



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los alcaloides obtenidos del agua de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet).

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Lizbeth Vanessa López Cevallos

Tutor: Dr. Santiago Esmiro Cadena Carrera

Ambato – Ecuador

Julio - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Santiago Esmiro Cadena Carrera

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 23 de Junio del 2025



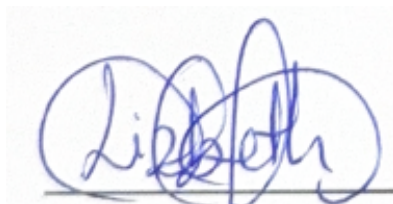
Dr. Santiago Esmiro Cadena Carrera

1715602593

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Lizbeth Vanessa López Cevallos, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Lizbeth Vanessa López Cevallos

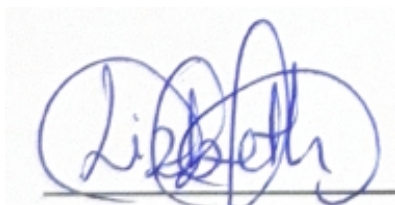
1804535498

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Lizbeth Vanessa López Cevallos

1804535498

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dr. Santiago Casado Rojo

1759126954



Dr. William Ricardo Calero Cáceres

1714348859

Ambato, 07 de Julio del 2025

DEDICATORIA

*Le dedico este trabajo, esta carrera y todo este logró a **María Cevallos** mi madre y a **Rohan Cobos** mi hijo, quienes estuvieron junto a mí en todo momento y con su apoyo incondicional;
brindándome energía, amor y paciencia.
Ya que sin su presencia no lo habría logrado.*

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento más profundo y esencial es al Gran Espíritu, cuya guía, luz y energía me han acompañado en cada paso de este camino.

Extiendo mi sincera gratitud al Dr. Santiago Cadena, mi tutor, por su valiosa orientación, paciencia y constante apoyo, que han sido fundamentales para la culminación de este proyecto.

A mis amigos, quienes me brindaron su ayuda incondicional en los momentos de dificultad académica, y a todas las personas que conocí a lo largo de esta enriquecedora carrera, gracias por compartir conmigo conocimientos, experiencias y compañía.

Me siento inmensamente agradecida por cada paso que me condujo hasta aquí. Cada hora dedicada, cada desafío superado, ha sido parte de este logro.

Gracias, de corazón.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

Contenido

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICES DE FIGURAS	xii
ÍNDICES DE ECUACIONES	xiii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Justificación.....	1
1.1.2. Chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> sweet).....	2
1.1.3. Impacto ambiental del agua residual del desamargado del chocho.	3
1.1.4. Alcaloides.....	3
1.1.5. Alcaloides quinolizidínicos (AQs)	4
1.1.6. Mecanismos de los alcaloides	6
1.1.7. Actividad antimicrobiana.....	6
1.1.7.1. Actividad antibacteriana.....	6
1.1.7.2. Actividad antifúngica	7
1.1.8. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	7
1.1.9. Posibles aplicaciones	7
1.2. Objetivo.....	8
1.2.1. Objetivo General.....	8
1.2.2. Objetivos Específicos	8

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA	8
2.1. Materiales.....	8
2.1.1. Recursos Institucionales	8
2.1.2. Reactivos y material fungible de laboratorio	8
2.1.3. Equipos de laboratorio	10
2.2. Métodos.....	11
2.2.1. Caracterización de los efluentes del agua de desamargado del chocho	11
2.2.1.1. Proceso de desamargado del chocho	11
2.2.1.2. Concentración de solutos y alcaloides	11
2.2.1.3. Determinación de Sólidos totales	12
2.2.1.4. Medición de pH y conductividad	13
2.2.1.5. Determinación de turbidez	13
2.2.1.6. Determinación de Solidos Suspendidos Totales	13
2.2.2. Estimación de alcaloides totales	14
2.2.2.1. Preparación de la curva de calibración	14
2.2.3. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica	15
2.2.3.1. Activación de las cepas	15
2.2.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	16
Dilución del extracto con alcaloides	16
Preparación del Inóculo.....	16
Preparación de las placas de microdilución	16
CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1. Análisis y discusión de resultados	18
3.1.1. Caracterización de los parámetros físico-químicos del extracto del agua de desamargado del chocho	19
3.1.1.1. Determinación de solidos totales (ST).....	19
3.1.1.2. Determinación de pH y Conductividad eléctrica (CE)	21
3.1.1.3. Determinación de la turbidez	22
3.1.1.4. Determinación de solidos suspendidos totales (SST)	23
3.2. Estimación de alcaloides del extracto del agua de desamargado del chocho	24
3.2.1. Análisis de la concentración de alcaloides totales mediante espectrofotometría UV-Vis	24
3.3. Evaluación antibacteriana y antifúngica	26
3.3.1. Análisis de la actividad antibacteriana y antifúngica	26
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	28

4.1. Conclusiones	28
4.2. Recomendaciones.....	29
BIBLIOGRAFIA	29
ANEXOS.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>AQs presentes en el chocho</i>	4
Tabla 2. <i>Materiales de laboratorio.</i>	9
Tabla 3. <i>Equipos de laboratorio usados.</i>	10
Tabla 4. <i>Detalle de cómo se clasificaron cada muestra</i>	11
Tabla 5. <i>Demostración del uso de los pocillos de cada muestra</i>	17
Tabla 6. <i>Resultado de la masa del extracto seco</i>	19
Tabla 7. <i>Resultados de ST de las muestras analizadas</i>	20
Tabla 8. <i>Resultados de pH de las muestras analizadas</i>	21
Tabla 9. <i>Resultado de CE de las muestras analizadas</i>	21
Tabla 10. <i>Resultados de turbidez de las muestras analizadas</i>	22
Tabla 11. <i>Resultados de SST de las muestras analizadas</i>	23
Tabla 12. <i>Estimación de la concentración de alcaloides totales de las muestras analizadas</i>	24
Tabla 13. <i>Estimación de la concentración de alcaloides totales en 5 L de agua de desamargado de chocho</i>	25
Tabla 14. <i>Estimación de la concentración de alcaloides totales en 12 L de agua de</i>	25

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación antibacteriana frente a <i>E. coli</i> de las muestras M1, M2 y M3 respectivamente.....	26
Figura 2. Evaluación antifúngica frente a <i>S. cerevisiae</i> de las muestras M1, M2 y M3 respectivamente.....	27
Figura 1A. Proceso de desamargado y tradicional del chocho	34
Figura 2A. Muestras secas despues de 7 dias en la estufa a 40°C	35
Figura 3A. Parametros fisico quimicos.....	35
Figure 4A. Proceso de curva de calibración y extracción de alcaloides	36
Figura 5A. Activación de la bacteria <i>E. coli</i> en PCA.....	36
Figura 6A. Curva de calibración de alcaloides totales	37

ÍNDICES DE ECUACIONES

Ecuación 1. <i>Rendimiento del extracto</i>	12
Ecuación 2. <i>Solidos Totales</i>	12
Ecuación 3. <i>Solidos suspendidos totales</i>.....	14
Ecuación 4. <i>Concentracion final de los alcaloides totales</i>.....	24

RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto aborda la valorización del agua residual del desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet), un subproducto comúnmente desechado que contiene compuestos bioactivos con potencial antimicrobiano. Dada la creciente preocupación ambiental por el manejo de residuos agroindustriales y la búsqueda de alternativas sostenibles en el control de microorganismos, esta investigación propone aprovechar los alcaloides presentes en dicho efluente como agentes antimicrobianos, contribuyendo tanto al desarrollo biotecnológico como a la reducción del impacto ambiental. La metodología consistió en la recolección de tres muestras de chocho seco (5 libras cada una), sometidas a procesos de hidratación, cocción y lavado por cinco días. Los extractos fueron caracterizados fisicoquímicamente y se estimó la concentración de alcaloides mediante espectrofotometría UV-Vis a partir de una curva de calibración. Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana de cada extracto frente a *Escherichia coli* (bacteria) y *Saccharomyces cerevisiae* (hongo) resultando que, a una concentración de 500 microgramos por mililitro del extracto, se registró inhibición de los microorganismos. Los resultados preliminares sugieren que los alcaloides del agua de desamargado poseen actividad antimicrobiana moderada, lo cual evidencia su potencial para el desarrollo de productos naturales con aplicaciones farmacéuticas o agrícolas. Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones sobre la purificación de compuestos activos y su aplicación a mayor escala, proponiendo una estrategia sustentable para el manejo de residuos agroindustriales.

Palabras clave: Chocho, *Lupinus mutabilis*, alcaloides quinolizidínicos, actividad antibacteriana, actividad antifúngica.

ABSTRACT

This project addresses the valorization of wastewater generated from the debittering process of *Lupinus mutabilis* (chocho), a commonly discarded byproduct that contains bioactive compounds with antimicrobial potential. Given the growing environmental concern regarding agro-industrial waste management and the search for sustainable alternatives to microbial control, this research aims to utilize the alkaloids present in this effluent as antimicrobial agents, contributing to both biotechnological development and environmental impact reduction. The methodology involved collecting three samples of dried *L. mutabilis* seeds (5 pounds each), which underwent hydration, boiling, and washing for five days. The resulting extracts were subjected to physicochemical characterization, and the alkaloid concentration was estimated by UV-Vis spectrophotometry using a calibration curve. Subsequently, the antimicrobial activity of each extract was evaluated against *Escherichia coli* (bacterium) and *Saccharomyces cerevisiae* (yeast), showing growth inhibition at a concentration of 500 micrograms per milliliter of extract. Preliminary results suggest that the alkaloids in debittering wastewater exhibit moderate antimicrobial activity, highlighting their potential for the development of natural products with pharmaceutical or agricultural applications. This study lays the groundwork for future research focused on the purification of active compounds and their large-scale application, proposing a sustainable strategy for agro-industrial waste management.

