperado, debido a que existe una disminución de la concentración de saponina aplicada.

En la tabla 7, se visualiza el porcentaje de inhibición para cada concentración de saponina, se obtuvo 72.32 %, para la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y 51.79 %, para la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ (frente al estándar de Fluconazol: 15000 $\mu\text{g/mL}$). Se observa que el mejor porcentaje de inhibición fue a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$. Ambas concentraciones, son consideradas, según la tabla de clasificación propuesta por Quispe *et al.*, como moderadamente activos. Holetzs (2002)

menciona que los porcentajes de inhibición que presentan valores mayores al 100 % tienen un buen efecto antimicótico, al ser comparados los halos de inhibición del extracto a diferentes concentraciones frente a un patrón, en este caso un antimicótico.

En la tabla 8, se denota la evaluación del nivel de sensibilidad, la cual fue determinada según la escala de Duraffourd y Lapraz, que se utilizó para evaluar a las soluciones de saponina, catalogando a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ como sumamente sensible (+++) (27 mm), a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ como muy sensible (++) (19.33 mm) y a las otras dos concentraciones restantes (50 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$) como nulas (-) (8 y 6 mm). Esta variación se debe a las diferentes concentraciones de saponinas utilizadas (a mayor concentración de saponina utilizada, mayor es la inhibición). Esto concuerda con lo reportado por Perez (2019), quien indica que el jabón hecho a base de saponina de *Chenopodium quinoa* Willd se considera sensible (concentración de 25%) frente a la cepa de *Candida albicans*, cabe resaltar que la escala que utilizó para determinar el nivel de sensibilidad, contempla tres categorías: nulo < 10 mm, medianamente sensible < 10 a 13 mm y sensible >13 mm.

Woldemichael (2001) indica que la sensibilidad se produce debido a que la aglicona triterpénica lipófila, presente en la estructura de la saponina, permite el ingreso a la membrana de *Candida albicans*, por su parte la unidad de la cadena de carbohidratos en C3 posibilita la unión a los glicolípidos y las glicoproteínas extracelulares, lo que desemboca en la inestabilidad de la membrana de *Candida albicans* y en su posterior destrucción.

En la tabla 9 se muestra la CMI (Método de dilución), la cual fue 62.50 $\mu\text{g/mL}$ y la CMF que fue de 125 $\mu\text{g/mL}$, estos difieren de los datos hallados por Woldemichael (2001), quién señala para los compuestos de saponina (1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 4a y 6) de *Chenopodium quinoa* Willd una CMI > 500 $\mu\text{g/mL}$, el compuesto 4 una CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$, y el compuesto 5 tenía una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$. Estas diferencias radican, debido a que el compuesto de saponina disminuye su capacidad antifúngica cuando pierde un azúcar terminal, lo cual se suscita posiblemente por el método de extracción de saponina que se utiliza. Holetz (2002) categorizó la actividad antimicrobiana, de acuerdo al resultado del CMI: < 100 $\mu\text{g/mL}$ (buena);

> 100 < 500 µg/mL (moderada); de > 500 <1000 µg/mL (débil); más de 1000 µg/mL (inactivo). Lo que nos indica que la saponina extraída posee una buena actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 90028. Cabe resaltar que la CMI se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; ya que pueden corroborar resistencias inusuales y dar respuestas concluyentes cuando el resultado alcanzado por otros métodos es impreciso (Andrews, 2001).

Para explicar el modo de acción que posee las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd para destruir a las levaduras de *Candida albicans*, recurrimos a la investigación de Diaz L. (2009), el cual menciona que la saponina SC-2 de *Solanum chrysotrichum* causa grandes cambios en la membrana celular de la levadura *Candida albicans* y afecta también la morfología de la pared celular, en donde la membrana citoplasmática se separa de la pared y se desintegra, además se produce una degradación total de los componentes celulares. Woldemichael (2001) también refiere un mecanismo de acción parecido, en donde existe una participación de la cadena de carbohidratos (C3) para posibilitar la unión o inmersión dentro de la membrana de *Candida albicans* y así desestabilizarla, provocando su posterior destrucción.

En la caracterización fitoquímica de la saponina (tabla 10), se reveló, la presencia de saponinas triterpénicas en mayor proporción, por la obtención de la coloración rosada púrpura (Prueba de Liebermann-Burchard, positiva) (anexo 14), saponinas esteroidales en menor proporción (Prueba de Salkowski, positiva) (anexo 14) y azúcares (Prueba de alfa-naftol, positiva). Esto fue corroborado con la investigación realizada por Coras (2018), que encontró la presencia de estos mismos compuestos en su extracto final. Valencia (2017), mediante las pruebas de Liebermann-Burchard, Salkowski y alfa-naftol demostró resultados positivos para el tamizaje fitoquímico de la saponina proveniente de *Agaricus bisporus*. Zegarra (2010), indica que todas las accesiones de quinua fueron positivas a la presencia de triterpenoides y saponinas; siendo la accesión Markjo, la que mostró un mayor contenido de dichos metabolitos (cualitativamente). Y por último Woldemichael también confirma una prueba positiva para la reacción de Liebermann-Burchard.

Rojas (2011), indica que la reacción Liebermann-Burchard es usual para aquellas saponinas conformadas por dos dobles enlaces combinados dentro de un mismo anillo, en dos anillos contiguos o en un doble enlace de un anillo contiguo con un grupo hidroxilo, esto permite la excitación y deslocalización de un electrón π en presencia de luz provocando la aparición del color característico. En la etapa inicial de la reacción se produce la protonación del grupo OH del carbono tres de la saponina, obteniéndose un ion y perdiéndose una molécula de agua (primer paso), a continuación, se produce la oxidación secuencial del ion por acción del SO_2 , para finalmente producirse el compuesto cromóforo (coloración rosada púrpura).

Garamendez (2020), hace referencia a la prueba de Salkowski, explicando el fundamento de ella, en donde el grupo colesterol forma biesteroides al condensarse y se forma un anillo coloreado rojizo, el cual confirma la presencia de saponinas esteroidales. A su vez también argumenta que la prueba de alfa-naftol (Molisch) es utilizada para confirmar la presencia de carbohidratos, obteniéndose como resultado una coloración morada.

Monje (2006), menciona que la longitud de máxima absorción se determina mediante un barrido espectral entre 400 y 600 nm a una velocidad de 1 nm/seg. La máxima absorción obtenida en su investigación fue a una longitud de onda de 528 nm. Este resultado no coincide con nuestra investigación (Figura 5), ya que el pico máximo se formó a 432 nm, bastante próximo a lo encontrado por Coras (2018) de 453 nm y Avalos *et al.*, (2011) de 412 nm. A su vez Aranibar (2017) determinó un pico máximo a 407 nm, lo que también difiere con lo mencionado por Monje (2006). Cabe resaltar, que posiblemente estas diferencias se deban a los equipos y tecnología de extracción diversos.

Mediante la curva de absorción leída a 432 nm, se logró cuantificar la concentración de saponinas (espectrofotometría UV-VIS) provenientes de *Chenopodium quinoa* Willd (accesión amarilla), construyendo una curva de calibración (Figura 6) con el estándar de saponina de *Quillaja saponaria* (Sigma®), obteniendo una concentración final de 6.08 mg/mL, contenidos en 60 g de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. Esto se contradice con la investigación de Subieta (2011) quien encontró que la quinua accesión amarilla poseía una concentración de saponina de 64.05 mg/mL (evaluada por el método espectrofotométrico), lo que

nos hace suponer que existe una menor cantidad de saponina en nuestra accesión de quinua amarilla ayacuchana. Cabe resaltar que Subieta (2011) utilizó un reactor de vidrio a escala laboratorio, de 7,5 cm de diámetro, alimentado con aire por medio de un compresor, provisto de un filtro para eliminar la humedad y el aceite del aire, a su vez la quinua amarilla es proveniente de Bolivia. Otra investigación que difiere es la de Aranibar (2017) la cual encontró una concentración de 0.935 mg/mL de saponina en quinua (accesión amarilla) proveniente de Bolivia. Dinan (2001) explica esta diferencia en los contenidos de saponinas, indicando que las concentraciones de saponina varían por el tipo de cultivo, edad de la planta, localización geográfica, estado fisiológico y el órgano vegetal.

En la tabla 11, se observa que el porcentaje (%) de rendimiento obtenido en la extracción hidroalcohólica de saponinas de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” (accesión amarilla) fue de 18 %, mientras que en la investigación de Coras (2018) para la accesión Amarilla Maranganí (Acocro), fue de 8,3%, lo cual visibiliza un mejor rendimiento en la presente investigación, debido a que al inicio de la extracción se trabajó con un mayor volumen de solvente (600 mL de solución Et-OH: H₂O (7.0:3.0)) y lo mismo para la segunda extracción en la cual se utilizó 300 mL de Et-OH: H₂O (7.0:3.0) x 30 min, a su vez el extracto obtenido, fue desengrasado con éter de petróleo y cloroformo con la finalidad de eliminar las grasas, ceras, otros metabolitos y pigmentos, posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo y al final se llevó a sequedad. Esto se corrobora con lo que indica Jaime C. (2019), que la mezcla de etanol en agua, como parámetro de extracción, fue determinante en el rendimiento de las saponinas y esto conlleva a que exista una mejor actividad biológica. Lozano M. (2012) también señala, que para que exista un mejor rendimiento en la extracción se debe controlar los parámetros de tiempo de maceración, relación porcentual H₂O/EtOH y relación masa de quinua/volumen de solvente. Es por ello, que se debe tener un especial cuidado al extraer saponina, si se quiere probar alguna actividad biológica de esta.

