



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN “*in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS
ALCALOIDES DEL AGUA DE COCCIÓN DEL PROCESO DE
DESAMARGADO DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet)”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

JHOJANA MARIELA COLOMA RAMÍREZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2009

DEDICATORIA

A Dios

A dos seres extraordinarios mis padres Sra Blanca Ramírez y Sr Cervantes Coloma quienes con su apoyo, dedicación y paciencia incondicional me motivaron para culminar mi carrera siendo los entes de mi ser y pilares fundamentales en mi formación espiritual y profesional.

A mis hermanas Karina, Ximena, Nicole, Lisseth, a mi hermano Edgar y abuelita Bertha por su gran amor incondicional

A mis queridas tías Carmen y Emma por su gran ayuda y consejos para seguir adelante, quiénes me enseñaron que solo con esfuerzo, constancia y perseverancia se puede cumplir un ideal.

A mis primos, tíos y familiares por brindarme su apoyo.

A mis verdaderos amigos por su amistad eterna.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitirme formarme como una profesional capaz de enfrentarme a los retos de la sociedad.

Al INIAP y SENACYT por el apoyo brindado en la realización del trabajo investigativo y de manera especial a la Ing Elena Villacrés.

A la Dr. Janneth Gallegos por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis

A la Dra Susana Abdo Miembro del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo

A la Dra. Lourdes por el apoyo y colaboración incondicional brindado en el desarrollo de la investigación

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo de investigación

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Edmundo Caluña
DECANO FAC. CIENCIAS

.....

.....

Dr. Luis Guevara.
**DIRECTOR ESCUELA
BIOQUÍMICA Y FARMACIA (E)**

.....

.....

Dra Janneth Gallegos
DIRECTOR DE TESIS

.....

.....

Dra Susana Abdo
MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Sr. Carlos Rodríguez.
**DIRECTOR DEL CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN**

.....

.....

NOTA DE TESIS ESCRITA

.....

Yo, Jhojana Mariela Coloma Ramírez, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

JHOJANA MARIELA COLOMA RAMÍREZ

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
cm	Centímetros
°C	Grados Celsius
DL	Dosis Letal
EAH	Extracto alcohólico crudo de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet
ECTA	Extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet
kg	Kilogramos
LC	Liofilizado del agua de cocción del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet
LH	Liofilizado del agua de hidratación del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet
mg	Miligramos
nm	Nanómetros
nmol	Nanomol
p/p	Peso/peso
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPA	Unidades de producción agrícola
μ	Micra
μg	Microgramo
μL	Microlitro

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE CUADROS
ÍNDICE DE GRÁFICOS
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS
ÍNDICE DE ANEXOS
INTRODUCCIÓN

1	MARCO TEÓRICO	1
1.1	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.	1
1.1.1	Origen.....	1
1.1.2	Taxonomía.....	3
1.1.3	Descripción botánica de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....	3
1.1.4	Valor nutritivo.....	4
1.1.5	Consumo humano.....	5
1.2	Alcaloides.....	6
1.2.1	Propiedades físico-químicas generales de los alcaloides.....	6
1.2.2	Alcaloides quinolizidínicos.....	6
1.2.2.1	Propiedades físico químicas de los alcaloides quinolizidínicos.....	8
1.2.3	Aplicaciones de los alcaloides del <i>Lupinus</i>	12
1.2.4	Toxicidad de los alcaloides del chocho.....	13
1.2.5	Proceso de <i>Lupinus</i> para consumo como alimento.....	14
1.3	Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antifúngica	15
1.3.1	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	16
1.3.1.1	Clasificación.....	16
1.3.1.2	Morfología.....	16
1.3.1.3	Epidemiología.....	17
1.3.1.4	Principales patologías.....	17
1.3.2	Hongos dermatofitos.....	18
1.3.2.1	Generalidades.....	18
1.3.2.2	<i>Mycrosporum canis</i> ATCC 10214.....	19
1.3.2.3	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402	21
1.4	Antimicóticos.....	22
1.4.1	Clasificación.....	22

1.5	Antimicrobianos y actividad antimicrobiana en compuestos naturales.....	22
1.6	Concentración mínima inhibitoria.....	24
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	25
2.1	Lugar de investigación.....	25
2.2	Materiales, equipos y reactivos.....	25
2.2.1	Materia prima.....	25
2.2.2	Material biológico.....	26
2.2.3	Materiales.....	26
2.2.4	Reactivos.....	27
2.2.5	Equipos.....	28
2.3	Metodología.....	28
2.3.1	Análisis “ <i>in vitro</i> ”.....	28
2.3.2	Obtención de extractos.....	29
2.3.2.1	Extracto etéreo crudo de alcaloides totales de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....	29
2.3.2.2	Extracto alcohólico crudo de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....	30
2.3.3	Identificación de alcaloides.....	30
2.3.3.1	Análisis cromatográfico.....	30
2.3.4	Cuantificación de alcaloides.....	30
2.4.1	Ensayo de la actividad antimicrobiana	31
2.4.1.1	Método de Mitscher <i>et. al.</i>	31
2.4.2	Ensayo de la actividad antimicótica	34
2.4.2.1	Método de dilución en agar con suspensión de esporas.....	34
2.5	Análisis estadístico.....	36
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1	Análisis cromatográficos de los alcaloides de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....	37
3.2	Actividad antifúngica.....	39
3.2.1	Actividad antifúngica de liofilizados del agua del proceso de desamargado; extracto crudo de lupanina, extracto crudo etéreo de alcaloides totales y extracto crudo alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	39
3.2.2	Actividad antifúngica frente <i>Mycrosporom canis</i> ATCC 10214 y <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402.....	40

3.2.2.1	Actividad antifúngica de liofilizados del agua del proceso de desamargado frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214.....	41
3.2.2.2	Actividad antifúngica de liofilizados del agua del proceso de desamargado frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402.....	44
3.2.2.3	Actividad antifúngica del extracto crudo de lupanina al 7,6%, frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214.....	46
3.2.2.4	Actividad antifúngica del extracto crudo de lupanina al 7,6%, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402.....	47
3.2.2.5	Actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y extracto crudo alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214.....	49
3.2.2.6	Actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y extracto crudo alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402.....	55
4	CONCLUSIONES.....	62
5	RECOMENDACIONES.....	64
6	RESUMEN.....	65
7	BIBLIOGRAFÍA.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Composición por 100 g de porción comestible del tarwi.....	5
TABLA No. 2	Composición relativa de alcaloides en la semilla de <i>Lupinus mutabilis</i>	7
TABLA No. 3	Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico.....	19