Keywords: Lupin, *Lupinus mutabilis*, quinolizidine alkaloids, antibacterial activity, antifungal activity.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación

En los últimos años el creciente interés por la alimentación saludable y el consumo de productos naturales ha impulsado la producción del chocho (*Lupinus mutabilis*), un cultivo andino con alto valor nutricional (**Guilengue, 2021**). No obstante, el consumo directo se ve limitado por la presencia de alcaloides quinolizidínicos (AQs) en este grano. Sin embargo, **Villacres (2011)** comenta que este proceso de desamargado implica el uso intensivo de grandes cantidades de agua, lo cual genera un impacto significativo en el uso de recursos hídricos además del impacto ambiental de esa agua, si la misma no es tratada previa a su liberación.

Se estima que, para una producción anual de 75.000 quintales de chocho en Ecuador, se requieren aproximadamente 405 millones de litros de agua para el desamargado, que luego se desechan sin tratamiento (**Escobar, 2023**). Esta práctica no solo representa un impacto ambiental por el desperdicio de un recurso vital, sino que también plantea riesgos por la liberación de compuestos tóxicos en cuerpos de agua, afectando a organismos acuáticos y ecosistemas (**Jarrin, 2003**).

De acuerdo a estudios recientes los AQs presentan importantes actividades biológicas. Compuestos como: lupanina, esparteína y cistina han demostrado actividad antibacteriana y antifúngica significativa frente a cepas como *Fusarium spp.*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (**Cely-Veloza et al., 2022**). Específicamente, compuestos como la lupanina, la esparteína y la cistina han mostrado efectos significativos frente a distintos patógenos. Este potencial biotecnológico plantea una oportunidad de aprovechamiento del agua residual del desamargado como fuente secundaria de metabolitos con aplicaciones en salud, agricultura o industria alimentaria (**Thawabteh et al., 2019**).

Por otro lado, **Dey et al. (2020)** comentan que la extracción y recuperación de alcaloides mediante métodos clásicos como la extracción líquido-líquido utilizando solventes orgánicos han sido eficaces para la recuperación de alcaloides, lo que permite conservar la integridad de los compuestos (**Herraiz et al., 2011**), sin embargo el uso de solventes orgánicos presenta un riesgo para el medio ambiental y para el ser humano, puesto que los

mismos en su mayoría presentan toxicidad, por lo que actualmente se buscan alternativas al uso de este tipo de solventes.

Por lo anteriormente expuesto, en este estudio se propone evaluar el contenido de alcaloides recuperados presentes en el agua de desamargado del chocho, así como analizar su actividad antimicrobiana.

1.1.2. Chocho (*Lupinus mutabilis* sweet)

El chocho es una leguminosa, del género *Lupinus* el cual pertenece a la familia fabaceae y es considerado uno de los granos más cultivado principalmente en Australia, América Latina, Europa Central y Oriental (**Romeo et al., 2018**). El chocho ha sido utilizado principalmente como una fuente importante de proteína (17,3 g), grasas (17,5 g), fibra (3,8 g), calcio (54 mg) por 100 g de chocho; inclusive mayor al de la soja (**Rodriguez, 2009**). El género *Lupinus* consta de alrededor de 300 a 400 especies distribuidas y cultivadas entre los 2.500 a 3.400 m.s.n.m., ya que tiene mayor capacidad de adaptación a suelos ácidos (**Carvajal et al., 2016**).

Según **Chalampunte Flores et al. (2023)** en Ecuador hay dos variedades mejoradas desarrolladas desde un germoplasma peruano, el cual fue introducido en 1992, la variedad INIAP-450-Andino y la variedad INIAP-451-Guaranguito. Debido al perfil nutricional, el chocho tiene una alta demanda de consumo y producción; **Escobar (2023)** reporta que la producción total de chocho en Ecuador ha incrementado gradualmente, alcanzando 55 t en 2023, con proyecciones de 60 t para 2024 y 65 t para 2025.

Sin embargo, a pesar de sus atributos nutricionales, el género *Lupinus* presenta compuestos considerados factores antinutricionales (FAN), siendo los alcaloides quinolizidínicos los más relevantes debido a su toxicidad y sabor amargo. Por esta razón, las semillas requieren un proceso previo de desamargado para el consumo humano y animal. Este procedimiento, tradicionalmente realizado mediante remojo, cocción y lavados sucesivos, implica un alto consumo de agua (**Villacres, 2011**). De acuerdo con la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2389:2005, se estima que se requieren entre 54 y 63 L de agua por cada kilogramo de semilla para eliminar eficazmente los alcaloides (**INEN, 2005**). Esta situación se agrava por el hecho de que el cultivo del chocho en Ecuador ocupa una porción significativa del área agrícola andina, como lo evidencia el III Censo Nacional Agropecuario, señalando que

la mayoría de la superficie sembrada con esta leguminosa se dedica exclusivamente a este cultivo (INEC, 2011).

1.1.3. Impacto ambiental del agua residual del desamargado del chocho.

El proceso de eliminación del sabor amargo del chocho, produce un residuo líquido con una considerable carga química, resultado de la remoción de alcaloides. Normalmente, este procedimiento inicia con el remojo de las semillas, seguido de una cocción y varios lavados sucesivos durante varios días, utilizando grandes cantidades de agua por cada kg de chocho (Villacres, 2011). Investigaciones recientes han demostrado que el agua resultante de este proceso contiene altos niveles de compuestos bioactivos como lupanina y esparteína, los cuales pueden pasar al ambiente acuático y permanecer sin degradarse fácilmente, representando un riesgo ambiental si se desechan sin tratamiento adecuado (Romeo et al., 2018). Sin embargo, en Ecuador es común que este efluente se vierta directamente en la tierra o en sistemas de alcantarillado, sin ningún tipo de tratamiento o aprovechamiento, sobre todo en pequeños negocios familiares dedicados al procesamiento del chocho para consumo local (Carrión et al., 2008).

Estudios realizados en el país han analizado las características fisicoquímicas de esta agua residual, detectando altos niveles de conductividad eléctrica, turbidez, compuestos nitrogenados y un pH cercano a neutro o ligeramente ácido (Jarrin, 2003). Además, la presencia de alcaloides en concentraciones que pueden alcanzar hasta 0.5 mg/mL convierte a este residuo en una amenaza para los suelos agrícolas y las fuentes de agua superficial si se utiliza para riego o se descarga sin control (Parra et al., 2022). Por ello, aprovechar esta agua como fuente de metabolitos bioactivos con potencial antimicrobiano no solo ayudaría a reducir el impacto ambiental, sino que también permitiría aplicar principios de economía circular en la agroindustria del chocho en Ecuador.

1.1.4. Alcaloides

Los alcaloides son compuestos nitrogenados de origen natural, producidos principalmente por plantas como metabolitos secundarios. Estos compuestos cumplen funciones ecológicas esenciales, actuando como mecanismos de defensa frente a herbívoros, insectos y microorganismos patógenos (González et al., 2020). Su diversidad estructural les

confiere una amplia gama de actividades biológicas, entre las que se incluyen propiedades analgésicas, estimulantes, antimicrobianas y pesticidas (Romeo et al., 2018).

En el género *Lupinus* se destacan los alcaloides quinolizidínicos (AQs), caracterizados por la presencia de un anillo quinolizidínico en su estructura. Estos compuestos son responsables del sabor amargo y de la toxicidad de las semillas de lupino, lo cual limita su consumo directo. No obstante, investigaciones recientes han explorado sus posibles aplicaciones farmacológicas y agrícolas debido a sus propiedades bioactivas (Dey et al., 2020)

Según Cely-Veloza et al., (2023) entre 1990 y 2023 se han registrado 397 estructuras químicas de alcaloides, en el caso de los pertenecientes al grupo de los AQs se clasifican en cinco tipos principales: tipo matrinal (13.6%), tipo lupinina (12.1%), tipo lupanina (9.8%), bisquinolizidinas macrocíclicas (9.3%) y bifenilo (éter) quinolizidina lactonas (7.1%). En el caso específico del chocho, los alcaloides más abundantes corresponden al grupo de los quinolizidínicos.

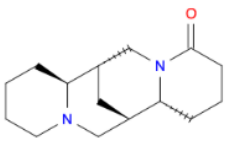
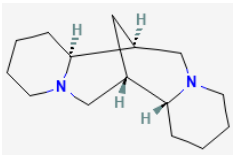
1.1.5. Alcaloides quinolizidínicos (AQs)

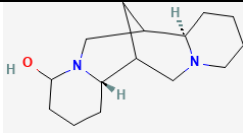
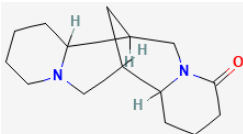
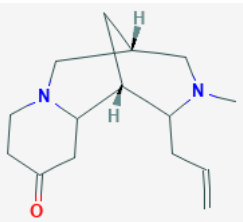
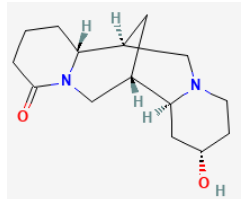
Los AQs son una clase de alcaloides derivados de la L-lisina, con más de 170 estructuras químicas, estas se encuentran principalmente en la familia de las leguminosas (Mancinotti et al., 2022).

Los AQs que más predominan en el chocho se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1.

AQs presentes en el chocho

Alcaloide	Porcentaje	Estructura
Lupanina	46%	
Esparteína	14%	

4-hidroxilupanina	10%	
Isolupanina	3%	
N-metilangustifolina	3%	
13-hidroxilupanina	1%	

Fuente: (Arias et al., 2019) y (National Center for Biotechnology Information. 2025)

Los AQs son compuestos nitrogenados heterocíclicos que se encuentran principalmente en especies del género *Lupinus*, como *Lupinus mutabilis* (chocho) (Wink, 2015a). Estructuralmente, se caracterizan por la presencia de un anillo tetracíclico, y su función principal en la planta es actuar como defensa química contra herbívoros, insectos y patógenos (Wink, 2013).