Desde hace mucho tiempo se conoce que las saponinas vegetales producen hemólisis (Yarlequé *et al.*, 2019). Se considera como índice hemolítico a la más grande dilución a la cual todavía puede causar la hemólisis total de una suspensión de glóbulos rojos (Hernández, 2014). En la presente investigación se

encontró (Tabla 12), que 0.2 g de saponinas son capaces de hemolizar 5000 mL de suspensión de glóbulos rojos (IH=5000). Este resultado obtenido es mayor al reportado por Coras (2018), con un índice hemolítico de 2500 para la saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd (Amarilla Marangani), lo que significa que 1 g de saponina es capaz de hemolizar 2500 mL de una suspensión de glóbulos rojos. Esta variación se puede explicar debido a que el poder hemolítico de las saponinas depende de varios factores como la temperatura, tipo de sangre, pH y la concentración de saponina utilizada. Yarlequé *et al.*, (2019) afirma que el poder hemolítico es característico de las saponinas triterpenoides pero es variable según los sustituyentes de la estructura (la presencia de grupos carboxílicos COOH disminuyen el poder hemolítico) y a su vez las saponinas esteroidales monodesmosídicas son hemolíticas mientras que las bidesmosídicas no lo son. Woldemichael (2001) también demostró que las saponinas monodesmosídicas eran hemolíticamente activas. Lo que refuerza el hecho de que las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd poseen la habilidad de producir ruptura de los glóbulos rojos (efecto hemolítico), pero que esta varía dependiendo de la estructura de la saponina probada y de otros factores.

Woldemichael (2001), explica el mecanismo de hemólisis de la saponina, indicando que existe una interacción de la saponina con la membrana, creando estructuras parecidas a poros que provocan la ruptura de la membrana y la fuga de la hemoglobina en el medio que lo rodea.

Finalmente, podemos concluir demostrando que la saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd a las concentraciones de 500 µg/ml y 250 µg/ml presenta actividad antimicótica, probados por la formación de los halos de inhibición, % de inhibición, nivel de sensibilidad y el método de dilución (CMI y CMF), a su vez, los valores de los halos de inhibición guardan relación proporcional con las concentraciones de saponina, como se demuestra en otros trabajos de investigación similares. La capacidad antifúngica depende mucho de la forma de extracción de la saponina, ya que en algunos métodos se pierde el oligosacárido C-3, lo que ocasiona una disminución o pérdida completa de esta capacidad antifúngica. Estadísticamente se demostró que a una concentración de 500 µg/ml el efecto inhibitorio es significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la concentración de 250 µg/mL. A su vez que el efecto inhibitorio

del Fluconazol es significativamente mayor ($p < 0.05$) a las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de saponina de quinua. Es necesario que se siga con las investigaciones sobre este tema, debido a que con los resultados obtenidos se puede considerar posiblemente a la saponina como potencial agente antifúngico, esto en respuesta a los casos de resistencia microbiana que manifiesta *Candida albicans*.

VI. CONCLUSIONES

1. La saponina extraída de *Chenopodium quinoa* Willd posee actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 90028, a las concentraciones de 500 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$.
2. El porcentaje de inhibición obtenido, para la saponina, a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ fue de 72.32 % (moderadamente activo) y para la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ fue de 51.79 % (moderadamente activo).
3. De acuerdo al nivel de sensibilidad, se considera a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, como sumamente sensible (+++); 250 $\mu\text{g/mL}$ sensible (++) y a las concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$ como nulas (-).
4. Las saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* Willd tienen una concentración mínima inhibitoria de 62.50 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración mínima fungicida de 125 $\mu\text{g/mL}$.
5. Según la caracterización fitoquímica cualitativa se evidenció mayor presencia de saponinas triterpénicas y en menor proporción a las saponinas esteroidales y azúcares. Se encontró una concentración de 6.08 mg/mL de saponinas extraídas.
6. El porcentaje de rendimiento de la extracción de saponinas fue de 18 % y el índice hemolítico fue de 5000.

VII. RECOMENDACIONES

1. En futuros trabajos de investigación se recomienda indagar sobre otras técnicas de extracción de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd, para optimizar y facilitar su obtención, teniendo cuidado de preservar la actividad biológica de estas.
2. Se debe tener especial cuidado, si se quiere utilizar la misma metodología descrita en la presente investigación, debido a que la saponina, cuando no se sigue estrictamente los parámetros adecuados, posiblemente pierde el oligosacárido C-3, lo que ocasiona una disminución o pérdida completa de su capacidad antifúngica.
3. Realizar otras investigaciones sobre la capacidad antimicótica de la saponina de otras accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd, debido a que algunas de ellas poseen mayor concentración de saponina, lo que posiblemente incrementaría la actividad antimicótica.
4. En futuras investigaciones, se recomienda, seguir trabajando con cepas ATCC certificadas, ya que *Candida albicans* tiende con el paso del tiempo a generar mecanismos de resistencia frente al Fluconazol y a otros compuestos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benitez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias, Físicas y Matemáticas*, 45(3).
- Alenfermeria. (15 de Junio de 2010). *Alenfermeria's Blog*. Obtenido de https://alenfermeria.wordpress.com/page/2/?like=1&source=post_flair
- Anaya, A. (2013). *Ecología química* (Primera ed.). Mexico: Plaza y Valdez S.A de C.V.
- Andrews, M. (2001). Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Antimicrob Chemother*, 48(31).
- Anisimov, M. (1980). Die biologische Bewertung von Triterpenglykoside. *Pharmazie*, 35(731).
- Aranibar, G. (2017). Efecto inhibitorio de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) En la flora fúngica natural e inducida de *Penicillium digitatum* en naranjas (*Citrus sinensis*). Tesis pregrado, Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de ciencias agrarias, Bolivia.
- Avalos, A., & Perez, E. (2017). Metabolismo secundario de plantas. Recuperado el 01 de Diciembre de 2020, de UCM: https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
- Avalos, A., & William, T. (2011). Cuantificación por espectrofotometría UV-VIS de las saponinas contenidas en el episperma de la especie *Chenopodium quinoa* Willd (quinua) procedente de la provincia de Santiago de Chuco-La Libertad. La Libertad.

- Bader, G., Seibold, M., Tintelnot, K., & Hiller, K. (2000). Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 2: Relationships between the structures of glycosides of polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *PubMed*, 55(1).
- Balsevich, J. (2012). Antiproliferative activity of *Saponaria vaccaria* constituents and related compounds. *Fitoterapia*, 83(170).
- Camacho, V. (2011). Determinación de la actividad insecticida del shampoo con extracto de *Sambucus nigra* L. *Franseria artemisioides* W, y *Tagetes zipaquirensis* H en *Ctenocephalides canis*. Tesis pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Biológicas, Riobamba.
- Carlson, D. (2012). Effects of quinoa hull meal on piglet performance and intestinal epithelial physiology. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(198).
- Cercenado, E., & Saavedra, J. (2009). El antibiograma. *Anales de pediatría continuada*, 214-217.
- Clinical Laboratory Standards Institute. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standard.
- Coleman, J., Okoli, I., Tegos, G., Holson, E., Wagner, F., Hamblin, M., & Mylonakis, E. (Marzo de 2010). Caracterización de productos naturales de saponina de origen vegetal frente a *Candida albicans*. *ACS Chem Biol*, 5(3).
- Coras, R. (2018). Contenido de saponinas totales de seis variedades de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" y su capacidad antioxidante *In vitro*. *Ayacucho 2018*. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias de la Salud, Ayacucho.
- Cuadrado, L., Villacrés, E., Rios, A., Quelal, M., & Alvarez, J. (2015). Actividad antimicrobiana de extractos de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y Sangorache (*Amaranthus hybridus* L.). Boletín técnico N°428, Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias de la Salud e Ingeniería, Quito.

- Curipallo, A. (2014). Determinación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos obtenidos de plantas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) aplicado sobre cepas de interés clínico en el período diciembre de 2013-mayo de 2014. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Chimborazo, Departamento de Salud, Quito.
- Da Silva Ferreyra, D. (2010). Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. *Parasitology Research*, 106(985).
- Diaz, L. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2).
- Dinan, L., Juraj, H., & Lafont, R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Elsevier*, 935(11).
- Duraffourd , C., Lapraz , J., & d' Hervicourt , L. (1987). Cuadernos de fitoterapia (Primera ed.). (C. Duraffourd , Ed.) Barcelona: Masson S.A.
- Estrada, A. (1998). Adjuvant action of *Chenopodium quinoa* saponins on the induction of antibody responses to intragastric and intranasal administered antigens in mice, *Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Diseases.*, 21(225).
- Fica, A. (2004). Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. Primera parte: Fluconazol, Itraconazol y Voriconazol. *Revista Chilena de Infecciones*, 21(1).
- Fujioka, S. (1987). Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism*, 36(54).
- Garamendez, E. (2020). Determinación de la actividad de las saponinas presentes en *Pattalus mollis* (pepino de mar) frente a *Candida albicans*. Lima.
- García, A. (2010). Extracción, cuantificación y aislamiento de saponinas a partir de *Agave lechuguilla* y *Yucca filifera*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Córdoba.