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Análisis de varianza de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del liofilizado de las aguas del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	41
CUADRO No. 2	Test de Tukey al 95% de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del liofilizado de las aguas del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	43
CUADRO No. 3	Análisis de varianza de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de actividad antifúngica del liofilizado de las aguas del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Facultad de Ciencias. ESPOCH Riobamba. Octubre 2008.....	44
CUADRO No. 4	Test de Tukey al 95% de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del liofilizado de las aguas del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	45
CUADRO No. 5	Análisis de varianza de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de actividad antifúngica del extracto crudo de lupanina al 7,6%, a diferentes concentraciones frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Facultad de Ciencias. ESPOCH Riobamba. Octubre 2008.....	46
CUADRO No. 6	Test de Tukey al 95% de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del extracto crudo de lupanina al 7,6%, a diferentes concentraciones frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214 Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	47
CUADRO No. 7	Análisis de varianza de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del extracto crudo de lupanina al 7,6%, a diferentes concentraciones frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	47
CUADRO No. 8	Test de Tukey al 95% de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del extracto crudo de lupanina al 7,6%, a diferentes concentraciones frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402 Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	48

CUADRO No. 9	Análisis de varianza de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y extracto crudo alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	50
CUADRO No. 10	Test de Tukey al 95% de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y extracto crudo alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	54
CUADRO No. 11	Análisis de varianza de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y extracto crudo alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba Octubre 2008.....	55
CUADRO No. 12	Test de Tukey al 95% de la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y extracto crudo alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a diferentes concentraciones frente <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 8	Actividad antifúngica de las aguas del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet. Método de dilución con suspensión de esporas frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	81
GRÁFICO No. 9	Actividad antifúngica de las aguas del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet, método de dilución con suspensión de esporas frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructura molecular de la lupanina.....	8
FIGURA No. 2	Estructura molecular de la esparteína.....	9
FIGURA No. 3	Estructura molecular de la 4- hidroxilupanina.....	11
FIGURA No. 4	Estructura molecular de la lupinina.....	11

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Semillas de <i>Lupinus</i>	4
FOTOGRAFÍA No. 2	Planta de <i>Lupinus</i>	4
FOTOGRAFÍA No. 3	<i>Candida albicans</i>	16
FOTOGRAFÍA No. 4	Macroconidias de <i>Mycrosporium canis</i>	20
FOTOGRAFÍA No. 5	Microconidios de <i>Trichophyton rubrum</i>	21
FOTOGRAFÍA No. 6	Identificación de alcaloides prueba de Dragendorff. Laboratorio de Farmacognosia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	80
FOTOGRAFÍA No. 7	Identificación de alcaloides prueba de Mayer. Laboratorio de Farmacognosia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	80
FOTOGRAFÍA No. 8	Identificación de alcaloides prueba de Wagner. Laboratorio de Farmacognosia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	81
FOTOGRAFÍA No. 9	Obtención del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet mediante recuperación de éter por rotavapor. Laboratorio de Farmacognosia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	81
FOTOGRAFÍA No. 10	Actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 5.000 µg/mL frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	82
FOTOGRAFÍA No. 11	Actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 10.000 µg/mL frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	82
FOTOGRAFÍA No. 12	Actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 20.000 µg/mL frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	83
FOTOGRAFÍA No. 13	Actividad antifúngica del extracto alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 a 5.000 µg/mL. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre. 2008.....	83

FOTOGRAFÍA No. 14	Actividad antifúngica del extracto alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 10.000 µg/mL, frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	84
FOTOGRAFÍA No. 15	Actividad antifúngica del extracto alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 20.000 µg/mL frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	84
FOTOGRAFÍA No. 16	Agujero en el centro de las cajas que contienen los extractos. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	85
FOTOGRAFÍA No. 17	Inoculación de hongos patógenos en medios de cultivos compuestos por extractos vegetales. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	85
FOTOGRAFÍA No. 18	Blanco de <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	86
FOTOGRAFÍA No. 19	Comparación de la actividad antifúngica del liofilizado del agua de cocción al (36%) del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL, frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	86
FOTOGRAFÍA No. 20	Comparación de la actividad antifúngica del liofilizado del agua de hidratación al (35%) del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL, frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	87
FOTOGRAFÍA No. 21	Blanco de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	87
FOTOGRAFÍA No. 22	Comparación de la actividad antifúngica del liofilizado del agua de cocción al (36%) del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	88

FOTOGRAFÍA No. 23	Comparación de la actividad antifúngica del liofilizado del agua de hidratación al (35%) del proceso de desamargado de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	88
FOTOGRAFÍA No. 24	Comparación de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 20.000 µg/mL; blanco frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	89
FOTOGRAFÍA No. 25	Comparación de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 1.250 µg/mL 156 µg/mL; 10 µg/mL; blanco frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	89
FOTOGRAFÍA No. 26	Comparación de la actividad antifúngica del extracto alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 20.000 µg/mL; blanco, frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	90
FOTOGRAFÍA No. 27	Comparación de la actividad antifúngica del extracto alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 1.250 µg/mL; 156 µg/mL; 10 µg/mL; blanco frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	90
FOTOGRAFÍA No. 28	Comparación de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 20.000 µg/mL; blanco, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 22402. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	91
FOTOGRAFÍA No. 29	Comparación de la actividad antifúngica del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 1.250 µg/mL; 156 µg/mL, 10 µg/mL, blanco, frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214 Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	91

FOTOGRAFÍA No. 30	Comparación de la actividad antifúngica del extracto alcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet a 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 20.000 µg/mL, blanco frente a <i>Mycrosporium canis</i> ATCC 10214. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Octubre 2008.....	92
-------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

INTRODUCCIÓN

Lupinus spp se ha investigado en varios países como gran potencial en la fuente alimentaria debido a su contenido alto de proteína (35-40%) y aceite (8-12%), alta productividad y bajo costo del cultivo (49).

El interés en la producción del chocho está aumentando, debido a su potencial como una fuente de proteína, o para propósitos farmacéuticos (65).