Estos compuestos presentan una toxicidad significativa para humanos y animales. Se ha documentado que dosis de aproximadamente 30 mg/kg pueden causar alteraciones neurológicas como convulsiones, pérdida de coordinación y parálisis respiratoria (Avilés & Flores, 2018). Además, alcaloides como la anagirina han mostrado efectos teratogénicos en animales gestantes (Wink, 2015b). La concentración de alcaloides en las semillas puede variar entre 2,8% y 4,5%, lo que obliga a aplicar procesos de desamargado antes del consumo (Rodés & Van der Fels-Klerx, 2023).

Este proceso libera los alcaloides al agua, generando un residuo líquido con alta carga química. Cuando esta agua es descartada sin tratamiento, puede contaminar suelos agrícolas y cuerpos de agua, con implicaciones ecológicas importantes. La vida media de los AQs en el suelo se ha estimado entre 36 y 60 días; se han detectado trazas de AQs en suelos superficiales a diversas profundidades: entre 0-5 cm (0,1-10 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) y 15-30 cm (0,2-8,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) (Barroso. 2010; Hama & Strobel, 2020).

1.1.6. Mecanismos de los alcaloides

Estos compuestos desempeñan un papel crucial en la defensa de las plantas contra herbívoros y patógenos, actuando como mecanismos de defensa química que contribuyen a la adaptabilidad de las plantas en entornos adversos **(Wink & Twardowski, 1992)**. Desde una perspectiva bioquímica, los AQs interfieren en múltiples procesos celulares fundamentales. Se ha demostrado que afectan la síntesis de proteínas, el transporte de membrana y la actividad enzimática, lo que puede resultar en la inhibición del crecimiento y desarrollo de organismos que interactúan con la planta **(Mancinotti et al., 2022)**.

A nivel molecular, los AQs pueden interactuar con grupos funcionales de aminoácidos en proteínas, alterando su función. Esta capacidad de modificar la estructura y actividad de proteínas esenciales permiten que actúen como un agente defensivo en la planta **(Wink & Twardowski, 1992)**.

En el sistema nervioso de insectos y otros invertebrados, los AQs pueden actuar como antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina, bloqueando la transmisión sináptica y provocando efectos neurotóxicos que incluyen parálisis y muerte. Este mecanismo de acción ha sido observado en compuestos como la esparteína y la lupanina, presentes en especies de *Lupinus* **(Wink, 2015b)**.

Además de su función en la defensa vegetal, algunos AQs han sido estudiados por sus propiedades farmacológicas. Por ejemplo, la esparteína ha mostrado actividad antiarrítmica y ha sido utilizada en el tratamiento de ciertas condiciones cardíacas, aunque su uso clínico ha disminuido debido a preocupaciones sobre su toxicidad y efectos secundarios **(Wink, 2015a)**.

1.1.7. Actividad antimicrobiana

1.1.7.1. Actividad antibacteriana

Los AQs han demostrado tener una actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos. En este caso el género *Lupinus* contiene la esparteína, la cual ha demostrado efectos bacteriostáticos contra *Mycobacterium tuberculosis* **(Hidalgo et al., 2022)**. Los AQs han sido evaluados ante microorganismos ATCC, ya que sus compuestos pueden actuar como una defensa química ante bacterias patógenas, lo que hace, que los AQs sean excelentes agentes antimicrobianos **(Rodríguez, 2009)**. Los AQs pueden inhibir la síntesis proteica bloqueando la formación de ribosomas bacterianos, los cuales son esenciales para la traducción de proteínas **(Sepúlveda et al., 2003)**.

1.1.7.2. Actividad antifúngica

Por otro lado, los AQs exhiben una actividad antifúngica haciéndolos útiles ante un control contra hongos fitopatógenos, como: *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii* (**Bernal et al., 2005**). La actividad antifúngica de los AQs permitiría que sean utilizados en aplicaciones agrícolas para controlar enfermedades causadas por hongos o en la medicina para tratar infecciones fúngicas (**De la Cruz et al., 2016**).

1.1.8. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI es un parámetro esencial en microbiología que evalúa la eficacia de los agentes antimicrobianos, incluidos los alcaloides, que han demostrado ser potentes inhibidores del crecimiento microbiano debido a sus propiedades bioactivas (**Lizcano y Vergara, 2008**). Se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de un período de incubación, generalmente entre 18 y 72 horas (**Rodríguez et al., 2022**). La CMI es crucial para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a diferentes antimicrobianos, lo que ayuda a seleccionar el tratamiento más adecuado y a prevenir la resistencia microbiana (**Kowalska & Dudek, 2021**). En este sentido, identificar la CIM de alcaloides, ofrece un enfoque innovador y sostenible, ya que estos compuestos naturales podrían evitar la resistencia en comparación con los antibióticos sintéticos o naturales tradicionales, lo que los convierte en una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos tratamientos antimicrobianos.

1.1.9. Posibles aplicaciones

Los AQs presentan un amplio espectro de potenciales aplicaciones gracias a sus destacadas propiedades farmacológicas. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos poseen actividades biológicas relevantes, tales como anticancerígenos, antiinflamatorios, antifibróticos, antivirales y antioxidantes (**Zhang et al., 2023**). Estas características los posicionan como candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos y productos biológicos orientados a la salud humana, agrícola, productos cosméticos e industria farmacéutica (**Romeo et al., 2018**).

Además, su actividad antiinflamatoria y antioxidante abre la posibilidad de incorporarlas en formulaciones nutracéuticas, contribuyendo así a la promoción de la salud y el bienestar. Por otro lado, las aplicaciones de las AQs no se limitan al campo médico, en la agricultura sostenible estos compuestos pueden emplearse como insecticidas y fungicidas naturales,

representando una alternativa ecológica frente a los pesticidas sintéticos tradicionales. Su menor toxicidad y menor impacto ambiental, cuando se usan en cantidades adecuadas, los convierten en herramientas valiosas para prácticas agrícolas más sostenibles (**Cely-Veloza et al., 2023; Carrión et al., 2008; Villacres, 2011**).

1.2.Objetivo

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el contenido de alcaloides y la actividad antimicrobiana del extracto recuperado del agua de desamargado del chocho.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar los siguientes parámetros físico-químicos del extracto del agua de desamargado del chocho: pH, conductividad, turbidez, SST mediante técnicas potenciométricas.
- Estimar el contenido total de alcaloides en el extracto del agua de desamargado de chocho mediante espectrofotometría UV-Vis a 435 nm utilizando la quinina como estándar.
- Analizar la actividad antibacteriana y antifúngica de los alcaloides frente a las cepas *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1.Materiales

2.1.1. Recursos Institucionales

Este proyecto de titulación tuvo un enfoque experimental y se realizó en los laboratorios académicos y de investigación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

2.1.2. Reactivos y material fungible de laboratorio

En la Tabla 2 se describen los reactivos y el material fungible que se utilizó en el proyecto.

Tabla 2.*Materiales de laboratorio.*

Material	Cantidad
Reactivos	
Medio Luria Bertani (LB)	2,05 g
Peptona de caseína	2,05 g
Dextrosa	2,05 g
Extracto de Levadura	1,025 g
Resazurina	0,0211 g
Agua destilada	3 L
Medio PCA	2,05 g
Glucosa	10 mL
Alcohol 70%	4 L
Alcohol 90%	3 L
Fosfato monosódico	0,69 g
Fosfato disódico	0,269 g
Cloroformo	200 mL
Acetona	240 mL
Material Fungible	
Vasos de Precipitación	15
Varillas de Agitación	3
Espátula	3
Placas Petri estériles	100 unidades
Puntas micropipeta (10 µL)	1 caja
Puntas micropipeta (200 µL)	1 caja
Puntas micropipeta (1000 µL)	1 caja
Tubos Falcon 15 mL	40 unidades
Placas de microtitulación 96 pocillos	6 unidades
Cubetas Cuarzo UV/ VIS	15

Gradillas para tubos de microcentrífuga	2
Mecheros de Alcohol	2
Matraces Erlenmeyer (25mL)	6
Papel filtro	1
Papel aluminio	1
Pisetas	2
Embudos de separación	5

2.1.3. Equipos de laboratorio

En la Tabla 3 se mencionan los equipos de laboratorio que se utilizaron en el proyecto.

Tabla 3.

Equipos de laboratorio usados.

Equipos	
Autoclave Hirayma/HV-110	1
Cabina de Bioseguridad flujo laminar Tipo I	1
Incubadora	1
Agitador incubador orbital Shaker mini-Benchmarle	2
Autoclave Hirayma/HV-110	1
Balanza analítica Adventurer	1
Centrífuga	1
Espectrofotómetro	1
Nevera (4 °C)	1
Micropipeta 2-20 µL	1
Micropipeta 100-1000 µL	1
Vortex	1
pH – metro	1
Conductímetro	1
Turbidímetro	1
Estufa	1

2.2.Métodos

2.2.1. Caracterización de los efluentes del agua de desamargado del chocho

2.2.1.1.Proceso de desamargado del chocho

Para la obtención del agua de desamargado del chocho se siguió la metodología de **Castañeta et al. (2022)** y **Galek et al. (2017)**, primero el chocho fue adquirido en el mercado de la ciudad de Pelileo y se obtuvo 15 lb de chocho, debido a que se realizaron 3 réplicas de 5 lb cada una, y se clasificó el chocho considerando la norma NTE INEN 2390:2004, (Leguminosas. Grano desamarrado de chocho. Requisitos.).

El proceso tradicional de desamargado consistió en: separar en 3 lotes de 5 lb cada uno para obtener las réplicas, como se muestra en la Tabla 4. La fase 1 consistió en colocar 5 lb de chocho en 12 L de agua durante 24 horas para su hidratación. Fase 2, transcurridas las 24 h se procedió a la cocción de los granos durante 1 hora con una cantidad de 12 L de agua, es decir, hasta que cubra toda la superficie de los chochos colocados en una olla de 20 L. Fase 3, luego se procedió a lixiviar los granos durante 5 días cambiando el agua cada 24 horas, este método es utilizado para eliminar los alcaloides que se quedan presentes en las semillas. De cada muestra de 12 L de agua se recolectó 5 L de agua de cada fase para someterla a los diferentes análisis.