- García, Q. (2017). Recuperado el 08 de Diciembre de 2020, de Microbiología blog: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/>
- Gee, J., Price, K., Ridout, C., Wortley, G., Hurrell, R., & Johnson, I. (1993). Saponins of quinoa (*Chenopodium quinoa*): Effects of processing on their abundance in quinoa products and their biological effects on intestinal mucosal tissue. *Journal science of food and agriculture*, 201-209.
- Ghosh, D. (1983). Anti-inflammatory and analgesic activities of oleanolic acid 3-O-β-D-glucoside (RDG-1) from *Randia dumetorum*. *Indian Journal of Pharmacology*, 15(331).
- Gianna, V. (2013). Extracción, cuantificación y purificación de saponinas de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd provenientes del noroeste argentino. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales., Córdoba.
- Gómez, C. (2018). Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. Recuperado el 12 de Diciembre de 2020, de Scielo: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a09.pdf>
- Guerra, J. (2015). Recuperado el 05 de Diciembre de 2020, de Monografías: <http://www.monografias.com/trabajos55/saponinas-sapogeninas/saponinas-sapogeninas.shtml>
- Gulcin, I. (2006). The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β-D-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*, 20(130).
- Guzman, B. (2013). Cuantificación de saponinas en muestras de cañihua *Chenopodium pallidicaule* Aellen. *Revista Boliviana de Química*, 30(2).
- Harinder, M., Sidhuraju, P., & Becker, K. (2010). *Plant Secondary Metabolites*. (A. O. Sperry, Ed.) EE.UU.: Humana Press.
- Hernández, A. (2014). Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. Tesis doctoral, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Guatemala.

- Herrera, A., & Martinez, M. (2007). Mycological and Electron Microscopic Study of Solanum chrysotrichum Saponin SC-2 Antifungal Activity on *Candida* Species of Medical Significance. *Planta Medica*, 73(15).
- Herrera, M. (2014). Proyección de antitopoisomerasa, antioxidante, y las actividades antimicrobianas de triterpenos y saponinas seleccionados. Informe técnico, Universidad del Mar, Departamento de Ciencias, México.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C., & Filho, B. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(7).
- Huaman, H., & Shuan, S. (2018). *Obtención de saponina de la corteza de quinua (Chenopodium quinoa) mediante extracción hidroalcohólica*. Tesis pregrado, Universidad Nacional del Callao, Departamento de Ingeniería química, Lima.
- Huashuayo, L. (2015). Actividad antibacteriana de los extractos químicos de *Caesalpinia spinosa* "tara" frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Ayacucho - 2015. Tesis pregrado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Repositorio de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/1763/TESES%20B769_Hua.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- IBM Corp. (2017). *IBM SPSS Statistics for Windows*. Obtenido de <https://hadoop.apache.org>
- IDEXX Laboratorios. (2018). Recuperado el 03 de Diciembre de 2020, de IDEXX: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
- Improta, F. (2001). Comparison of raw, washed and polished quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to wheat, sorghum or maize based diets on growth and survival of broiler chicks. *Research for rural development*, 13(1).
- INIA. (2013). Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. Informe situacional, INIA, Programa nacional de innovación agraria en cultivos andinos., Lima.
- INSST. (2012). *Candida albicans*. *DataBio*, 12(47).

- Instituto Nacional de Salud. (2017). Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. Informe de investigación, INS, Lima.
- Ip., Soluciones cooperativas. (2020). Recuperado el 02 de 10 de 2020, de Propiedadesde.net: <https://propiedadesde.net/propiedades-de-la-quinua-o-quinua/>
- Jacobsen, E. (1997). Effect of dietary inclusion of quinoa on broiler growth performance. *Animal feed science and technology*, 65(5).
- Jaime, C. (2019). Optimización del proceso de extracción de saponinas del escarificado de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) asistido por ultrasonido, y caracterización. Tesis Pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú, Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Huancayo.
- Jawetz, E., Melnick, & Adelberg. (2014). *Microbiología Médica* (28 ed.). (McGraw-Hill, Ed.) México: Lange.
- Joshi, R. (2008). Efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins against golden Apple snail (*Pomacea canaliculata*) in the Philippines under laboratory conditions. *Crop Protection*, 27(553).
- Jove, N., & Canahuire, R. (2021). Efecto inhibitorio in vitro de las saponinas (*Chenopodium quinoa* Willd - quinua) sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Puno.
- Khadija, E., Jawhar, H., Mansour, S., Manal, M., Moha, T., Kamal, E., & Abdelaziz, Y. (Marzo de 2020). Una mirada a las saponinas de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd): una revisión. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7179108/#B52-molecules-25-01059>
- Kuljanabthagavad, T. (2009). Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry Reviews*, 8(473).
- Laforet, L. (2009). Una proteína implicada en la arquitectura de a pared celular de *Candida albicans*. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, Sección Departamental de Microbiología, Valencia.
- Letelier, M. (2011). Surfactant and antioxidant properties of an extract from *Chenopodium quinoa* Willd. *Journal of Cereal Science*, 53(239).
- Lopez, T. (Junio de 2001). Saponósidos. *OFFARM*, 2(10).

- Lozano, M., Ticona, E., Carrasco, C., Flores, Y., & Almanza, G. (Diciembre de 2012). Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd. *Revista boliviana de química*, 29(2).
- Madl, T. (2006). Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*,. *Journal of the American Society For Mass Spectrometry*, 17(795).
- Mantilla, R., & Mileni, J. (2014). "Efecto antimicótico in vitro del extracto hidroalcohólico de la semilla de *Persea Americana* Mill en cepas de *Candida albicans*. Recuperado el 1 de diciembre de 2020, de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10106>
- Martinez, M. (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera* (sábila). *Revista cubana de plantas medicinales*.
- MINAGRI. (2014). Quinoa. Recuperado el 03 de diciembre de 2020, de MINAGRI: <http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/sectoragrario/agricola/lineasdecultivosemergentes/QUINUA.pdf>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2020). *Análisis de mercado 2015-2020 de la quinua*. Informe situacional, Ministerio de Desarrollo Agrario y riego, Lima.
- Ministerio de Salud. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima.
- Monje, C., Yarko, A., & Raffailac, J. (2006). *Determinación de la saponina total en quinua (Chenopodium quinoa) por el método espectrofotométrico*. Informe de congreso., Universidad técnica de Oruro, Departamento de Fitotecnia, Oruro.
- Mujica, A. (2007). Proyecto quinua: Cultivo Multipropósito para los Países Andinos. Técnico, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos-Icta, Lima.
- Muñoz, E. (2012). Aislamiento de *Candida albicans* de mujeres con candidiasis vaginal atendidas en el Hospital Regional Docente de Trujillo-Perú. Recuperado el 01 de diciembre de 2020, de Universidad Nacional de Trujillo : www.facbio.unir.ru.edu.pe/index.php?option=com_docman
- Murray P, R. K. (2006). *Microbiología médica*. España: Etsevier.

- Neyra, L., & Armas, N. (2018). Evaluación in vitro de la actividad fungicida y fungistática del extracto etanólico de *Minthostachis mollis* (Muña) sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Tesis Pregrado, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Departamento de Ciencias de la Salud, Lima.
- OMS. (2019). *Protocolo de implementación temprana*. Recuperado el 01 de diciembre de 2020, de OMS: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326927/WHO-WSI-AMR-2019.4-spa.pdf?ua=1>
- Ortega, R. (2015). Prevalence of overweight and obesity in schoolchildren of a rural Colombian community. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 19(212).
- Palomino, J. (2000). Actividad antibacteriana de *Punica granatum* "granado" en cepas de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda (EDA). Tesis de pregrado, UNSCH, Facultad de Ciencias de la Salud, Ayacucho.
- Pardo, A. (2011). "Determinación de la actividad antifúngica de extractos de *Lantana camara* frente a *Candida sp.*". Técnico, Asociación Colombiana de Infectología, Colombia.
- Pasko, P. (2010). Effect of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa*) in diet on some biochemical parameters and essential elements in blood of high fructose-fed rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(333).
- Perez, K. (2019). Efecto antimicótico del jabón elaborado a base del extracto acuoso de los granos de *Chenopodium quinoa* (quinua) frente a *Candida albicans*. Chimbote.
- Picazo. (2010). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos. (Segunda ed., Vol. 10). España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Puentes, N. (2007). Implementación de los cultivos de quinua en el municipio de Saboya-Boyaca. Informe técnico, Escuela Superior de Administración Pública, Bogota.
- Quispe, M., & Tenorio, E. (2018). Determinación fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de los órganos aéreos de *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling "pacha salvia". Lima.