En el Ecuador el rendimiento de producción según el INEC 1968 - 1992 de *Lupinus* en la sierra es de 0,257 toneladas por hectárea, con rangos de 0,22 a 0,88 toneladas por hectárea. La variedad Andino 450 utilizada por el INIAP presentó rendimientos entre 0,33 a 1,3 toneladas por hectárea. Según la información recaudada por el Tercer Censo agropecuario el número de UPA fue de 9.596 con una superficie de siembra 5.974 hectáreas y una superficie de cosecha de 3.900 hectáreas (9)

En el chocho los niveles de proteína son similares o mayores que en el grano de soya, sin embargo el principal problema es el contenido en alcaloides quinolizidínicos los cuales proveen un sabor amargo y toxicidad a las semillas (49). Los principales alcaloides quinolizidínicos presentes en el chocho son: lupanina (46%), esparteína (14%), 4-hidroxilupanina (10%), isolupanina (3%), n-metilangustifolina (3%), 13-hidroxilupanina (1%) (36).

Se conoce que en el agua proveniente del desamargado del chocho existe 3.53% (P/V) de alcaloides los mismos que al ser vertidos a los ríos, acequias, etc, provocan contaminación en el ambiente ocasionando la muerte de algunas especies por la gran toxicidad que poseen (26).

En efecto, el ser humano muestra una elevada sensibilidad a un exceso de alcaloides, se ha demostrado que aproximadamente 30 mg de alcaloides por Kg de peso corporal causaron graves intoxicaciones en los adultos; en niños pequeños la cantidad correspondiente fue de 10 a 15 mg/Kg de peso corporal (28)

Por ello un procedimiento usual para la eliminación de estos alcaloides es lavar las semillas en corriente de agua, a pesar de lo simple, este método necesita de grandes volúmenes de agua para el procesamiento de *Lupinus* a escala comercial (49).

A través del desarrollo de tecnologías para el aprovechamiento del subproducto del desamargado se evitaría la descarga indiscriminada al medio circundante reduciendo la contaminación y mediante un tratamiento adecuado se lograría reutilizar el agua obteniendo los alcaloides, que podrán ser empleadas en la elaboración de fitomedicamentos por la actividad que poseen. Los alcaloides quinolizidínicos poseen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivíricas, lo cuál se ha demostrado en condiciones de laboratorio (39). Es así que esparteína, lupinina, lupanidina, son alcaloides quinolizidínicos que actualmente están siendo utilizados para controlar garrapatas y parásitos gastrointestinales, tales como lombrices en los animales domésticos (34).

De otro lado, las infecciones humanas ocasionadas por dermatofitos y *Candida* sp, en particular las relacionadas con la piel y membranas mucosas, están aumentando a un ritmo alarmante especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Este aumento que se ha relacionado directamente en el crecimiento de la población de individuos inmunodeprimidos (18).

En base a este antecedente, paralelamente al procesamiento del chocho, cabe aplicar tecnologías para el aprovechamiento del subproducto del desamargado “los alcaloides”, tendiendo a remediar la descarga indiscriminada al medio circundante para prevenir el impacto de la contaminación.

Un tratamiento adecuado lograría reutilizar el agua y obtener los alcaloides para aprovechar sus propiedades en interesantes aplicaciones relacionadas con el control de agentes de contaminación biológica, cultivos agrícolas, diversos materiales y tejidos humanos y animales, pues últimamente extractos de plantas han cobrado interés como agentes antimicrobianos usados en dermatología (72).

En este contexto, los objetivos planteados para la presente investigación fueron:

1. Cuantificar los alcaloides presentes en el agua del desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet).
2. Realizar pruebas “*in vitro*” de la actividad antifúngica del extracto acuoso sobre *Candida albicans* ATCC 1023, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso sobre *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402.

La hipótesis planteada en esta investigación fué: “Los alcaloides presentes en el agua del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) tienen actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402”

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 *Lupinus mutabilis* Sweet.

1.1.1 ORIGEN.

Lupinus son especies de leguminosas que crecen comercialmente en varias partes del mundo, incluyendo América del Sur, Europa y Australia (21). *Lupinus mutabilis* es originario de América del Sur y del Mediterráneo, son legumbres muy promisorias que pueden crecer en suelos pobres (59).

En el género *Lupinus* los alcaloides se sintetizan en los cloroplastos de las hojas y son transportados vía floema a otros órganos de la planta para su almacenamiento en tejido epidérmico y subepidérmico de hojas tallos y principalmente semillas (75). Las semillas de *lupinus* de la variedad dulce tienen bajos contenidos de alcaloides (59), son una buena fuente de nutrientes, debido al contenido de proteínas, lípidos, fibra dietética, minerales y vitaminas (44).

Las semillas de *Lupinus* contienen 40% de proteínas y 20% de grasa, similar a la soya pero valores más altos que otras legumbres. Las globulinas son las proteínas principales de reserva (80-90%) en *Lupinos*, estos valores son similares a los reportados en la mayoría de semillas de legumbres. (58) También los *Lupinus* son fuentes nutritivas importantes de hidratos de carbono complejos, minerales, vitaminas y antioxidantes (55). Además *lupinos* contienen compuestos con capacidad antioxidante tales como polifenoles, principalmente taninos y flavonoides. Sin embargo aunque estas semillas tienen los más bajos niveles de compuestos no nutricionales (inhibidores de tripsina,

ácido fítico, saponinas y lectinas, contienen también grandes cantidades de alfa galactósidos (7-15%) (44). En las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet se han detectado también hormonas vegetales (10).

Las proteínas principales de las semillas se localizan en vacuolas de almacenamiento de los tejidos cotiledonarios y la mayoría, pero no exclusivamente pertenecen a la familia de proteínas de almacenamiento y sirven como fuentes de nitrógeno y esqueletos carbonados para la planta (16).

Lupinus utiliza alcaloides quinolizidínicos como defensa contra predadores, pero esto es un factor limitante para el consumo humano. Concentraciones elevadas producen gusto amargo, y se han reportado efectos farmacológicos. Sin embargo, se ha probado que los alcaloides no son tóxicos a concentraciones bajas. Cualquier efecto potencial de los alcaloides en *lupinus* se elimina durante la preparación de proteína ya que los alcaloides son solubles en agua y se remueven durante el proceso (58).

La demanda para alimentos saludables se incrementa rápidamente en países desarrollados. En este sentido la Organización Mundial de la Salud (OMS) aconseja el consumo frecuente de proteína vegetal en lugar de las proteínas animales con cantidades considerables de grasa saturada y colesterol (44).

Las leguminosas presentan una de las alternativas más promisorias para la suplementación nutricional y el mejoramiento tecnológico de alimentos tradicionales (44).