Tabla 4.

Detalle de cómo se clasificaron cada muestra

Fase 1 - Hidratación	M1	M2	M3
Fase 2 – Cocción	M1	M3	M3
Fase 3 – Lavado diario	M1	M3	M3

2.2.1.2.Concentración de solutos y alcaloides

Se realizó de acuerdo a **Komonsing et al. (2022)**, quienes indican que uno de los métodos más simples para concentrar los compuestos de una sustancia es el secado a temperaturas para preservar las propiedades biológicas. Para ello, primeramente, se concentraron los solutos contenidos en el agua de desamargado, colocando los 5 L de agua en un molde de aluminio y se llevó a una estufa (Binder, ED400, Suiza) a 40°C

durante 72 horas. Al transcurrir el tiempo el volumen de 5 L se redujo a 100 mL para realizar los análisis correspondientes o para su secado total. Según **Chaluisa & Jimenez (2021)** indican que el rendimiento del extracto seco se puede calcular mediante la ecuación 1.

Ecuación 1.

Rendimiento del extracto

$$\text{Rendimiento \%} = \left(\frac{\text{Masa del extracto seco (g)}}{\text{Cantidad total de chocho seco (g)}} \right) * 100$$

2.2.1.3.Determinación de Sólidos totales

Para realizar las pruebas de sólidos totales, se utilizó el método gravimétrico 2540 C de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992)*. Primero, se secaron los crisoles en la estufa a 105 °C durante 2 horas, luego se sacaron los crisoles y se dejaron en un desecador por 1 hora, seguido se registró el peso inicial de los crisoles. Posteriormente, se colocaron en los crisoles el agua que se obtuvo luego de las 72 h en la estufa, para que pueda secarse por completo y se verifico su masa, después se enfriaron los crisoles en un desecador por 2 horas. Por último, se registró la masa final de cada crisol y se obtuvo un extracto seco. Los sólidos totales, presentes en el agua, se calcularon mediante la fórmula mencionada en el método 2 540 C. Ecuación (1).

Ecuación 2.

Solidos Totales

$$\text{Solidos Totales} = \frac{(A-B)}{V} \quad (1)$$

Donde:

A= masa del crisol + residuo seco

B= masa del crisol

V= volumen de la muestra en L

2.2.1.4. Medición de pH y conductividad

El pH se midió utilizando el pH-metro (Mettler Toledo, Seven Compact, Suiza). Para ello, se colocó 3 g del extracto seco en un vaso de precipitación y se añadió 30mL de agua destilada a cada una de las muestras, y se sumergió el electrodo sin que toque el fondo, esperando a que la lectura se estabilizara. Al finalizar, se enjuagó el electrodo con abundante agua destilada y se lo colocó en un buffer de referencia. Se aplicó la misma metodología para medir la conductividad, expresada en unidades de $\mu\text{S}/\text{cm}$ o mS/cm (Castro, 2012). Se realizó la medición por triplicado de cada muestra.

2.2.1.5. Determinación de turbidez

Para la medición de la turbidez se utilizó un turbidímetro (Turbidity Meter, BEP-TB100, China), el cual se manejó de acuerdo al método nefelométrico 2130 B de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1992). Para ello, se colocó 3 g del extracto en un vaso de precipitación y se añadió 30mL de agua destilada en cada uno de los vasos, luego se llenó la celda de turbidez hasta la marca establecida evitando crear burbujas. Se realizó la medición y el resultado obtenido fue en NTU (unidades nefelométricas).

2.2.1.6. Determinación de Sólidos Suspendidos Totales

Para realizar las pruebas de sólidos suspendidos totales, se utilizó el método gravimétrico 2540 D de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1992). Primero, se secaron los filtros de fibra de vidrio en la estufa a 105 °C durante 1 hora, luego se colocó en el desecador para alcanzar la temperatura ambiente por 30 minutos y se pesó el filtro vacío en una balanza analítica, luego se colocó el filtro en el embudo Buchner con el lado rugoso hacia arriba. Posteriormente, se preparó una solución con 5g en 50 mL de agua destilada estéril y se colocó en el embudo Buchner, se encendió la bomba de vacío y se vertió la solución cuidadosamente sobre el filtro, lentamente para no obstruir el filtro y procurando que el agua caiga en la zona central del filtro sin llegar a los bordes. Después, se llevó el filtro a una estufa a 105 °C por 24 horas, luego se enfrió en un desecador por 30 minutos y se pesó en una balanza analítica. Ecuación (2) fue utilizado para el cálculo de sólidos suspendidos totales presentes en el agua.

Ecuación 3.

Solidos suspendidos totales

$$\text{Solidos suspendidos totales} = \left(\frac{A-B}{V} \right) \quad (2)$$

Donde:

A= masa del filtro + extracto seco

B= masa del filtro limpio en mg

V= volumen de muestra en L

2.2.2. Estimación de alcaloides totales

Para la estimación de alcaloides totales en el agua de desamargado del chocho, se usó la metodología de **Prajapati et al. (2024)** en la cual se debe realizar la extracción de alcaloides y la cuantificación mediante una curva de calibración con un estándar mediante la aplicación de la espectrofotometría UV-Vis (Fisher Scientific, ACCUSKAN GO, Pittsburgh, Pensilvania, USA).

2.2.2.1.Preparación de la curva de calibración

Inicialmente se prepararon las soluciones necesarias para realizar el ensayo adecuadamente. **Tampón fosfato – 4,7 pH:** se preparó el tampón fosfato a un pH de 4,7, para ello se mezcló 0,69 g de fosfato monosódico en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitación. Luego se realizó una solución con 0,268 g de fosfato disódico en 100 mL de agua destilada en un vaso de precipitación. Una vez preparadas las 2 soluciones se llevó la solución de fosfato monosódico al pH-metro (Mettler Toledo, Seven Compact, Suiza) para ajustar al pH establecido, posteriormente se añadió gota a gota la solución de fosfato disódico hasta obtener el pH de 4,7.

Indicador verde de bromocresol (BCG): Se preparó una solución de BCG a una concentración de 1% en etanol.

Para realizar la curva de calibración se tomó alícuotas de 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1 mL de la solución estándar de alcaloides atropina con una concentración de 1g/10mL y transfirió cada alícuota a un embudo de separación, para el blanco se debe realizar el mismo procedimiento sin la adición de una alícuota del estándar de alcaloide. A

continuación, se añadió 5 mL de BCG y 5 mL de tampón fosfato a cada alícuota y se mezcló enérgicamente junto a 1, 2, 3 y 4 mL de cloroformo, cada extracto se recolectó en un matraz de 10 mL y se aforó con cloroformo. También se midió la absorbancia del complejo de cloroformo a la longitud de onda establecida.

2.2.2.2.Extracción de alcaloides de cada muestra

Se realizó la extracción de los alcaloides de cada muestra, para ello se disolvió 1g del extracto en 20mL de agua destilada y luego se añadió 80 mL acetona. Una vez obtenida la solución se llevó a una centrifugación de 1.000 rpm por 15 min, luego se recolectó 1mL del sobrenadante y se colocó en un embudo de separación. Se realizó 3 lavados con 10 mL de cloroformo a cada alícuota de cada muestra. A continuación, se añadió 5 mL de Verde de Bromocresol (BCG) y 5 mL de tampón fosfato (4,7 pH) y se agitó enérgicamente, lo que permitió que se pudiera extraer el complejo formado con 1, 2, 3 y 4mL de cloroformo. Se recolectó los extractos en un matraz de 10 mL y se aforó con cloroformo hasta los 10 mL. Se midió la absorbancia del complejo de cloroformo a la longitud de onda establecida.

2.2.3. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica

2.2.3.1.Activación de las cepas

Escherichia coli

Las cepas de *E. coli* (J53) fueron donadas por el laboratorio de FCIAB de la Universidad Técnica de Ambato. Para su activación se inoculó una pequeña cantidad de la cepa congelada de *E. coli* en una placa con agar PCA e incubó a 37°C durante 24 h hasta obtener colonias. Luego con un asa bacteriológica se recolectó 1 – 2 colonias y se colocó en 100 mL de medio L-B líquido. Finalmente, se incubó a 37°C con una agitación continua (200 rpm) durante 24 horas para su crecimiento.

Saccharomyces Cerevisiae

La actividad antifúngica se realizó con la de cepa *S. cerevisiae*, “Levapan” levadura activa seca. Primero se mezcló 0,5 g de sacarosa en 10 mL de agua destilada tibia (alrededor de 37°C). Luego se agregó 1 g de levadura seca a la mezcla y se revolvió cuidadosamente para disolver la sacarosa y la levadura. Una vez obtenida la mezcla se dejó en reposo por 5 – 10 min. Durante este tiempo la levadura empezó a activarse,

produciendo burbujas de dióxido de carbono, lo que indicó su actividad fermentativa. Para luego añadirla en 100 mL de medio YEPD líquido, para llevarla a incubación a una temperatura de 28°C y con agitación continua (150 rpm) durante 24 - 48 horas para reactivar las células.

2.2.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Dilución del extracto con alcaloides

Para la determinación de la CMI, se preparó una solución stock del extracto obtenido, se pesó 1g del extracto seco y se colocó en 10mL de agua destilada estéril, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en tubos Falcon estériles usando agua destilada estéril, preparando un rango de concentraciones del extracto desde 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL (**Mazzola et al., 2009**).

Preparación del Inóculo

E. coli: se ajustó a una turbidez de McFarland de 0.5 ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) o una absorbancia de 0,08 – 0,1 (**Mazzola et al., 2009**). Para ello se colocaron 100 µL del medio inoculado en el medio L-B en un matraz de 25mL hasta llegar a la absorbancia establecida de la escala de McFarland, para controlar que el inóculo se encuentre en la concentración requerida, se realizó una medición en espectrofotómetro a 625nm con un blanco del medio L-B.