- Ramirez, L., & Marin, D. (Agosto de 2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42).
- Ramiro, R. (2017). Recuperado el 05 de Diciembre de 2020, de Todo sobre la quinua blog: <http://laquinua.blogspot.pe/2009/02/determinacion-de-saponina-total-en.html>
- Rodero, L., Cordoba, S., & Vivot, W. (2006). Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Revista Clínica Argentina*, 12(6).
- Rodriguez, J. (2017). Determinación y cuantificación de saponinas en las hojas de la cabuya (*Furcraea andina*) para su posible uso como tensoactivo en detergentes biodegradables. Guayaquil.
- Rojas, A., & Tapia, W. (2011). Cuantificación por espectrofotometría UV-VIS de las saponinas contenidas en el episperma de la especie *Chenopodium quinoa* Willd (quinua) procedente de la provincia de Santiago de Chuco-La Libertad. La Libertad.
- Salas, A. (2015). Efecto antimicótico del aceite esencial *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Candida albicans*. Puno.
- San Marín, R. (2008). Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. *Crop Protection*, 27(3).
- Simnadis, T. (2015). Physiological effects associated with quinoa consumption and implications for research involving humans: A review. *Plant foods for human nutrition*, 70(238).
- Stuardo, M. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial crops and products*, 27(236).
- Subieta, C., Quiroga, C., Escalera, R., & Arteaga, L. (2011). Recuperación de residuos sólidos con alta concentración de saponinas del proceso de beneficiado en seco de granos de quinua amarga, mediante la aplicación de un lecho fluidizado de tipo surtidor (LFTS). *Investigación & Desarrollo*, 11(1).
- Sun, H. (2006). Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. *Vaccine*, 24(3432).

- Takao, T. (2005). Hypocholesterolemic effect of protein isolated from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Food Science and Technology Research.*, 11(161).
- TC Metrología. (2015). Recuperado el 03 de diciembre de 2020, de TC Metrología: <https://www.tcmetrologia.com/blog/que-son-las-cepas-atcc/>
- Técnicas de control metrológico S.L. (2019). Recuperado el 07 de Diciembre de 2020, de TCM: <https://www.tcmetrologia.com/blog/que-son-las-cepas-atcc/>
- Tsuzuki, J., Svidzinski, T., & Shinobu, C. (2007). Antifungal activity of the extracts and saponins from. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 1(01).
- Valencia, E. (2017). Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus Bisporus*. *BioTempo*, 5(13).
- Verza, S. (2012). Immunoadjuvant activity, toxicity assays, and determination by UPLC/Q-TOF-MS of triterpenic saponins from *Chenopodium quinoa* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3113).
- Vircell. (2018). Recuperado el 2 de Diciembre de 2020, de Vircell Microbiologist: <https://www.vircell.com/enfermedad/27-candida-albicans/>
- Woldemichael , G. M., & Wink, M. (2001). Identification and Biological Activities of Triterpenoid Saponins from *Chenopodium quinoa*. *Food Chem*, 1(01).
- Yang, C., Zhang, Y., Jacob, M., Khan, S., Zang, Y., & Cong Li, Z. (2006). Actividad antifúngica de las saponinas esteroides C-27. *American Society for Microbiology*, 50(5), 1710-1714.
- Yao, Y. (2015). Suppressive effects of saponinenriched extracts from quinoa on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Food and fuction*, 6(3282).
- Yarlequé, J., Arones, M., Luna, H., & Anaya, B. (2019). Identificación y valoración de las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd en la variedad Amarilla Marangani y Negra Collana. Ayacucho 2018. ISSN 1684-0089. *Revista de Investigación UNSCH*, 27(2).

- Zapana, F., De Bruijn, J., & Aqueveque, P. (2017). Aplicación de la saponina de quinua como agente antifúngico en frutas y hortalizas. Informe técnico, Universidad de Concepción, Facultad de Ingeniería agrícola, Chile.
- Zegarra, G. (2010). Actividad deterrente y acaricida de quinuas amargas, aceites esenciales y tarwi. Tesis Pregrado, Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Lima.
- Zurita, S. (Enero de 2018). Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1).

Anexo 1. Documento de acreditación de cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.

"Año del Bicentenario Perú: 200 años de independencia"

EL QUE SUSCRIBE, DIRECTOR DEL LABORATORIO REGIONAL DE SALUD PÚBLICA AYACUCHO, DE LA DIRECCION REGIONAL DE SALUD AYACUCHO;

HACE CONSTAR

Que, la Bach. Ingrid Yaqueline HUAYANCA RAMÍREZ, identificada con DNI N° 48476703, estudiante de la Universidad San Cristóbal de Huamanga, solicitó cepa ATCC 90028, para su estudio de tesis "Actividad antimicótica de saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa Willd* frente a *Candida albicans* ATCC 90028. Ayacucho 2020. Se realizó el repique con fecha 10/06/2020, del Área de Micología, del Laboratorio Regional.

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que considere necesario.

CARECE DE VALOR PARA ACCIONES JUDICIALES EN CONTRA DEL ESTADO.

Ayacucho, 12 de febrero del 2021



GOBIERNO REGIONAL DE AYACUCHO
DIRECCION REGIONAL DE SALUD AYACUCHO
DIRECCION DEL LABORATORIO REGIONAL DE SALUD PUBLICA
MSc. PAVELATON SUAREZ PINA MEDINA
DIRECTOR

Anexo 2. Constancia de certificación de planta de *Chenopodium quinoa* Willd.

C O N S T A N C I A

LA BIÓLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:

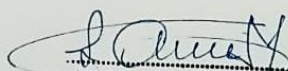
Que, la Bach. en Ciencias Biológicas, Srta. Ingrid Yaqueline, HUAYANCA RAMÍREZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist, A. 1988, siendo su taxonomía la siguiente:

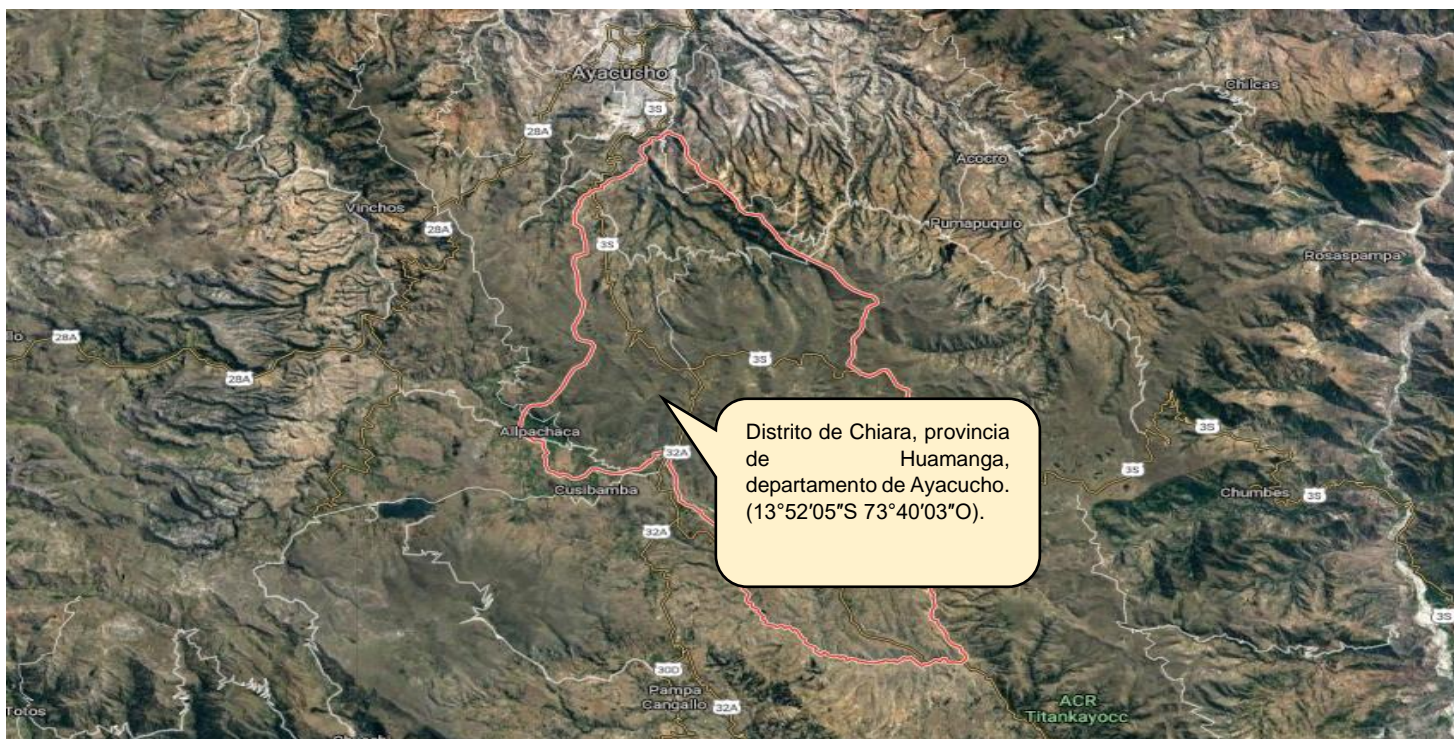
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	:	CARYOPHYLLALES
FAMILIA	:	CHENOPODIACEAE
GENERO	:	Chenopodium
ESPECIE	:	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
N V	:	"quinua"
VARIEDAD	:	Amarilla

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 08 de Junio del 2018


LAURA AUCASIME MEDINA
BIÓLOGA
Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

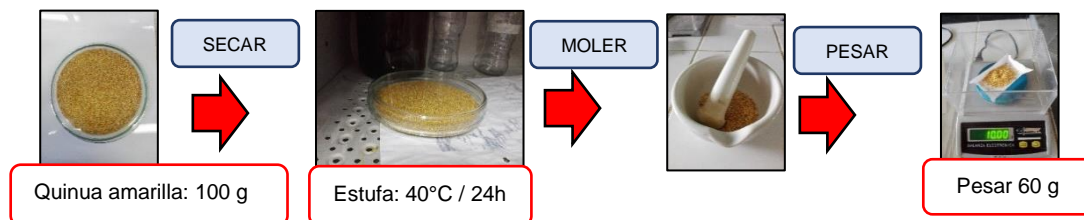
Anexo 3. Lugar de muestreo para obtener las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd (accesión amarilla). Distrito de Chiara, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.