1.1.2. TAXONOMIA de *Lupinus mutabilis* Sweet.

Tronco	: Cormofitas
División	: Embriofitas sifonógamas
Sub División	: Angiosperma
Clase	: Dicotiledóneas
Sub Clase	: Arquiclamideas
Orden	: Rosales
Familia	: Leguminosas
Sub Familia	: Papilionáceas
Género	: <i>Lupinus</i>
Especie	: <i>mutabilis</i>
Nombre Científico	: <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet
Nombre Común	: Tarwi, Chocho (54)

1.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA de *Lupinus mutabilis* Sweet.

Es una leguminosa herbácea, erecta de tallos cilíndricos, robustos, algo leñosos, generalmente de color verde oscuro, amarillento a veces variando a castaño, que se ramifica a partir de un eje central en forma de un candelabro, alcanza alturas de 0,8 – 2,0 m. Las hojas son palmeadas, digitadas; la floración y formación de frutos es a menudo dispersa en el tiempo, las flores son de color azul pero pueden cambiar a blanco y rosado (Fotografía No 2). Las vainas contienen de 6 a 8 semillas., recubiertas por un tegumento endurecido contienen alcaloides amargos que impiden su consumo directo (11) (66).



FOTOGRAFÍA No. 1. Semillas de *Lupinus* **FOTOGRAFÍA. No. 2 Planta de *Lupinus***

El fruto es de forma elíptica u oblonga, aguda en ambos extremos (Fotografía No. 1) con cerca de 120 vainas por planta, en ellas se encuentran las semillas que pueden variar en su número y pueden ser de forma redonda u ovalada, lenticulares, de 5-15 mm de largo y de 6-8 mm de ancho, de color variable, pueden ser blancas, marrones o negras y tienen un diámetro aproximado de 1 cm. Los colores se presentan en forma combinada, pudiendo ser marmoteado, en media luna o salpicado. El tegumento que cubre esta semilla es de forma dura y debe permeabilizarse para permitir la salida de los alcaloides (11) (13).

1.1.4 VALOR NUTRITIVO.

Las semillas son excepcionales nutritivas. Quitándole la cáscara a la semilla y moliendo el grano se obtiene una harina constituida por proteínas, minerales, carbohidratos. (Tabla No 1) (40).

La proteína del tarwi contiene cantidades adecuadas de lisina y cistina, pero tiene únicamente del 23 al 30% de la metionina requerida para el óptimo crecimiento de los animales. El aceite de tarwi es de color claro lo cual lo hace aceptable para el uso doméstico. Es similar al aceite de maní y es relativamente rico en ácidos grasos no

saturados, incluyendo el ácido linoleico. El contenido de fibra de la semilla no es excesivo, pero se estima que pueda constituir una fuente importante de minerales (40).

TABLA No 1. COMPOSICIÓN POR 100 g DE PORCIÓN COMESTIBLE DEL TARWI

Composición	Unidades	Valores promedio
Energía	Cal	369,00
Agua	G	11,70
Proteína	G	42,20
Grasa	G	16,00
Carbohidratos	G	26,70
Fibra	G	7,50
Ceniza	G	0,00
Calcio	Mg	98,00
Fósforo	Mg	542,00
Hierro	Mg	7,80
Tiamina	Mg	0,46
Riboflavina	Mg	0,52
Niacina	Mg	2,00
Ácido Ascórbico	Mg	0,00

Fuente: <http://www.uncp.edu.pe/ci/proyectos/trabajos/QUIMICA%20OBTENCION%20DE%20ALCOHOL%20A%20PARTIR%20DE%20LA%20MALTA%20DE%20LUPINUS.pdf> (54)

1.1.5 CONSUMO HUMANO

Es apropiado para la elaboración de productos alimenticios, comidas con alto contenido proteico. Este vegetal da lugar a infinidad de preparaciones en la gastronomía; en los Andes las semillas cocidas constituyen un ingrediente para sopas, guisos, purés, salsas, cebiche serrano, crema de chocho, postres y refrescos (jugo de papaya con harina de tarwi) (40).

1.2 ALCALOIDES.

Los alcaloides son extremadamente difíciles de definir porque no representan un grupo de compuestos homogéneos, sea desde el punto de vista químico, bioquímico y fisiológico (35). Sin embargo los alcaloides son sustancias nitrogenadas básicas y de acción farmacológica potente. Solubles en solventes lipófilos y sus sales en disolventes hidrófilos (41) (38).

1.2.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS GENERALES DE LOS ALCALOIDES.

Las bases de alcaloides son normalmente sólidos cristalizables, mientras que las bases oxigenadas son líquidas a temperatura ambiente. En general los alcaloides son bases poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares o poco polares y en alcoholes de elevada graduación. Al ser básicos los alcaloides forman sales con ácidos minerales u orgánicos y estos en cambio son solubles en agua. La formación de sales estabiliza la molécula por lo que comercialmente los alcaloides se encuentran en estado de sales (8).

1.2.2 ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS.

Los alcaloides quinolizidínicos están ampliamente distribuidos entre las leguminosas lotoideas, siendo los *Lupinus* los más ricos en este tipo de alcaloides que están basados en un anillo bicíclico de quinolizidina (6) (28).

En *Lupinus mutabilis* se han encontrado 25 alcaloides quinolizidínicos de los cuales 19 se han identificado hasta la presente (Tabla 2) (28).

TABLA No 2. COMPOSICIÓN RELATIVA DE ALCALOIDES EN LA SEMILLA DE *Lupinus mutabilis*.

Alcaloides	Composición Relativa de Alcaloides (%)
Esparteína	7,39
K2 (no identificada)	0,07
Ammodendrina	0,23
K5 (no identificada)	0,16
N-Metilangustifolia	3,46
Angustifolia + 17 oxoesparteína	0,60
Isolupanina	0,29
K9 (no identificada)	57,5
4- hidroxilupanina	8,65
Multiflorina	0,14
17- Oxolupanina	0,09
Anagirina	0,03
13-Hidroxilupanina	14,9
4,13- dehidroxilupanina	2,12
K17- K19 (no identificada)	0,09
13- tigloiloxilupanina	0,28
Monoangeloil + ester de la monogloil	0,45
de la 4,13 dehidroxilupanina	0,08
K24 (no identificada)	0,21
13 Benzoiloxilupanina	1,15
13-cis-cinnammoiloxilupanina	0,39
13-trans-cinnammoilxilupanina	99,39
13-angeloiloxilupanina	1,57
Contenido total de alcaloides en la semilla	3,10

FUENTE: HATZOLD Et al (1982)

1.2.2.1 Propiedades físico químicas de los alcaloides quinolizidínicos.

Son compuestos que biogénicamente derivan de la lisina y que poseen en su estructura simplemente una o dos quinolizidinas (estructura heterocíclica nitrogenada bicíclica) por lo que se diferencian de otras estructuras alcaloídicas en las que coexiste la quinolizidina con otra estructura nitrogenada diferente (1).