S. Cerevisiae: se ajustó a la escala de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL analizando la absorbancia mediante espectrofotometría de acuerdo a (**Mazzola et al., 2009**). Para ello se colocaron 100 µL del medio inoculado en un medio YEPD en un matraz de 25 mL hasta llegar a la absorbancia establecida de la escala de McFarland, para controlar que el inóculo se encuentre en la concentración requerida, se realizará una medición en espectrofotómetro a 625nm con un blanco del medio YEPD donde la absorbancia debe encontrarse en un rango de 0,08 a 0,1.

Preparación de las placas de microdilución

El ensayo de microdilución se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, siguiendo el protocolo adaptado por **Rodríguez et al. (2022)**, para cada cepa.

E. coli: En cada pocillo se distribuyó 100 µL del inóculo de *E. coli* estandarizado, 100 µL de las diferentes concentraciones diluidas del extracto. Para el control positivo se

utilizó 100 µL de ampicilina junto al inóculo y como control negativo agua destilada estéril junto al inóculo, como se observa en la Tabla 5. La incubación fue a 37°C durante 24 horas, realizando todos los ensayos de las concentraciones del extracto por quintuplicado.

Transcurridas las 24h de inoculación en cada pocillo se añadió 20 µL de resazurina al 0,02% y se incubaron durante 1 hora.

***S. cerevisiae*:** En cada pocillo se distribuyó 100 µL del inóculo de *S. cerevisiae* estandarizado, 100 µL de las diferentes concentraciones diluidas del extracto. Para el control positivo se utilizó 100 µL de nistatina junto al inóculo y como control negativo agua destilada estéril junto al inóculo, como se observa en la Tabla 5. La incubación fue a 25°C durante 48 horas, realizando todos los ensayos de las concentraciones del extracto por quintuplicado.

Transcurridas las 24h de inoculación en cada pocillo se añadió 20 µL de resazurina al 0,02% y se incubaron durante 1 hora.

Al finalizar este tiempo, se evaluó el cambio de color para determinar si hubo crecimiento bacteriano en los pocillos. Si la resazurina permanece azul o incoloro, significa que no ha sido reducida, indicando que las bacterias han muerto. En cambio, si la resazurina se reduce a resorufina, cambiará a un color rosado, lo que señala la presencia de bacterias viables.

Tabla 5.

Demostración del uso de los pocillos de cada muestra

M1-M2-M3		Replicas	1	2	3	4	5	C+	C-
µg/mL			1	2	3	4	5	6	7
	2000	A							
	1000	B							
	500	C							

250	D						
125	E						

CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

El proceso tradicional de desamargado del chocho se ha caracterizado por una secuencia de etapas que incluyen la hidratación, cocción y lavado diario del grano. Este método tradicional empleado aquí en Ecuador, es ampliamente utilizado con el fin de eliminar la mayor cantidad de alcaloides, los cuales deben ser removidos para asegurar la inocuidad del producto para su consumo (**Chalampunte Flores et al., 2023**).

De acuerdo a **Rodriguez (2009)** señala que la etapa de cocción cumple un rol esencial ya que inactiva la germinación de la semilla, elimina microorganismos patógenos y favorece la coagulación de proteínas. Una de las ventajas de realizar la cocción de las semillas es que este proceso incrementa la lixiviación de los alcaloides al aumentar la permeabilidad de la pared celular, mejorando la eficiencia del proceso de desamargado (**Llusha & Trávez, 2021**).

Se procesaron 5 lb de chocho seco equivalente a 2267,96 g por cada muestra y se utilizaron 12 L de agua por cada fase del proceso: hidratación, cocción y lavado diario. Este volumen representa una proporción de 5,29 L de agua por kilogramo de grano seco por fase. Una vez que se obtuvo los extractos líquidos de cada fase, se procedió a la deshidratación por evaporación para poder determinar la masa del residuo seco obtenido

$$\text{Rendimiento \%} = \left(\frac{65,6446 \text{ g}}{2267,96 \text{ g}} \right) * 100$$

$$\text{Rendimiento \%} = 2,89 \%$$

$$\text{Masa del extracto seco} = 102,4750 \text{ g} - 36,8304 \text{ g} = 65,6446 \text{ g}$$

$$\text{Cantidad total de chocho seco} = 5 \text{ lb} \rightarrow 2267,96 \text{ g}$$

Lo cual indica que, del total de chocho procesado, aproximadamente el 2,89% corresponde a solidos disueltos transferidos al agua durante el proceso de desamargado.

Estudios previos sobre el estudio de *Lupinus andinos*, señalan que los alcaloides junto a otras sustancias solubles constituyen un bajo porcentaje del peso seco como se muestra en la Tabla 6, pero con un alto impacto toxicológico (Chaluisa & Jimenez, 2021).

Tabla 6.

Resultado de la masa del extracto seco

Muestra		Masa del extracto seco (g)
M1	F1	7,7266
	F2	11,8063
	F3	5,0576
M2	F1	7,5357
	F2	11,2142
	F3	5,4622
M3	F1	7,7672
	F2	11,4215
	F3	5,2312

3.1.1. Caracterización de los parámetros físico-químicos del extracto del agua de desamargado del chocho

La caracterización de los parámetros físico-químicos del extracto del agua de desamargado del chocho representa una gran importancia ya que permiten describir los compuestos que mantienen dichos efluentes y esto nos ha permitido evaluar la carga de materia orgánica e inorgánica disuelta y suspendida presente en cada muestra y cómo puede impactar la calidad del agua (Carrión et al., 2008). También podemos estimar el potencial impacto ambiental que puede generar, especialmente si estos efluentes son descargados sin un tratamiento adecuado (Chaluisa & Jimenez, 2021).

Entre los principales parámetros son el pH y CE ya que nos indican la acidez o alcalinidad y la concentración de iones y sales solubles presentes en la solución (Llusa & Trávez, 2021). La turbidez evalúa la cantidad de partículas suspendidas en el extracto como la materia orgánica, compuestos coloidales y proteínas solubilizadas (Manotoa & Tapia, 2020).

3.1.1.1. Determinación de sólidos totales (ST)

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 7 y podemos observar una marcada variabilidad de concentración entre las diferentes fases del proceso. Observando que los

valores de las muestras de la fase de cocción (F2) son las que presentan mayor concentración de sólidos totales, con valores en un rango de 2,24 – 2,36 g/L. Lo cual sugiere una mayor transferencia de compuestos solubles al medio líquido durante la exposición térmica. **López (2013)**, destaca que el calentamiento induce la ruptura de estructuras celulares, facilitando así la lixiviación de los alcaloides, azúcares y otras sustancias solubles. Se puede decir que la alta concentración de sólidos totales en esta fase se debe a la solubilidad de los alcaloides como: la lupanina, lupinina y esparteína; es decir, que la mayor cantidad de compuestos eliminados en las fases con calentamiento del proceso (**Carrión et al., 2008**).

En contraste con las otras fases, en la fase de hidratación (F1) los valores reportados fueron de 1,51 – 1,55 g/L (Tabla 7), lo que refleja una lixiviación inicial de los compuestos hidrosolubles antes del efecto térmico. **Manotoa & Tapia (2020)** indican que se debe a que la mayor proporción de compuestos amargos son eliminados en las fases del proceso de cocción. Por otro lado, en la fase de lavado diario (F3) los niveles presentados son menores a las otras fases, ya que son valores entre 1,01 – 1,09 g/L (Tabla 7). Durante esta fase, se disminuye de manera progresiva la carga de sólidos a medida que se prolonga el contacto con el agua limpia (**Chaluisa & Jimenez, 2021**).

Algo que también se debe considerar es que el extracto al transcurrir el tiempo en la estufa a 40°C este tiende a cambiar de color amarillo a café. Según **Martins et al. (2000)** se debe a una reacción denominada reacción de Maillard. Esta reacción se genera debido al conjunto de reacciones entre azúcares reductores y grupos amino libres.

Tabla 7.

Resultados de ST de las muestras analizadas

Muestra		Peso de crisol vacío (g)	Peso de crisol + muestra seca (g)	Peso extracto seco (g)	Volumen muestra (L)	Sólidos totales (g/L)	Sólidos totales (mg/L)
M1	F1	36,9926	44,7192	7,7266	5	1,55	1545,32
	F2	34,3467	46,1530	11,8063	5	2,36	2361,26
	F3	36,0962	41,1538	5,0576	5	1,01	1011,52
M2	F1	34,9274	42,4631	7,5357	5	1,51	1507,14
	F2	36,0732	47,2874	11,2142	5	2,24	2242,84
	F3	34,2746	39,7368	5,4622	5	1,09	1092,44
M3	F1	36,2736	44,0408	7,7672	5	1,55	1553,44
	F2	36,2864	47,7079	11,4215	5	2,28	2284,30

F3	36,0235	41,2547	5,2312	5	1,05	1046,24
----	---------	---------	--------	---	------	---------

3.1.1.2.Determinación de pH y Conductividad eléctrica (CE)

En total se analizaron 9 muestras del extracto seco del agua de desamargado. Los valores de pH para las fases oscilan en un rango de 5,1 – 6,4 (Tabla 8). Mientras que la conductividad eléctrica oscila entre 993 – 2.367 $\mu\text{S/cm}$ (Tabla 9).

Los valores de pH muestran una variabilidad entre las diferentes fases, lo cual puede atribuirse a factores como la etapa del proceso de desamargado o a la cantidad de compuestos hidrosolubles que se encuentran en el extracto por lo que mantienen un pH ligeramente ácido (Jarrin, 2003). Ante los valores elevados de CE correspondientes a los de la fase 2, Manotoa & Tapia (2020) indican que es estos valores se atribuyen a la alta concentración total de sales solubles. Estas sales solubles suelen afectar las propiedades químicas del suelo, lo que resulta afectar al crecimiento de las plantas indirectamente.

Tabla 8.