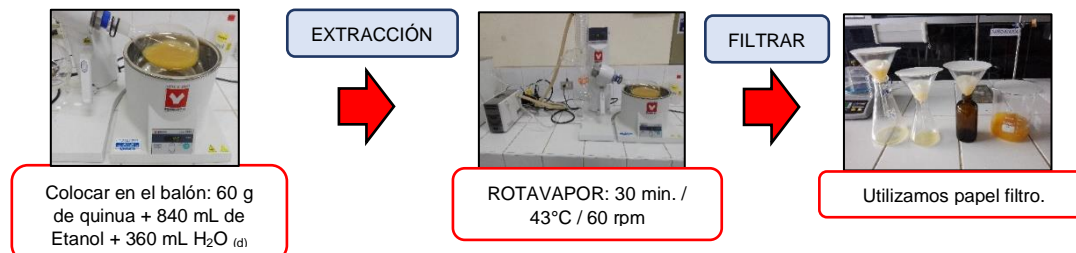
Anexo 4. Flujograma para la obtención de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”. Ayacucho 2020.

1. Extracción de saponinas:

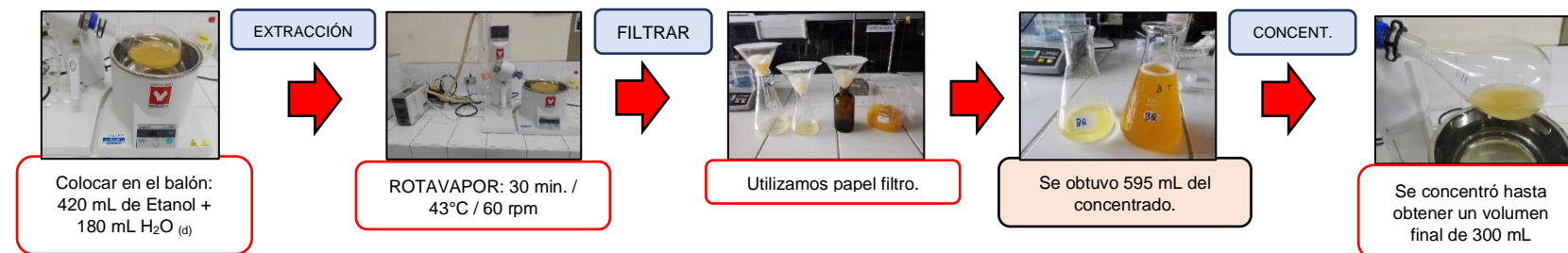
1.1. Secado y pesado:



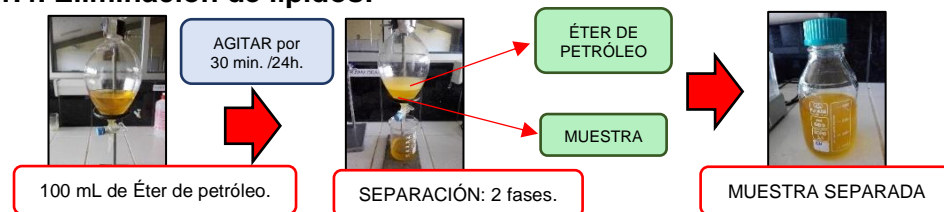
1.2. Primera extracción:



1.3. Segunda extracción:



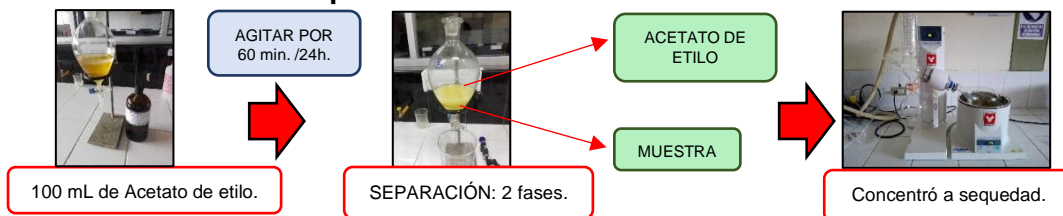
1.4. Eliminación de lípidos:



1.5. Eliminación de pigmentos:



1.6. Eliminación de compuestos fenólicos:

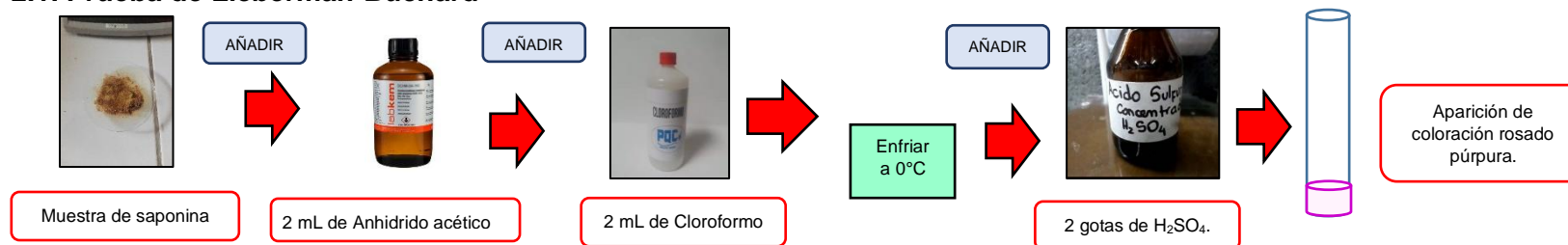


1.7. Extracción con N-butanol:



Anexo 5. Flujograma para las reacciones de caracterización de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua". Ayacucho 2020.

2.1. Prueba de Lieberman-Buchard



2.2. Prueba de Salkowski

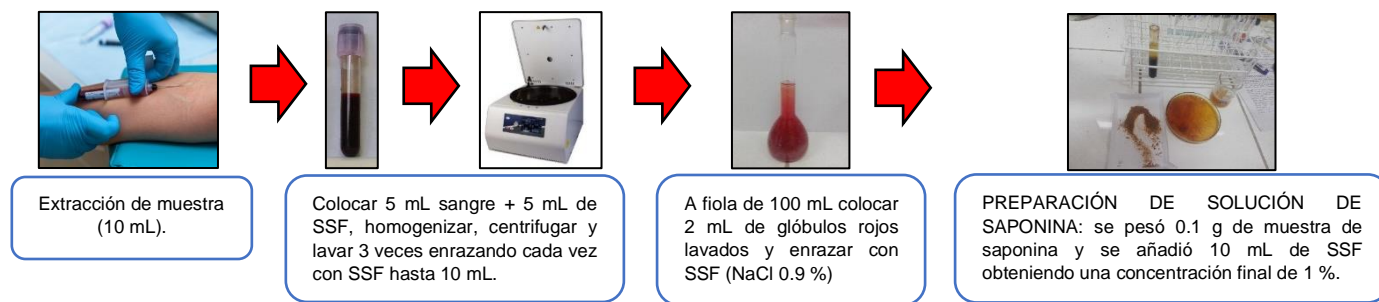


2.3. Prueba de alfa-naftol

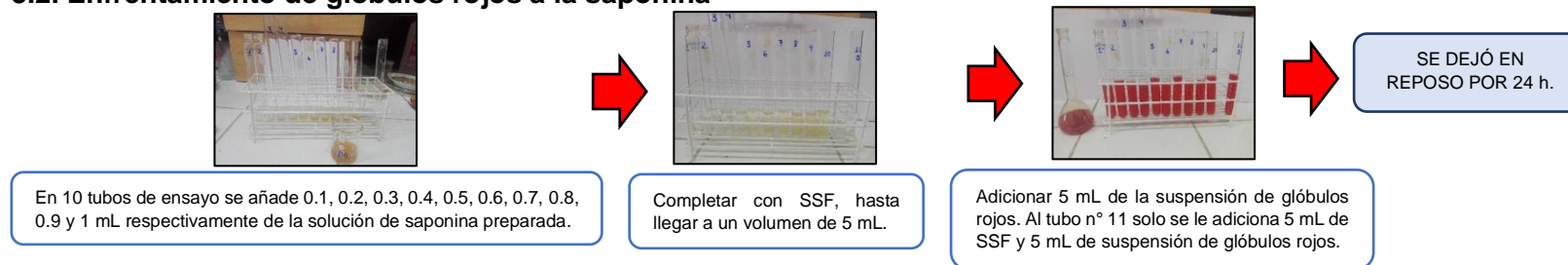


Anexo 6. Flujograma para la determinación del índice hemolítico de las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”. Ayacucho 2020.