Estos compuestos poseen propiedades alcalinas debido a la presencia de nitrógeno básico formando por lo general núcleos heterocíclicos. Estos en forma libre son insolubles en el agua, poco solubles en alcohol e insolubles en éter y cloroformo, la mayoría poseen oxígeno en su estructura y son sólidos no volátiles, sin embargo algunos no contienen oxígeno como la esparteína siendo esta líquida a temperatura ambiente (36) (62).

- **Lupanina**

La lupanina es el alcaloide que se encuentra en mayor concentración en el chocho, su fórmula estructural $C_{15}H_{24}N_2O$ (Figura No 1), tiene un peso molecular de 248,36 g/mol, es soluble en agua, cloroformo, éter y alcohol e insoluble en éter de petróleo (36).

Se puede encontrar la d y l – lupanina así como también sus mezclas, las mismas que pueden ser identificadas por la presencia de una de las formas ópticamente activas. La forma racémica es encontrada en los lupinos blancos (36).

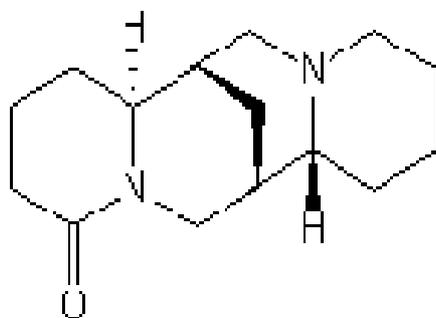


FIGURA No. 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA LUPANINA (36).

La d – lupanina es un líquido espeso cristalino con agujas higroscópicas, punto de fusión entre 40-44 °C, con punto de ebullición entre 190-193 °C, índice de refracción igual a 1,5444, soluble en agua, cloroformo, éter y alcohol e insoluble en éter de petróleo; puede ser determinada por el gran número de derivados: monohidrocloreto pf 217 - 269 °C, dehidrocloreto pf. 162 – 167 °C monohidrobromuro pf. 127 °C, picrato pf. 211 °C (36).

La l – lupanina es un aceite viscoso, con un punto de ebullición entre 186–188 °C, puede formar compuestos como monohidroyoduro pf. 183 – 185 °C, perclorato pf. 213 °C, y otras sales que podrían tener similares puntos de fusión a sus derivados análogos de la d – lupanina (36).

La lupanina tiene actividad antibacteriana, antinematocida contra lepidópteros y coleópteros, también produce inhibición de las actividades moduladoras, inhibe la síntesis de proteínas, además posee actividad antiarrítmica, hipotensora, y actividad hipoglicemiante (36).

- **Esparteína.**

La esparteína, $C_{15}H_{26}N_2$, presenta átomos de nitrógeno unidos en forma terciaria, tienen un peso molecular de 234 g/mol, (Figura No 2). Es un líquido oleoso, espeso, incoloro con olor débil a anilina y sabor sumamente amargo. Tiene un peso específico de 1,02 a 20 y hierve a 311 en corriente alcalina. Es insoluble en agua, alcohol, éter, y cloroformo, con reacción alcalina (36).

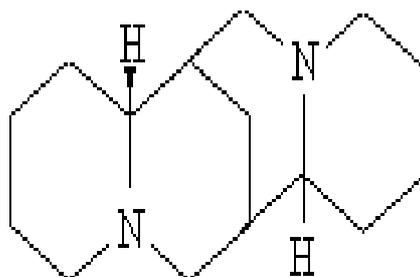


FIGURA No. 2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ESPARTEÍNA (36).

La esparteína es un gangliopléjico poco potente, bloquea la transmisión por impedir la despolarización de la membrana postsináptica; después de una fase transitoria de excitación ganglionar, aísla el miocardio de la influencia neurovegetativa central, disminuye la excitabilidad del tejido nodal, la conductibilidad, frecuencia y amplitud de las concentraciones. Sus efectos secundarios son poco importantes como trastornos digestivos, hipotensión ortostática (36).

Sin embargo, esparteína, se ha usado farmacológicamente como sulfato de esparteína en el tratamiento de arritmias cardíacas. Se han usado también plantas que contenían esparteína como fuente diurética, lo que es atribuido a sus propiedades a nivel cardíaco. También se ha usado como oxitócico (15).

Esparteína y lupanina son considerados tóxicos para los vertebrados por ser agonistas de los receptores de acetilcolina, inhibidores de los canales de Na^+ y K^+ , lo que bloquea la señal de transducción neuronal (14).

Además inhibe la síntesis y formación del RNAt, es un depresor del sistema nervioso central, posee actividad, oxiotócica, uterotónica, antiarrítmica, diurética, hipoglicemiante, por otro lado es estimulante respiratorio (29).

- **Hidroxilupanina.**

Su fórmula es $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ con un peso molecular igual a 264 g/mol. Los compuestos salinos más representativos de la hidroxilupanina son: hidrocloreto pf. 275 °C, cloruro aúrico pf. 210 °C, picrobromato pf. 174-175 °C, hidrocloreto pf. 91-93 °C, tiocianato monohidratado pf. 125 °C (36).

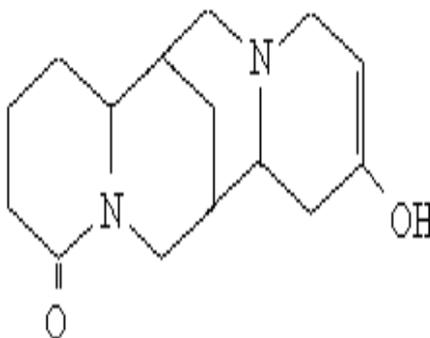


FIGURA No. 3: ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA 4- HIDROXILUPANINA (36)

Se han identificado dos formas isómeras de la hidroxilupanina como unidades químicas representativas, dependiendo de la localización del grupo hidroxilo en la estructura básica de la molécula, estas son: 4 - hidroxilupanina (Figura No 3) y la 13 - hidroxilupanina (36).

- Lupinina.