Resultados de pH de las muestras analizadas

Muestra		pH			pH(prom)
M1	F1	5,8	6,1	5,9	5,9
	F2	5,1	5,3	4,9	5,1
	F3	6,1	6,3	6,2	6,2
M2	F1	5,7	5,9	5,6	5,7
	F2	4,9	5,2	5,2	5,1
	F3	6,4	6,2	6,5	6,4
M3	F1	5,9	5,7	5,7	5,8
	F2	5,1	5,3	5,3	5,2
	F3	6,3	6,4	6,5	6,4

Tabla 9.

Resultado de CE de las muestras analizadas

Muestra	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	Cond. (prom) ($\mu\text{S/cm}$)
---------	------------------------------------	--------------------------------------

M1	F1	1210	1294	1198	1234
	F2	2304	2397	2401	2367
	F3	1002	997	1025	1008
M2	F1	1456	1498	1431	1462
	F2	2383	2287	2376	2349
	F3	982	1001	997	993
M3	F1	1398	1349	1288	1345
	F2	2298	2295	2273	2289
	F3	991	995	993	993

3.1.1.3.Determinación de la turbidez

Se evaluó la turbidez de las 9 muestras obteniendo valores que oscilan entre 71 y 285 NTU (Tabla 10). Estos resultados muestran valores elevados en las muestras de F2, superando los límites de la Norma de calidad del Ambiente. Según **Oliden & Villegas (2019)** estos valores elevados generan una preservación a los microorganismos de los efectos de fumigación y estimulan la proliferación de bacterias, considerándola así no apta para el consumo humano.

Ninguna muestra ha demostrado tener un valor de turbidez permisible para que pueda desecharse en el sistema de alcantarillado, ya que los valores de las muestras de F3 tienen valores de 71 – 80 NTU (Tabla 10) superando el valor de 10 NTU que es el valor permisible de acuerdo a la Norma de calidad del Ambiente (**MAE, 2005**).

Tabla 10.

Resultados de turbidez de las muestras analizadas

Muestra		Turbidez (NTU)			Turbidez_(prom) (NTU)
M1	F1	149	153	156	153
	F2	256	284	262	267
	F3	65	73	74	71
M2	F1	178	183	181	181
	F2	249	234	246	243
	F3	83	76	81	80
M3	F1	173	165	168	169
	F2	279	286	289	285
	F3	78	75	82	78

3.1.1.4.Determinación de solidos suspendidos totales (SST)

En la Tabla 11 se presentan los valores obtenidos para las 9 muestras analizadas, estos valores oscilan entre 5,80 y 7,50 mg/L. Al analizar estos resultados podemos evidenciar que los valores de SST se encuentran en la fase de cocción (F2) de cada muestra. **Chaluisa & Jimenez (2021)** indican que puede deberse a una mayor liberación de partículas insolubles debido a la ruptura de las estructuras celulares debido al aumento de temperatura.

En contraste con las fases de hidratación y lavado diario muestran valores bajo de SST, lo que podría indicar que durante la hidratación la liberación de solidos es más limitada, mientras que en el proceso de lavado diario las partículas suspendidas son arrastradas progresivamente por el flujo de agua, disminuyendo su concentración (**Llusha & Trávez, 2021**).

Tabla 11.

Resultados de SST de las muestras analizadas

Muestra		Peso de filtro vacío (g)	Peso del filtro + muestra seca (g)	Peso extracto (g)	Volumen muestra (L)	Solidos suspendidos totales (g/L)	Solidos suspendidos totales (mg/L)
M1	F1	1,1824	1,2134	0,031	5	0,0062	6,20
	F2	1,2431	1,2795	0,0364	5	0,0073	7,28
	F3	1,1679	1,1978	0,0299	5	0,0060	5,98
M2	F1	1,2257	1,2597	0,034	5	0,0068	6,80
	F2	1,2584	1,2939	0,0355	5	0,0071	7,10
	F3	1,1903	1,2193	0,029	5	0,0058	5,80
M3	F1	1,2328	1,2637	0,0309	5	0,0062	6,18
	F2	1,2752	1,3127	0,0375	5	0,0075	7,50
	F3	1,2086	1,2386	0,03	5	0,0060	6,00

Los resultados obtenidos sobre los parámetros del extracto del agua de desamargado del chocho evidencian una alta carga de compuestos solubles e insolubles, materia orgánica e inorgánica, derivados del proceso tradicional de hidratación. Estos niveles superan los límites permisibles para aguas destinadas al sistema de alcantarillado, según la Norma de calidad Ambiental (**MAE. 2005**). Indicándonos que presenta un riesgo ambiental potencial y la necesidad de implementar un tratamiento adecuado antes de su disposición final.

3.2. Estimación de alcaloides del extracto del agua de desamargado del chocho

Ante las 3 fases del proceso de desamargado del chocho, se decidió enfocarse en el análisis en las muestras de la fase de cocción (F2), ya que presentaron valores superiores en coloración, densidad y respuesta espectrofotométricas.

3.2.1. Análisis de la concentración de alcaloides totales mediante espectrofotometría UV-Vis

Uno de los objetivos de esta investigación fue estimar la cantidad de alcaloides que pueden estar presentes en el extracto seco del agua de desamargado. Para ello se utilizó el protocolo espectrofotométrico el cual permite estimar la concentración de alcaloides a partir de una curva de calibración como se muestra en la Tabla 12. De esta manera se puede realizar la conversión de absorbancia a concentración de equivalentes de acuerdo al estándar de alcaloides mediante una regresión lineal (Prajapati et al., 2024).

Tabla 12.

Estimación de la concentración de alcaloides totales de las muestras analizadas

Muestra	Abs			Concentración			Concentración _(prom) (mg/mL)
M1	0,338	0,352	0,374	0,499	0,518	0,547	0,521
M2	0,455	0,464	0,452	0,654	0,666	0,650	0,657
M3	0,401	0,412	0,406	0,583	0,597	0,589	0,590

La validez de este método, radica en la interacción de los alcaloides con el BCG en un pH ácido, generando un complejo ion-pare lipofílico que se extrae con cloroformo y se cuantifica a una cierta longitud de onda (Fadhil et al., 2007). La curva de calibración que se obtuvo presentó una linealidad, con una ecuación de regresión de:

Ecuación 4.

Concentración final de los alcaloides totales

$$[Quinina] = \frac{Abs + 0,0391}{0,7555}$$

$$R^2 = 0,9868$$

Con R^2 con un valor sobre 0,9868, resultando adecuado ya que para una regresión lineal valores, considerándose así adecuada para la cuantificación preliminar (Gul et al., 2017). Destacando que los valores de absorbancia de cada una de las muestras se

ubicaron dentro del rango de la curva, lo que garantiza una cuantificación con un intervalo válido del modelo.

Las muestras analizadas fueron (M1, M2 y M3) de la F2, presentando valores dentro del rango de los valores de la curva de calibración, estos valores fueron convertidos en concentraciones equivalentes al estándar de alcaloides totales, dando como resultado de 0,521 (M1), 0,657 (M2) y 0,590 (M3), estos valores se detallan en la Tabla 12. Estos valores conciernen al promedio de la absorbancia tomada de cada muestra, las cuales se utilizaron para obtener la concentración (mg/mL) de alcaloide totales de cada muestra, como se detalla en la Tabla 13 y 14, lo cuales podemos evidenciar que en los 5 L y 12 L del agua de desamargado de chocho de las M1, M2 y M3 existen 2605 mg/mL, 3285 mg/mL y 2950 mg/mL, respectivamente. Y sobre los 12 L de agua de desamargado de chocho podemos evidenciar que hay 217,08 mg/L, 273,75 mg/L y 245,83, respectivamente.

La muestra M2 presentó un mayor contenido de alcaloides totales, lo cual puede estar relacionado con una mayor eficacia de extracción durante la fase de cocción o una menor degradación térmica de los compuestos (Valieva & Akulov, 2024). Estudios con anterioridad demostraron que el proceso de desamargado tradicional del chocho puede liberar alcaloides desde la matriz proteica de las semillas hacia el medio acuoso (Chirinos-Arias, 2015).

Tabla 13.

Estimación de la concentración de alcaloides totales en 5 L de agua de desamargado de chocho

Muestra	Concentración(mg/mL)	Alcaloides totales en 5L (mg/mL)
M1	0,521	2605
M2	0,657	3285
M3	0,590	2950

Tabla 14.

Estimación de la concentración de alcaloides totales en 12 L de agua de desamargado de chocho

Muestra	Concentración(mg/mL)	Alcaloides totales en 12L (mg/L)
M1	0,521	217,08
M2	0,657	273,75
M3	0,590	245,83

3.3. Evaluación antibacteriana y antifúngica

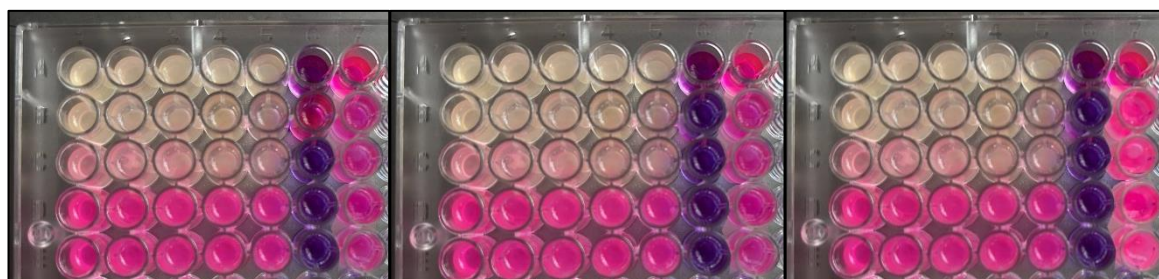
3.3.1. Análisis de la actividad antibacteriana y antifúngica

La evaluación antimicrobiana del extracto del agua de desamargado del chocho se realizó mediante el método de microdilución en placas de 96 pocillos, utilizando cepas como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se estableció un gradiente de concentraciones desde 125 – 2000 $\mu\text{g/mL}$ para poder determinar la CMI mediante el cambio de color del indicador de resazurina (Rodríguez et al., 2022).