3.1. Lavado de glóbulos rojos

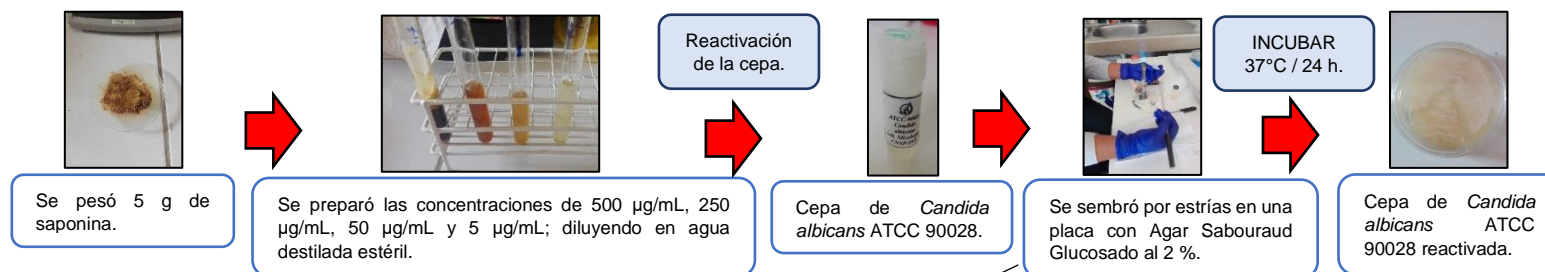


3.2. Enfrentamiento de glóbulos rojos a la saponina

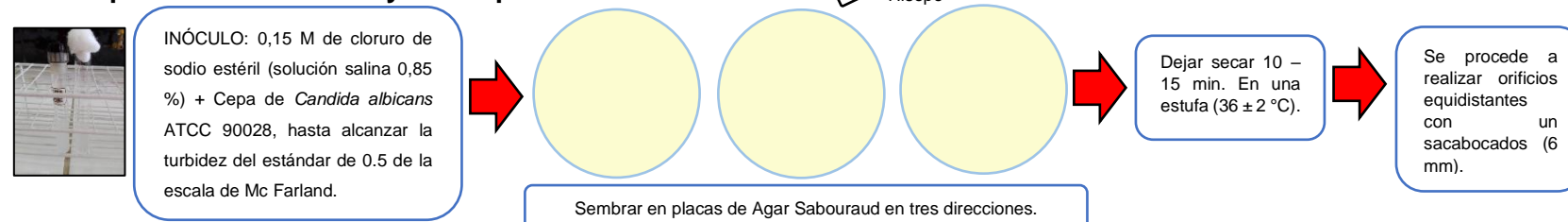


Anexo 7. Flujograma para la determinación de la actividad antimicótica de las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd. Ayacucho 2020.

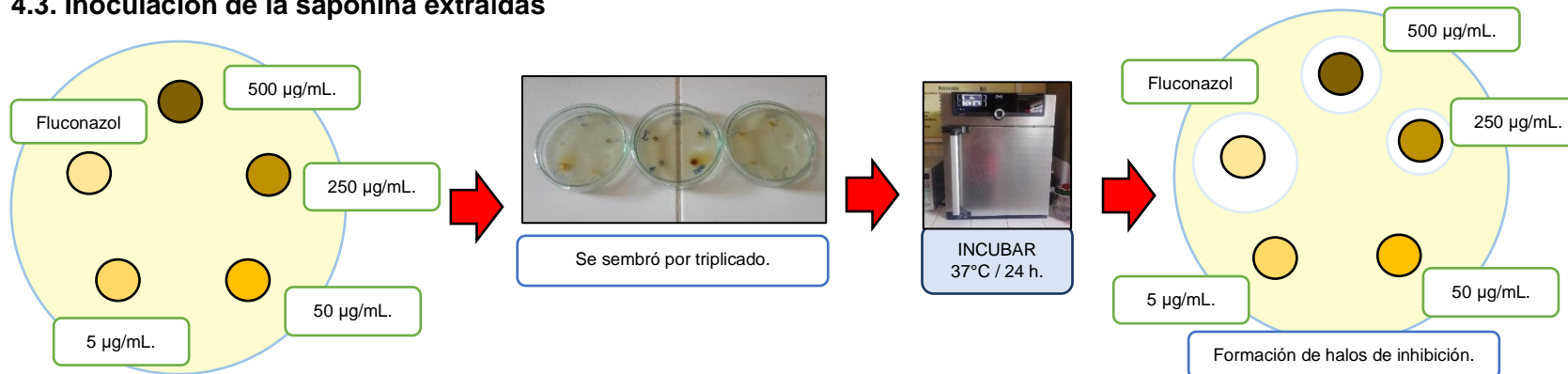
4.1. Preparación de las distintas concentraciones hidroalcohólicas de saponinas



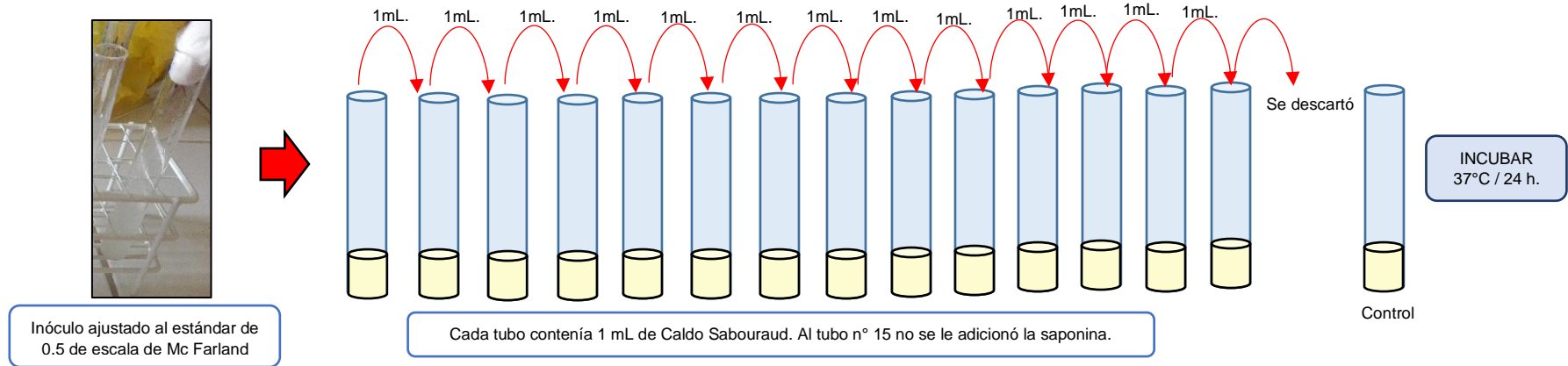
4.2. Preparación del inóculo y de las placas



4.3. Inoculación de la saponina extraídas



4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)



Anexo 8. Secado, limpieza, molienda y pesado de la muestra de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” (accesión amarilla). Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



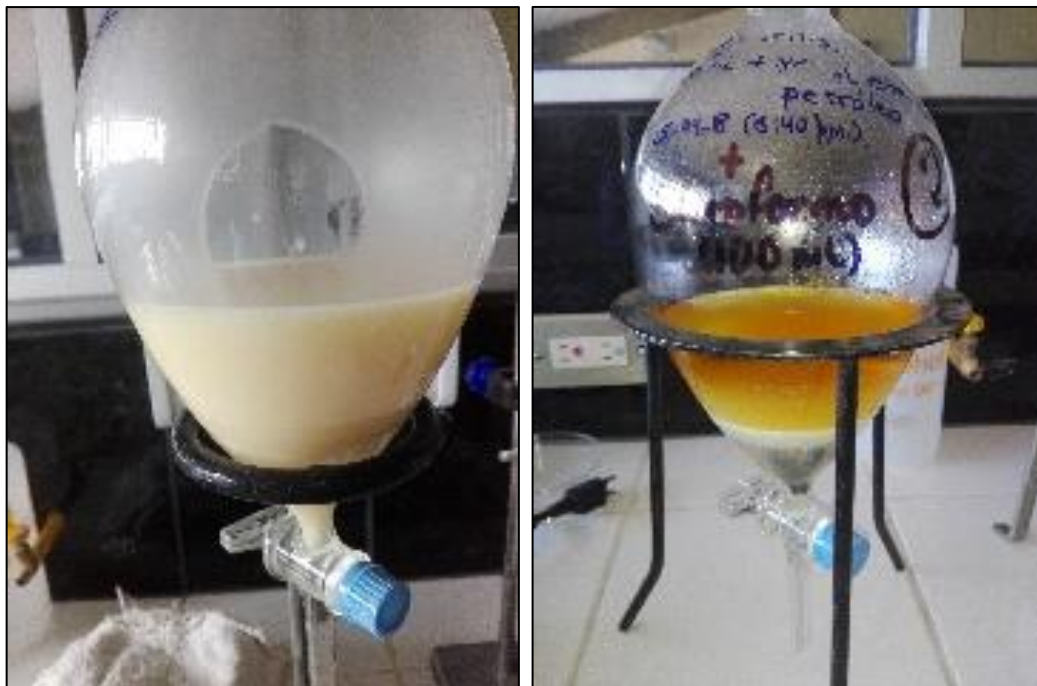
Anexo 9. Extracción hidroalcohólica de saponinas a través de un rotavapor y obtención del crudo de saponinas. Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



Anexo 10. Desengrasado con éter de petróleo de la solución hidroalcohólica de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" (accesión amarilla). Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