La lupinina (Figura No 4) se caracteriza por tener la forma de prismas ortorómbicos, es soluble en agua, éter, alcohol o cloroformo, es una base fuerte. La forma racémica de la lupanina fue sintetizada por Becheleide en 1951. La lupanina se difunde más rápidamente a través de las membranas biológicas, y la duración de su actividad es más corta que la esparteína. Esto demuestra que dichos alcaloides puros o en forma de sales (clorhidratos y sulfatos) administrados en dosis altas actúan como tóxicos, pero cuando se administran en dosis moderadas actúan como medicamento (24).

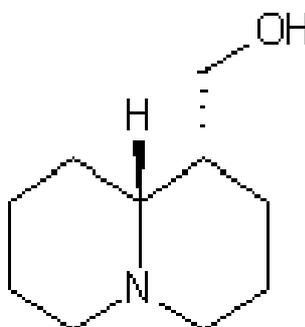


FIGURA No. 4: ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA LUPININA (36)

- **Angustifolina.**

La angustifolina inhibe el crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis* y *Escherichia coli*, participa en la inhibición de las actividades moduladoras y en la biosíntesis de las proteínas. La angustifolina posee actividades similares a la de la esparteína, lupanina, angustifolina, 13 – hidroxilupanina, lupinina, 17 – oxoesparteína, 13 – tiglioiloxilupanina, La anagirina produce malformaciones congénitas en terneros (36).

1.2.3 APLICACIONES DE LOS ALCALOIDES DE *Lupinus*.

El principal propósito de los alcaloides del chocho es la defensa de la planta (36), contra animales herbívoros (nematodos, insectos, vertebrados) (75). Ocasionalmente los agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, tienen efectos tóxicos y mutagénicos en conejos, áfidos, nemátodos, abejas, caracoles, langostas, gusanos y escarabajos (36).

Aunque los alcaloides son ampliamente reconocidos en el área de la medicina, en términos de química ecológica, los alcaloides en el género *Lupinus* representan un importante sistema químico de defensa contra microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos), y contra otras especies de plantas que causan competencia (75).

La lupanina, esparteína, 13 – hidroxilupanina, angustifolina, inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*. Los dos primeros alcaloides poseen actividad antifúngica mientras que la lupinina, lupanina, 13 – oxoesparteína y esparteína, tienen actividad insecticida, reprimiendo en los insectos el deseo de alimentación, de esta manera eliminan su supervivencia. Posee utilidad práctica comercial, gracias a sus aplicaciones en medicina y en el campo industrial (36).

La esparteína tiene efectos cardiovasculares, es tónico cardíaco, antiespasmódico y sedante la dosis de uso farmacológico es de 0,10 a 0,20 g por día (61). En el campo de la agricultura la lupanina puede ser usada como herbicida, así como repelente de insectos y

como protector de las plantas, también se considera que los alcaloides puros tienen algún grado de actividad antifúngica (36).

La presencia de flavonoides y alcaloides, les confiere la actividad antibacteriana, y actividad antifúngica en el caso de los alcaloides. La mayor resolución de inhibición se debe, al flavonoide y al alcaloide; con similar o igual poder de inhibición contra bacterias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* ATCC 9341) y bacterias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*), la acción antimicrobiana se debería a que los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combina y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos. La acción antibacteriana y antifúngica de los alcaloides se podría deber a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida (22).

En un estudio experimental clásico realizado con 30 *Pediculus humanus capitis*, empleando extracto acuoso de *Lupinus mutabilis* Sweet la mayor eficacia alcanzaron con el extracto obtenido a 150 minutos de cocción, para lo que se estimó un ratio de 93% de mortalidad (61).

1.2.4 TOXICIDAD DE LOS ALCALOIDES DEL CHOCHO.

Jurado (1989), indica que los alcaloides en sí, tienen una acción paralizante del sistema nervioso central, especialmente sobre los centros respiratorio y vasomotor, los que primero son estimulados y luego paralizados, produciéndose muerte por asfixia asociada con convulsiones (15).

La toxicidad de estos compuestos ha sido demostrada a dosis muy altas tanto en animales como en seres humanos. Dosis comprendidas entre 11 a 25 mg/Kg de peso corporal en niños y dosis de 25 a 46 mg/Kg de peso corporal en adultos producen graves intoxicaciones. Los síntomas de envenenamiento son: midriasis, calambres, cianosis, parálisis respiratoria, dolores estomacales violentos, vómitos e incluso coma (36).

Los síntomas y trastornos tóxicos en peces es muy variada. La mayoría de los venenos o alteraciones son específicos de los órganos; según esto se distingue sustancias irritantes de los epitelios, venenos sanguíneos y venenos nerviosos. Los primeros son los que provocan la irritación de las mucosas, tanto internas como externas (boca, intestino), con subsiguiente formación de mucus, enrojecimiento y hemorragias. Los venenos sanguíneos provocan hemólisis y anemia mientras que los venenos nerviosos originan en los peces los movimientos incoordinados, reacciones de huida o marcadas manifestaciones parálíticas. En todos los casos el veneno penetra a través de la superficie externa de los peces, donde deja sentir sus efectos (36).

Con la Dosis Efectiva Media (DE50) del efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet al 10% p/v, realizado en 40 ratas albinas se evidenció que a una concentración de 100 mg/Kg persistió la máxima inflamación es decir hubo una inhibición del 0% de inflamación y a las dosis de 200, 400 y 500 mg/kg se obtuvieron una inhibición del 35%, 72% y 80,4% respectivamente. Obteniéndose una DE50 de 241 mg/kg de peso, con un límite superior al 95% de 300,65 mg/Kg y un límite inferior de 193,233 mg/kg (7).

A la dosis de 500 mg se observó algunas convulsiones y ocasionó la muerte en una de ellas posiblemente al alto contenido en alcaloides como: esparteína, lupinina, entre otros, que tiene el extracto metanólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet que presentan un bajo índice terapéutico, debiendo ser utilizadas con precaución (7). La lupanina inhibe el crecimiento de los hongos. Los valores de ED50 están en un rango de 10-50 nmol (29).

1.2.5 PROCESO DE *Lupinus* PARA USO COMO ALIMENTO.

El grano de tarwi crudo es amargo (alto contenido de esparteína, lupinina), por lo tanto es inconsumible, motivo por el que no es apetecido por aves, rumiantes ni insectos; por ello para consumir los granos de tarwi el primer paso es el desamargado (34).