En la Figura 1 podemos observar claramente una inhibición del crecimiento microbiano desde la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ para ambas cepas. A partir de esta concentración, el color azul/violeta o incoloro del reactivo se mantiene, indicándonos la ausencia de viabilidad celular, por lo tanto, podemos evidenciar una acción inhibitoria efectiva de nuestro extracto; por otro lado en la Figura 2 se observa una inhibición concreta a partir de la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, ya que aun se observa un ligero color rosa en los pocillos con la concentración 500 $\mu\text{g/mL}$ (Sarker et al., 2007). Con respecto a las concentraciones inferiores (125 – 250 $\mu\text{g/mL}$) observamos un color rosado característico de la reducción de resazurina a resorufina, evidenciando crecimiento celular activo.

Figura 1.

Evaluación antibacteriana frente a *E. coli* de las muestras M1, M2 y M3 respectivamente.



Nota: Los colores nos indican el estado metabólico, donde: los pocillos incoloros o azul/morado representan inhibición del crecimiento o muerte celular, indicando ausencia de metabolismo activo. Mientras que los pocillos rosados muestran la reducción de resazurina a resorufina, lo cual evidencia actividad metabólica y crecimiento microbiano.

Figura 2.

*Evaluación antifúngica frente a *S. cerevisiae* de las muestras M1, M2 y M3 respectivamente.*



Nota: Los colores nos indican el estado metabólico, donde: los pocillos incoloros o azul/morado representan inhibición del crecimiento o muerte celular, indicando ausencia de metabolismo activo. Mientras que los pocillos rosados muestran la reducción de resazurina a resorufina, lo cual evidencia actividad metabólica y crecimiento microbiano.

Debido a estos resultados la CIM del extracto se encuentra entre 500 – 1000 µg/mL frente a ambas cepas, lo que nos sugiere un efecto inhibitorio moderado, debido a los alcaloides presentes en el extracto, como la lupanina y esparteína (Cely-Veloza et al., 2022). Estos compuestos ejercen la acción antimicrobiana mediante la alteración de la membrana celular y la inhibición de la síntesis de ADN y proteínas (Zhang et al., 2023).

Bernal et al. (2005) reportaron una CMI de 2500 ppm para los extractos del género *Lupinus* frente a hongos fitopatógenos, lo cual se encuentra en concordancia con los valores obtenidos en esta investigación, ya que observamos que a la concentración de 2000 µg/mL hay una inhibición total. Por lo tanto los resultados obtenidos no solo demuestran el potencial del extracto como agente antimicrobiano natural, sino que también fortalecen la propuesta de valorización biotecnológica de residuos agroindustriales (Cely-Veloza et al., 2022).

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

4.1. Conclusiones

- La caracterización fisicoquímica del extracto del agua de desamargado del chocho evidenció valores elevados de CE, SST y turbidez, junto con un pH ligeramente ácido. Estos resultados confirman la presencia de una fuente rica en materia orgánica, que atribuye principalmente a metabolitos secundarios extraídos del grano durante las fases de hidratación, cocción y lavado diario. Estas características indican que el agua residual posee una alta carga contaminante, pero también un potencial aprovechable para la recuperación de compuestos activos.
- A partir del análisis del agua residual generada durante el proceso de desamargado del chocho, se obtuvieron extractos que revelan un alto contenido de metabolitos secundarios, principalmente los AQs, se pudo confirmar mediante espectrofotometría UV-Vis. Se observó que la mayor concentración de estos compuestos se encuentra en la fase de cocción, lo que se atribuye al efecto del tratamiento térmico sobre la liberación de alcaloides desde el tejido vegetal al medio acuoso. Los resultados fisicoquímicos de los extractos reflejan una matriz rica en sólidos disueltos y con características compatibles con un efluente orgánico de alta carga contaminante. Sin embargo, esta misma composición abre la posibilidad de revalorizar este residuo como fuente de compuestos bioactivos.
- Estos extractos también fueron evaluados por su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, observándose un efecto inhibitorio más pronunciado, lo cual sugiere una posible afinidad o especificidad de los alcaloides del chocho hacia este tipo de microorganismos, este efecto antimicrobiano podría estar relacionado con la presencia de lupanina, esparteína y otros alcaloides que son capaces de alterar la membrana celular o interferir en funciones metabólicas esenciales.
- En conjunto con los hallazgos del presente estudio del agua de desamargado, que ha sido considerada un residuo sin valor, posee compuestos con propiedades bioactivas que pueden ser aprovechadas mediante procesos de extracción simples. Esto permite proponer una alternativa sostenible y económicamente viable para la agroindustria, orientada a reducir el impacto ambiental del desperdicio de estas aguas.

4.2. Recomendaciones

- Es recomendable explorar métodos alternativos de extracción para los compuestos alcaloídicos presentes en el agua de desamargado del chocho, comparando técnicas como la maceración, extracción asistida por ultrasonido, microondas o extracción con fluidos supercríticos, con el objetivo de evaluar su eficiencia, selectividad y rendimiento. Asimismo, se sugiere optimizar parámetros críticos como la relación solvente-muestra, temperatura y pH, a fin de maximizar la recuperación de metabolitos bioactivos.
- Se podría ampliar las pruebas de bioactividad hacia un espectro más amplio de microorganismos, incluyendo cepas multirresistentes y hongos fitopatógenos, para determinar el alcance real del extracto como agente antimicrobiano natural.

BIBLIOGRAFIA

- APHA. (1992). Standars Methods for the Examination of Water and Wastewater. In *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*.
- Arias A., L. S. E., Ulloa R., L. A., Rojas O., L. A., & Noboa A., T. E. (2019). Efecto de los alcaliodes del lupinus mutabilis sweet sobre los parásitos gastrointestinal en cuyes. *Ciencia Digital*, 3(3.1), 221–228. <https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v3i3.1.692>
- Avilés, M., & Flores, R. (2018). Validación del efecto fitoterápico de un medicamento en base a extractos vegetales de lupinus / aloe (regumetacel) para el tratamiento de la diabetes tipo II , artritis reumática , artrosis , y gastritis . Sucre 2006 – 2015 Validation the effect of a Ph. *Ciencia, Revista Innovación, Tecnología*, 15(16), 933–948. http://www.scielo.org.bo/pdf/rcti/v15n16/v15n16_a04.pdf
- Barroso, C. P. (2008). *Implementación de una técnica para el aprovechamiento de los alcaloides de chocho y posterior complexión de metales pesados* [Escuela Superior Politecnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/224>
- Bernal, A., Zamora, J. F., Virgen, G., & Nuño, R. (2005). Actividad Biológica in vitro de Extractos de Lupinus spp. sobre Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 140–146.
- Carrión, J., Villacres, E., Peralta, E., & Ramos, M. (2008). Reutilización del efluente del desamargado del chocho (Lupinus mutabilis sweet). *Revista Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 17(1), 1–13.
- Castañeta, G., Iturralde, M., & Peñarrieta, M. (2022). Alcaloides tipo quinolizidina como fuente

- química del sabor amargo del tarwi: Desarrollo de una reacción para la estimación cualitativa del amargor en granos de tarwi del antiplano boliviano. *Revista Boliviana de Química*, 39(1), 19–23. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.39.1.3>
- Castro, J. C. (2012). *Validación parámetros de pH y conductividad en agua superficiales y residuales domesticas en el laboratorio ambiental de la CRC bajo la Norma NTC-ISO/IEC 17025*. Universidad del Cauca.
- Cely-Veloza, W., Kato, M. J., & Coy-Barrera, E. (2023). Quinolizidine-Type Alkaloids: Chemodiversity, Occurrence, and Bioactivity. *ACS Omega*, 8(31), 27862–27893. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02179>
- Cely-Veloza, W., Quiroga, D., & Coy-Barrera, E. (2022). Quinolizidine-Based Variations and Antifungal Activity of Eight Lupinus Species Grown under Greenhouse Conditions. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010305>
- Chalampunte Flores, D., Mosquera Losada, M. R., De Ron, A., Tapia Bastidas, C., & Sørensen, M. (2023). Morphological and Ecogeographical Diversity of the Andean Lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet) in the High Andean Region of Ecuador. *Agronomy*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy13082064>
- Chaluisa, J., & Jimenez, M. (2021). *Caracterización fisicoquímica del agua generada en el proceso de desamargado del chocho (Lupinus mutabilis sweet), mediante el método tradicional, en el camous experimental CEASA de la Universidad Técnica de Cotopaxi, Cantón Latacunga en el periodo 2020-2* [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6265>
- Chirinos-Arias, M. (2015). Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential. *Revista Bio Ciencias*, 3(3), 163–172. https://www.researchgate.net/publication/281034234_Andean_Lupin_Lupinus_mutabilis_Sweet_a_plant_with_nutraceutical_and_medicinal_potential
- De la Cruz-Ricardez, D., Lagunes-Espinoza, L. C., Ortiz-García, C. F., & Pablo-Pérez, M. (2016). Actividad antifúngica in vitro del extracto acuoso y alcaloideo de *Lupinus* spp, sobre *Moniliophthora roreri*. *AGRO Productividad*, 9, 3–9.
- Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dash, S., & Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>
- Escobar, E. N. (2023). Lupine grain y lupine flour una propuesta para la entrada del chocho (lupinus