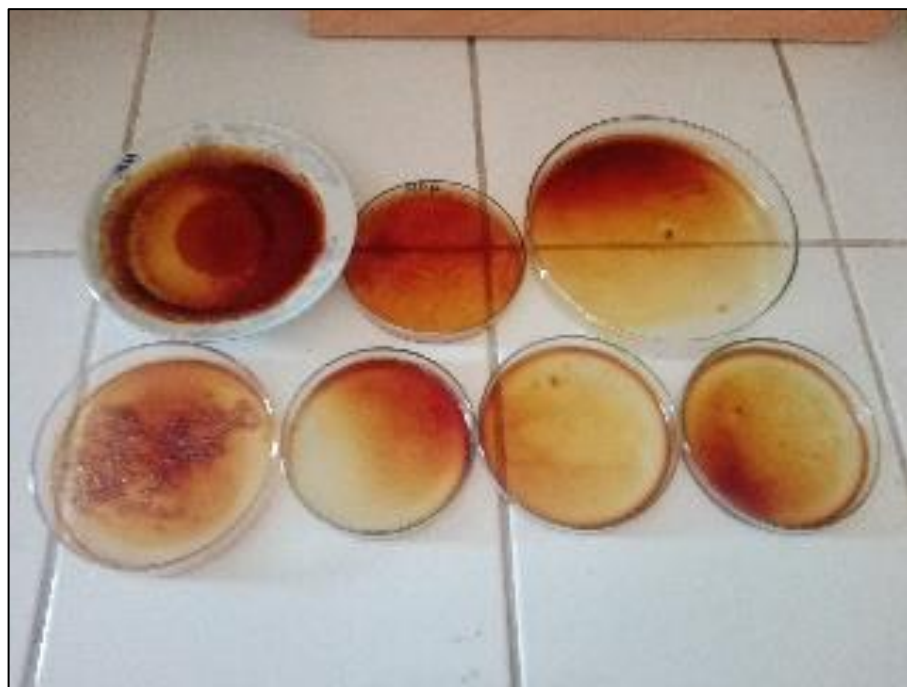
Anexo 11. Eliminación de pigmentos de la solución hidroalcohólica de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" (accesión amarilla). Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



Anexo 12. Eliminación de compuestos fenólicos con acetato de etilo y última extracción con n-butanol de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" (accesión amarilla). Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



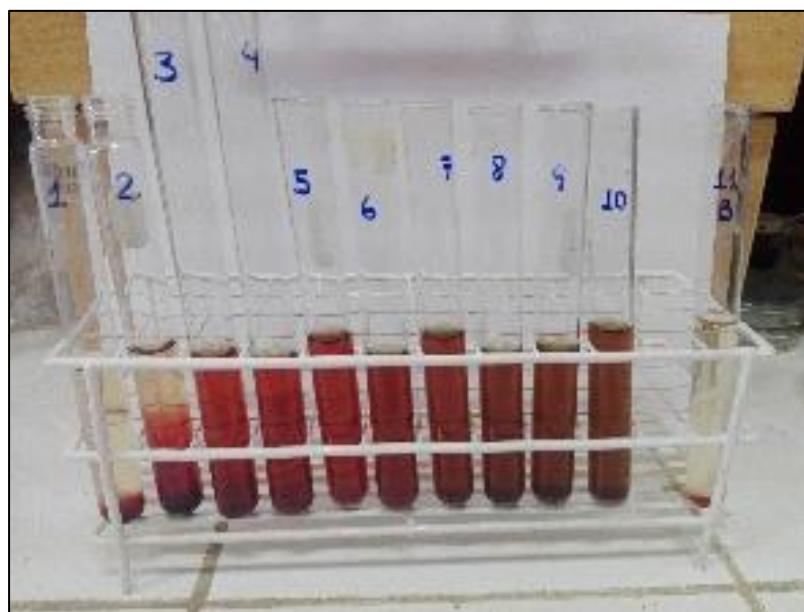
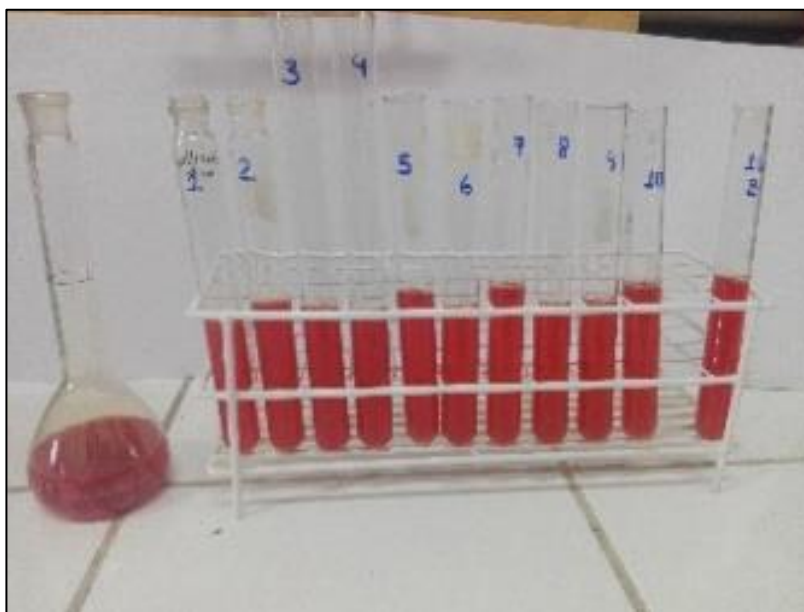
Anexo 13. Saponinas extraídas y desecadas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" (accesión amarilla). Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



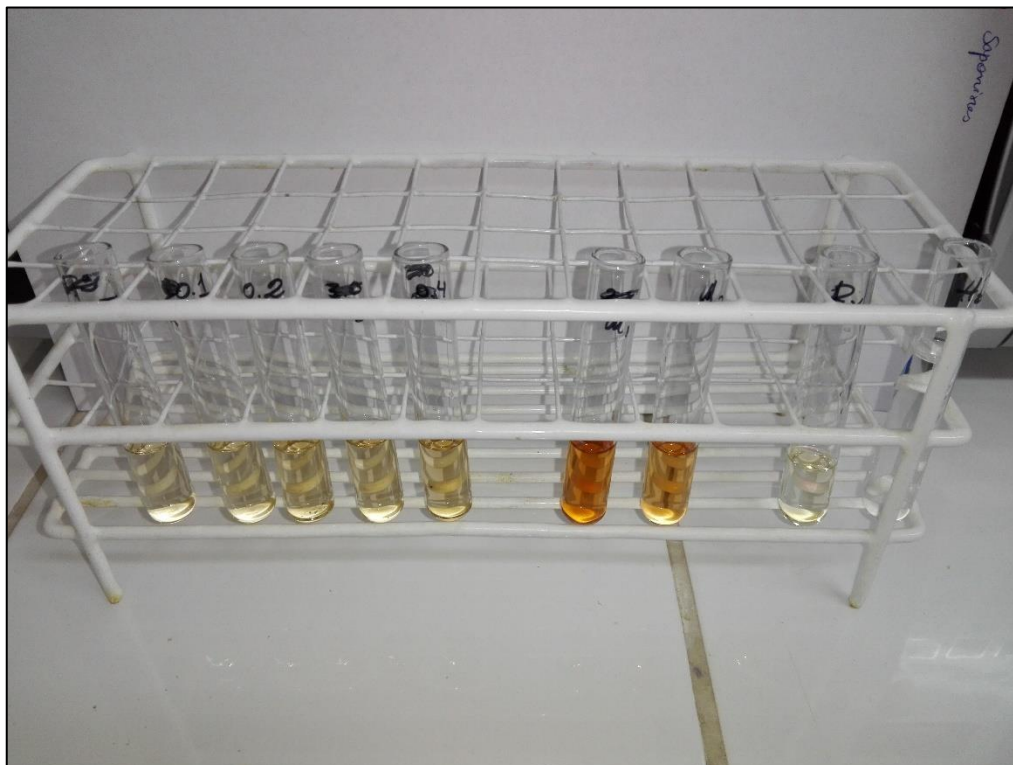
Anexo 14. Pruebas fitoquímicas de las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”. Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



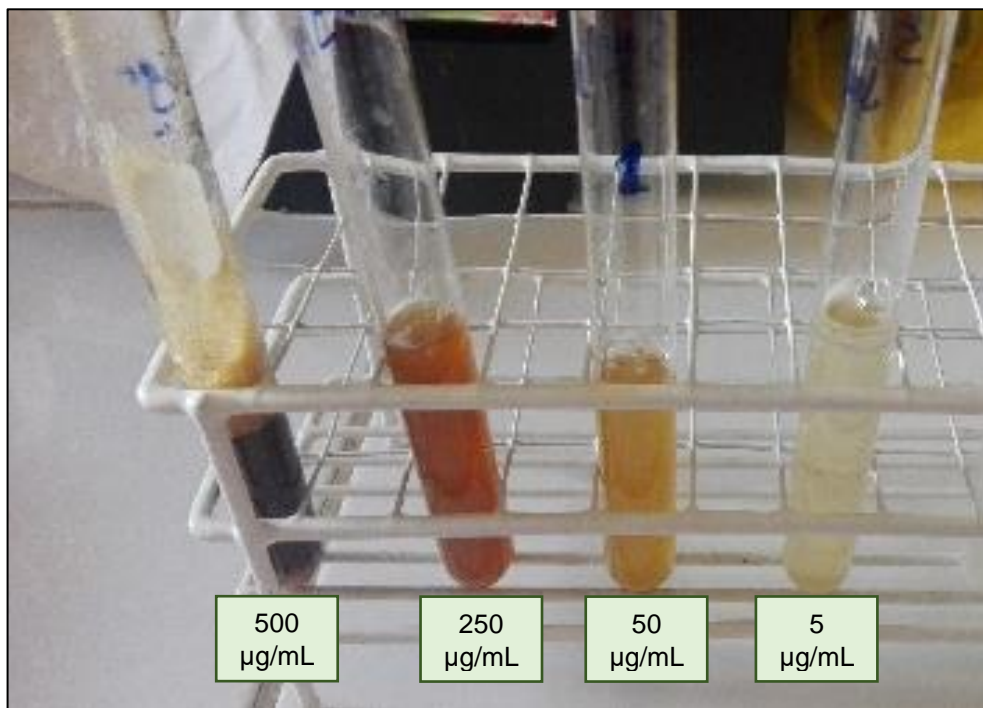
Anexo 15. Determinación del índice hemolítico de las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" (accesión amarilla). Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



Anexo 16. Distintas concentraciones de saponina y solución patrón para determinación de la concentración por método espectrofotométrico. Laboratorio de Bioquímica. Ayacucho 2020.