Se receipta, clasifica e hidrata el grano, con agua; el calentamiento del agua se realiza con energía solar 50% y energía eléctrica 50% a 40°C. Una vez que el agua alcanza la temperatura indicada, los sacos de polietileno con el grano son introducidos en el tanque de hidratación. El remojo se lleva a cabo por 14 horas, tiempo en el cual el contenido mínimo de agua en los granos hidratados es del 95%. El chocho hidratado se dispone en recipientes para ser cocido durante 40 minutos. El grano cocido es transferido al tanque de lavado, se aplica una dosis de hipoclorito de calcio a 7 ppm, con la agitación del agua que ayuda a la eliminación de alcaloides, los agitadores funcionan durante toda la etapa del lavado del grano (72 horas) (26).

El contenido de alcaloides residuales en el grano desamargado fluctúa entre 0,02-0,07%, (p/p) la dureza no sobrepasa los 8,2 mm de penetración. El reporte microbiológico indica ausencia de *E. coli* y el contenido de aerobios totales no sobrepasa el nivel de 1×10^5 UFC/g (26).

El producto obtenido presenta un color crema uniforme, sabor y olor característicos (26). El agua del desamargado es de color amarillo marfil con sabor muy amargo (34).

1.3 MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Los hongos están constituidos por células con estructura de célula eucariota y material genético distribuido en un núcleo, con una membrana celular rígida. Se dividen en dos grupos los mohos (hongos filamentosos) y las levaduras. Los mohos están constituidos por filamentos multinucleados denominados hifas que se reproducen continuamente por sus extremos y con frecuencia se ramifican. Las levaduras se reproducen por gemación y ocasionalmente pueden formar filamentos o pseudohifas (32).

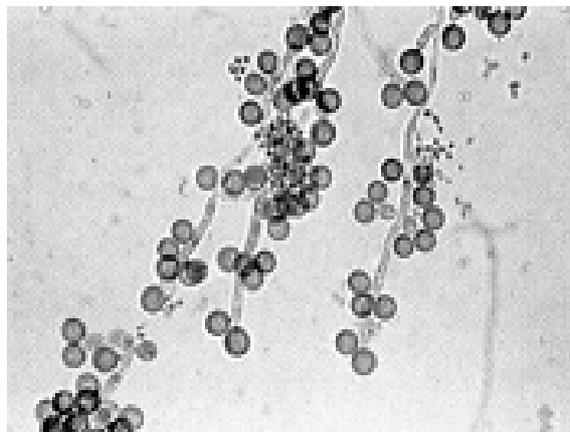
1.3.1. *Candida albicans* ATCC 10231

1.3.1.1 Clasificación.

División : Deuteromycota
Clase : Blastomycetidae.
Familia : Cryptococcaceae.
Género : *Candida*.
Especie : *albicans* (63).

1.3.1.2 Morfología.

Candida albicans es un hongo pequeño de tipo levadura, oval que se produce por gemación de 3-5 μm de paredes delgadas, usualmente acompañadas por estructuras tubulares (seudohifas) con estrechamiento en los tabiques de los que salen las ramificaciones. Se han descrito 4 estados morfológicos: levaduras, células esféricas u ovals que se reproducen por gemación, seudomicelio, formado por cadenas de células levaduriformes alargadas; micelio verdadero, que son células grandes, de pared gruesa que se originan en las ramas terminales del micelio. Sus colonias son lisas cremosas y brillantes (Fotografía No 3) (25) (50) (51).



FOTOGRAFÍA No.3 *Candida albicans* (64).

1.3.1.3 Epidemiología.

Candida es el más común de los patógenos implicado en infecciones humanas particularmente de la piel y membranas mucosas, las que están incrementándose alarmantemente en países tropicales y subtropicales en desarrollo, debido al incremento se ha relacionado directamente con el aumento de la población de individuos inmunocomprometidos sujetos a quimioterapia intensiva y drogas inmunosupresoras, el sida (74), y otros factores también han contribuido al problema como órganos trasplantados o terapia con antibióticos de amplio espectro, conduciendo a una infección fungal severa (33).

1.3.1.4 Principales patologías.

Candida spp son levaduras comensales que se encuentran en las superficies mucosas y tejidos epiteliales de vertebrados. Las condiciones fisiológica e inmune de los hospederos y la versatilidad de las levaduras en sobrevivir en muchos sitios anatómicos son factores importantes en la transición de levaduras comensales a agentes de enfermedad. Muchos factores de virulencia putativos pueden contribuir a la invasividad y patogenicidad, tales como su capacidad para adherirse a tejidos, a superficies hidrofóbicas, la conversión de levaduras unicelulares a formas filamentosas y la expresión de enzimas extracelulares tales como aspartil proteinasas y fosfolipasas (33).

Varias drogas antifúngicas, tales como fluconazol, ketoconazol, nistatina, anfotericina B y 5-fluorocitosina pueden interferir con ciertos factores de virulencia. La inmunidad innata por células fagocíticas esta implicada en la respuesta a la invasión por *Candida* y muchas drogas pueden estar asociadas con mecanismos inmunomodulatorios, contribuyendo en la actividad antifúngica (33).

Las infecciones producidas por *C. albicans* se pueden dividir en tres grupos: candidiasis cutaneomucosas: intertrigo, oniquia y paroniquia, erosión interdigital, candidiasis oral, candidiasis esofágica, vaginitis, balanopostitis, vulvovaginitis, otras candidiasis cutaneomucosas como foliculitis, quelitis, entre otras. Candidiasis mucocutánea crónica,

la cual es infrecuente. Candidiasis sistémica causante de endocarditis, candidiasis pulmonar, candidiasis renal, candidiasis del sistema nervioso central, candidiasis ocular (69).

1.3.2 HONGOS DERMATOFITOS.

1.3.2.1 Generalidades

La etimología del término dermatofito proviene de los términos griegos *derm* (que significa piel) y *phyte* (que significa planta). Sin embargo, debido a que los dermatofitos no están filogenéticamente relacionados con las plantas (como se creía antiguamente), este término puede considerarse como no adecuado en la actualidad (19).

Los dermatofitos son hongos patogénicos humanos y animales que causan infecciones cutáneas. Estos hongos crecen exclusivamente en el estrato corneo, uñas o pelo y producen enzimas hidrolíticas que degradan tejidos compactos queratinizados. Como muchos hongos los dermatofitos secretan sustancias con actividad proteolítica conteniendo proteína como única fuente de carbono y nitrógeno (77). Las infecciones producidas por estos hongos se denominan dermatofitosis, aunque comúnmente también son llamadas tiñas (19).