- mutabilis) producido en Carchi, Ecuador hacia mercados internacionales: un análisis multidimensional. *Visión Empresarial*, 13, 69–85. <https://doi.org/10.32645/13906852.1238>
- Fadhil, S., Reza, M. H., Rouhollah, G., & Reza, V. R. M. (2007). Spectrophotometric Determination of Total Alkaloids in *Peganum harmala* L. Using Bromocresol Green. *Research Journal of Phytochemistry*, 1(2), 79–82. <https://doi.org/10.3923/rjphyto.2007.79.82>
- Galek, R., Sawicka-Sienkiewicz, E., Zalewski, D., Stawiński, S., & Spychała, K. (2017). Searching for low alkaloid forms in the Andean lupin (*Lupinus mutabilis*) collection. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 53(2), 55–62. <https://doi.org/10.17221/71/2016-CJGPB>
- Guilengue, N. A. (2021). Genetic and morphological diversity of germplasm collection from *Lupinus mutabilis* Sweet grown under Mediterranean climate. In *Universidade de Lisboa*.
- Gul, R., Jan, S. U., Faridullah, S., Sherani, S., & Jahan, N. (2017). Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Alkaloids, and Antioxidant Activity of Crude Plant Extracts from *Ephedra intermedia* Indigenous to Balochistan. *Scientific World Journal*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5873648>,
- Hama, J. R., & Strobel, B. W. (2020). Natural alkaloids from narrow-leaf and yellow lupins transfer to soil and soil solution in agricultural fields. *Environmental Sciences Europe*, 32(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00405-7>
- Herraiz T., T., González P., D., Arán R., V. J., & Guillén F., H. (2011). Procedimiento de obtención de los alcaloides activos de la planta medicinal *Peganum harmala* y su uso. In *Oficina Española de Patentes y Marcas*.
- Hidalgo, M., Asmat Marrufo, P., Lezama Asencio, P., Ramos, C., Chimoy Tuñoque, C. A., & Zolla, G. (2022). Evaluación de la susceptibilidad in vitro a esparteína, en cuatro cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 39(1), 77–82. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2022.391.10136>
- INEC. (2011). III Censo Nacional Agropecuario de la República del Ecuador. *III Censo Nacional Agropecuario*, 1, 57. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/CNA/Tomo_CNA.pdf
- INEN. (2005). Norma técnica Ecuatoriana NTE INEN 2983:2005. Leguminosas, grano amargo de chocho. *Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria*, 26. <https://es.scribd.com/document/473081435/2389>
- Jarrin, M. P. (2003). *Tratamiento del agua de desamargado de chocho (Lupinus mutabilis Sweet), proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina INIAP* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/353>

- Komonsing, N., Khuwijitjaru, P., Nagle, M., Müller, J., & Mahayothee, B. (2022). Effect of drying temperature together with light on drying characteristics and bioactive compounds in turmeric slice. *Journal of Food Engineering*, 317, 110695. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2021.110695>
- Kowalska Krochmal, B., & Dudek Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Llusha, M., & Trávez, Y. (2021). Caracterización físico química del agua en el proceso de desamargado por método de fermentación del chocho (*lupinus mutabilis sweet*) en el campus experimental ceasa, provincia de cotopaxi 2020 – 2021. In *Universidad Técnica de Cotopaxi*. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6265>
- López, G. (2013). *Estudio del efecto de la deshidratación osmótica, el secado y recubrimiento en la obtención de chocho crocante*. Escuela Politécnica Nacional.
- MAE. (2005). Norma de calidad Ambiental y de descarga de Efluentes: Recurso Agua. *Ley de Gestión Ambiental y Del Reglamento a La Ley de Gestión Ambiental Para La Prevención y Control de La Contaminación Ambiental*.
- Mancinotti, D., Frick, K. M., & Geu-Flores, F. (2022). Biosynthesis of quinolizidine alkaloids in lupins: mechanistic considerations and prospects for pathway elucidation. *Natural Product Reports*, 39(7), 1423–1437. <https://doi.org/10.1039/d1np00069a>
- Manotoa, G., & Tapia, M. (2020). Caracterización físico química del agua en el proceso de desamargado por el método de germinación del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), en el campus experimental CEASA, provincia de Cotopaxi en el período 2020-2021. In *Universidad Técnica de Cotopaxi*.
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & Van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 11, Issues 9–10, pp. 364–373). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X)
- Mazzola, P. G., Jozala, A. F., Novaes, L. C. D. L., Moriel, P., & Penna, T. C. V. (2009). Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(2), 241–248. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200008>
- Oliden, M., & Villegas, G. (2019). Parámetros organolépticos y microbiológicos de la calidad del agua de consumo humano, de la población del caserío Chamaya Pueblo, Provincia Jaén - Cajamarca.

- Parra, G., Donoso, C., Trávez, Y., & Llusha, M. (2022). Valoración de los efluentes del proceso de desamargado de *Lupinus Mutabilis Sweet* (póster). *XIII Congreso de Economía Agroalimentaria.*, 2006, 41–44. <https://doi.org/10.31428/10317/10401>
- Prajapati, D., Makvana, A., Patel, M., Chaudhary, R., & Patel, R. (2024). Spectrophotometric method for the determination of total alkaloids in selected plant parts. *Pharmacognosy and Phytochemistry*, 13(5), 491–494.
- Rodés, C., & Van der Fels-Klerx, H. J. (2023). Impact of environmental factors on the presence of quinolizidine alkaloids in lupins: a review. *Food Additives and Contaminants - Part A*, 40(6), 757–769. <https://doi.org/10.1080/19440049.2023.2217273>
- Rodriguez, A. (2009). Evaluación “in vitro” de la actividad antibacteriana de los alcaloides del agua de desamargado del chocho (*lupinus mutabilis sweet*). In *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo-Riobamba*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1468/1/34T00246.pdf>
- Rodríguez, C., Alonso-Calleja, C., García, C., Carballo, J., & Capita, R. (2022). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology*, 11(Mic), 46.
- Romeo, F. V., Fabroni, S., Ballistreri, G., Muccilli, S., Spina, A., & Rapisarda, P. (2018). Characterization and antimicrobial activity of alkaloid extracts from seeds of different genotypes of *Lupinus* spp. *Sustainability*, 10(3), 788. <https://doi.org/10.3390/su10030788>
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>
- Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2003). La participación de los Metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363. <http://redalyc.uaemex.mx>
- Thawabteh, A., Juma, S., Bader, M., Karaman, D., Scrano, L., Bufo, S. A., & Karaman, R. (2019). The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. *Toxins*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/toxins11110656>
- Valieva, A. I., & Akulov, A. N. (2024). Application of Bromocresol Green for Spectrophotometric Determination of Alkaloid Content Using the Example of *Ruta graveolens*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 71(1), 1–12. <https://doi.org/10.1134/S1021443724604336>

- Villacres, N. R. (2011). Evaluación del procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiológica. In *Universidad San Francisco de Quito*.
- Wink, M., & Twardowski, T. (1992). Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. In *Allelopathy* (pp. 129–150). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2376-1_10
- Wink, Michael. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 89, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.006>
- Wink, Michael. (2015a). Alkaloids: Toxicology and Health Effects. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., pp. 106–114). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00020-9>
- Wink, Michael. (2015b). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2(3), 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>
- Zhang, J., Liu, Y. Q., & Fang, J. (2023). The biological activities of quinolizidine alkaloids. In *Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 89, pp. 1–37). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2022.06.001>

ANEXOS

Anexo A → Figuras

Anexo B → Tablas

Figura 1A.

Proceso de desamargado y tradicional del chocho



Figura 2A.

Muestras secas despues de 7 dias en la estufa a 40°C

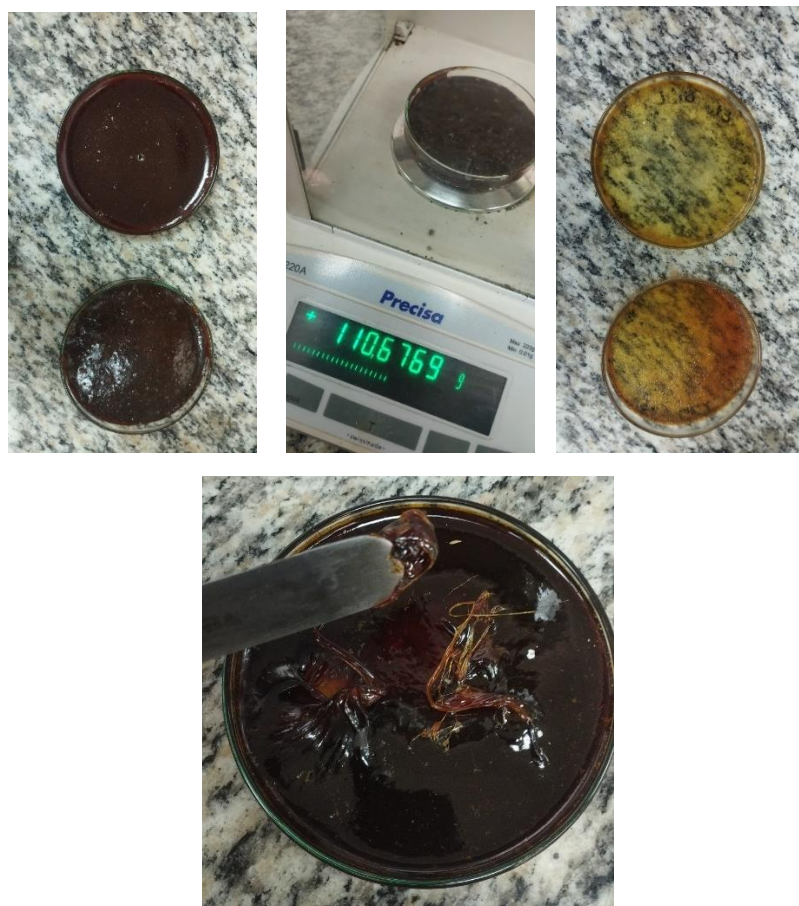


Figura 3A.

Parametros fisico quimicos



Figure 4A.

Proceso de curva de calibración y extracción de alcaloides

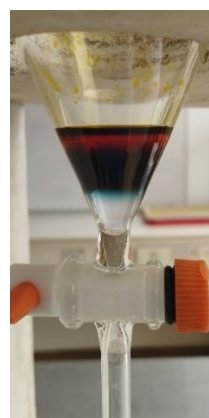


Figura 5A.

Activación de la bacteria E. coli en PCA