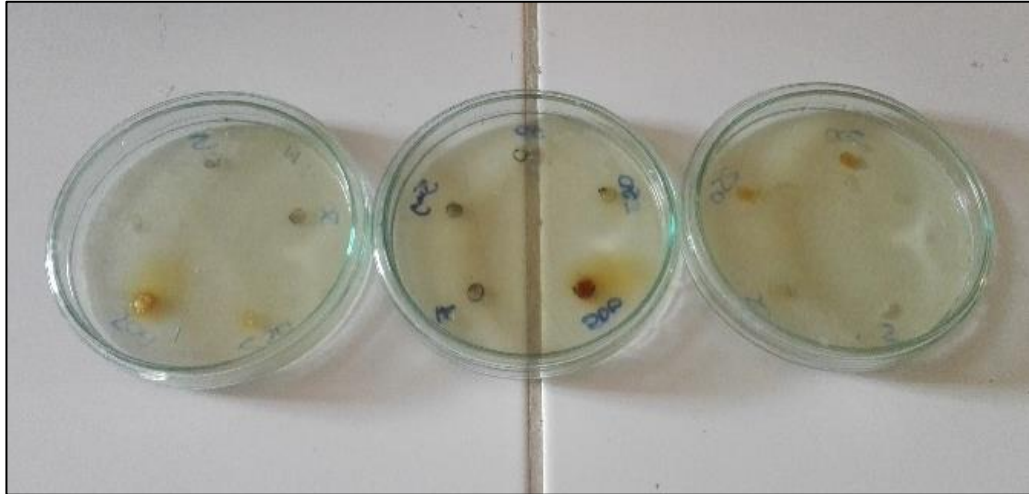
Anexo 17. Distintas concentraciones hidroalcohólicas de saponina para enfrentar a *Candida albicans* ATCC 90028. Ayacucho 2020.



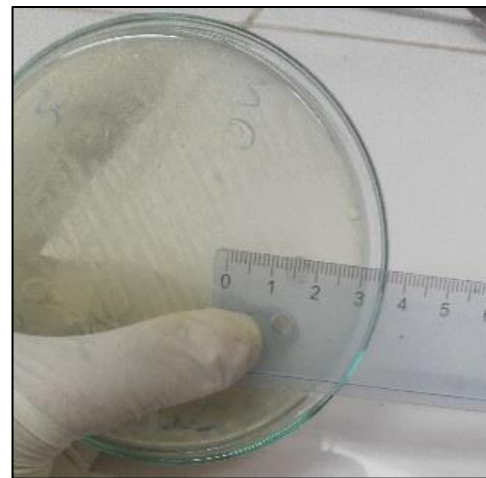
Anexo 18. Cultivo joven de la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028, en Agar Sabouraud y preparación del inóculo con escala de Mc Farland. Ayacucho 2020.



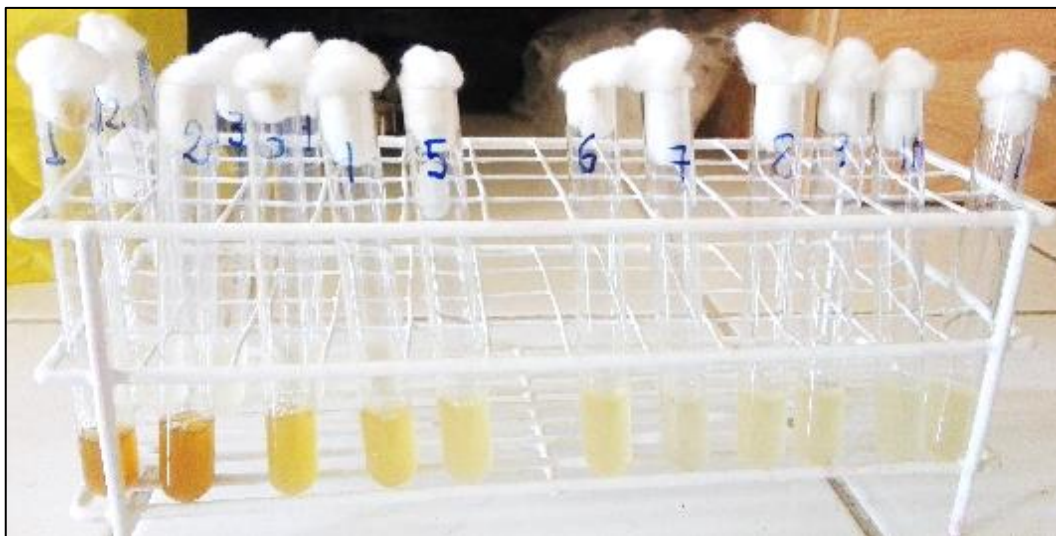
Anexo 19. Inoculación de saponina en los pozos de agar. Ayacucho 2020.



Anexo 20. Medición de los halos de inhibición frente a *Candida albicans* ATCC 90028. Ayacucho 2020.



Anexo 21. Determinación de Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida. Ayacucho 2020.



Anexo 22. Prueba de normalidad de Anderson-Darling. Ayacucho 2020.

Tratamiento	A-cuadrado	Vapor p
250 µg/mL	0,23	0,487
500 µg/mL	0,19	0,631
Fluconazol 15000 µg/mL	0,49	0,057

Anexo 23. Prueba de igualdad de varianzas de Levene. Ayacucho 2020.

Método	Estadística de prueba	Valor p
Levene	0,94	0,441

Anexo 24. Tabla estadística que refleja la media, error estándar y desviación estándar. Ayacucho 2020.

Concentración	Media	Error estándar	de la Desviación media estándar
250 µg/mL	19.33	1.76	3.06
500 µg/mL	27.000	0.577	1.000
Fluconazol	37.333	0.667	1.155
15000 µg/mL			

Anexo 25. Prueba ANVA. Ayacucho 2020.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Valor de p
Entre grupos	489,556	2	244,778	62,943	0,000
Dentro de grupos	23,333	6	3,889		
Total	512,889	8			

Anexo 26. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para los tratamientos de saponinas extraídas de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” frente a *Candida albicans* ATCC 90028. Ayacucho 2020.

Diámetro de halo de inhibición (mm)				
HSD Tukey ^a				
		Subconjunto para alfa = 0.05		
Concentración	N	1	2	3
250 µg/mL	3	19,3333		
500 µg/mL	3		27,0000	
Fluconazol µg/mL	15000	3		37,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Anexo 27. Matriz de consistencia: Actividad antimicótica de saponina de *Chenopodium quinoa* Willd (quinua) frente a *Candida albicans* ATCC 90028. Ayacucho 2020.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	DISEÑO METODOLÓGICO
<p>PROBLEMA GENERAL ¿Cuál es la actividad antimicótica de la saponina de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. Ayacucho 2020?</p>	<p>Objetivo General</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar la actividad antimicótica de las saponinas extraídas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. <p>Objetivos específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> Determinar el porcentaje de inhibición de las saponinas extraídas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. Determinar el nivel de sensibilidad de las saponinas extraídas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida de las saponinas extraídas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. Caracterizar fitoquímicamente y determinar cuantitativamente el contenido de saponinas extraídas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. Determinar el porcentaje de rendimiento y el índice hemolítico de las saponinas extraídas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. 	<p>HIPÓTESIS GENERAL Las saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" poseen actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028.</p>	<p>MARCO TEÓRICO</p> <ol style="list-style-type: none"> La quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd). Factores que afectan el contenido de saponinas en las plantas. Las saponinas de la quinua. Bioactividad de las saponinas de la quinua. Mecanismo de acción de las saponinas frente a <i>Candida albicans</i>. <i>Candida albicans</i>. Cepas ATCC. Determinación de la actividad antimicótica. 	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE: Saponina de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua".</p> <p>VARIABLE DEPENDIENTE: Actividad antimicótica.</p>	<p>TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico-Experimental.</p> <p>DEFINICIÓN DE LA UNIDAD DE ANÁLISIS Y MUESTRA BIOLÓGICA</p> <ul style="list-style-type: none"> Unidad de análisis 10 kilogramos de granos de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" (Accesión amarilla). Muestra biológica Cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028, repicada en medio Agar Sabouraud. <p>METODOLOGÍA Y RECOLECCIÓN DE DATOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Extracción de saponinas. Cuantificación de saponinas. Determinación de la capacidad antimicótica. <p>MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS Fueron elaboradas tablas y figuras estadísticas del tipo descriptivo para poder representar los distintos resultados hallados, los datos del análisis microbiológico fueron sometidos al análisis de varianza simple y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para comparar las variaciones existentes entre los tratamientos, para ello se utilizó el programa SPSS Statistics 26.</p>