La palabra tiña proviene del latín *tinea* que significa gusano o polilla. La tiña se clasifica de acuerdo al lugar donde se descubre. Las infecciones se encuentran primariamente en animales, (micosis superficiales en perros y gatos) (45) (71).

De acuerdo con su hábitat natural, los dermatofitos pueden dividirse en tres grupos ecológicos (Tabla 3) (19).

- a) **Geofílicos:** Comprenden especies que se encuentran en el suelo actuando como saprobios y que se nutren de la queratina allí existente (pelos, escamas y plumas) y pueden infectar tanto el ser humano como los animales (19).

b) **Zoofílicos:** Comprenden especies que infectan los animales y éstos, a su vez, pueden infectar el ser humano (19).

c) **Antropofílicos:** Comprenden aquellas especies que infectan solamente al ser humano y que son transmisibles por contacto directo o indirecto (19).

TABLA No 3. CLASIFICACIÓN DE LOS DERMATOFITOS SEGÚN SU NICHO ECOLÓGICO.

ANTROPOFÍLICOS	ZOOFÍLICOS	GEOFÍLICOS
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. amazonicum</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. cookei</i>
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>T. erinacei</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>T. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. simii</i>	<i>M. praecox</i>
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. tonsurans</i>		<i>T. ajelloi</i>
<i>T. violaceum</i>		<i>T. phaseoliforme</i>
		<i>T. terrestre</i>

FUENTE. www.tesisenxarxa.net/TESIS_URVI/AVAILABLE/TDX-0901106-092655/ Basado en datos publicados por Rubio et al. 1999.

1.3.2 2 *Mycrosporium canis* ATCC 10214

Clasificación de *Mycrosporium canis*

Reino	:	Fungi
División	:	Ascomycota
Orden	:	Onygenales
Familia	:	Arthrodermataceae
Género	:	<i>Microsporium</i>
Especie	:	<i>canis</i> (47)

- Morfología macroscópica y microscópica

Entre sus características morfológicas macroscópicas destacan un crecimiento rápido, al principio de color blanco algodonoso pasando a ser sedoso con pigmento amarillo periférico. Al cabo de 10-15 días, el micelio aéreo es denso, mostrando colonias de color gamuza amarillento, parduzco en el centro (42).

Muestra hifas tabicadas, en raquetas pectinadas, cuerpos nodulares y clamidosporas, junto a macroconidios unicelulares. Los macroconidios de 20 x 120 μ , tienen aspecto fusiforme, pared gruesa con superficie externa espinosa y varias divisiones interiores (septas), (Fotografía No 4). Su número de células es variable, los microconidios, de 3 x 7 μ son alargados y crecen a lo largo de las hifas (48).



FOTOGRAFÍA No 4. MACROCONIDIAS DE *Mycrosporum canis* (30)

- **Manifestaciones clínicas**

Mycrosporum parece preferir sólo la queratina de piel y pelo, en consecuencia rara vez invade las uñas. Crecen dentro y fuera del tallo del pelo formando una vaina de esporas en la superficie de cada cabello. Los pelos infectados tienden a romperse inmediatamente arriba de su origen en la piel, dejando una pequeña cerda (71). *M. canis* causa la tinea de la cabeza, tinea del cuerpo, la tinea de la baba, que se presenta en zonas de la barba y el cuello (12).

1.3.2.3 *Trichophyton rubrum* ATCC 22402

- Clasificación de *Trichophyton rubrum*

Reino	:	Fungi
División	:	Ascomycota
Orden	:	Onygenales
Familia	:	<i>Arthrodermataceae</i>
Género	:	<i>Trichophyton</i>
Especie	:	<i>Trichophyton rubrum</i> (68).

- Morfología macroscópica y microscópica.

En agar glucosado de Sabouraud la colonia al principio es blanca (4), después toma una pigmentación rojiza o púrpura, tanto en el micelio aéreo como en el agar. Las diferentes cepas pueden variar mucho en la cantidad de pigmento producido y pueden conservar el aspecto limitado al fondo de la colonia (71).

Este género produce macroconidios en menor cantidad y microconidios en una mayor proporción (Fotografía No 5). Los macroconidios son lisos, de pared delgada y pueden tener hasta once septos; son de paredes delgadas, dispuestos solitariamente o en racimos y de forma cilíndrica o de lápiz. Los microconidios son piriformes o claviformes (19).



FOTOGRAFÍA No. 5 MICROCONIDIOS DE *Trichophyton rubrum* (30).

- Manifestaciones clínicas

T. rubrum es actualmente el patógeno más común en el mundo entero causante de dermatofitosis tales como tinea capitis, tinea pedis, y onicomicosis (73). Es de gran importancia porque las onicomicosis causadas por este organismo son extremadamente difíciles de curar (3).

1.4 ANTIMICÓTICOS.

Antifúngicos es una sustancia que elimina o detiene el crecimiento de hongos. Agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (20) (27) (60).

1.4.1 CLASIFICACIÓN.

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción (43).

Los antimicóticos pueden clasificarse según criterios convencionales que atienden con el grupo químico al que pertenecen en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (19); de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (2).

1.5 ANTIMICROBIANOS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN COMPUESTOS NATURALES.

Compuestos químicos naturales o presentes naturalmente en alimentos retardan el crecimiento o matan microorganismos. La mayoría de antimicrobianos alimentarios de

este origen son bacteriostáticos o fungistáticos a las concentraciones usuales y no bactericidas o fungicidas (46).

Los blancos para antimicrobianos son microorganismos patogénicos como: *Candida albicans*, *Mycrosporium canis*, *Trichophyton rubrum* y microorganismos saprofiticos contaminantes del ambiente (46).

Muchos factores afectan la actividad antimicrobiana de compuestos naturales, entre estos factores microbianos están la resistencia inherente: células vegetativas versus esporas, diferencias entre cepas, número inicial y tasa de crecimiento, interacción con otros organismos (ejemplo antagonismo), composición celular (reacción al gram), estado celular (injuria), capacidad para formar biopelículas (46).

También la actividad antimicrobiana es afectada por factores asociados con un sustrato por ejemplo nutrientes, pH, capacidad buffer, potencial redox, actividad de agua, todos estos son factores intrínsecos del sustrato. En cambio factores extrínsecos pueden incluir temperatura, atmósfera, humedad relativa (46).

La actividad antimicrobiana de un compuesto natural puede verse afectado por el tiempo de almacenamiento. Cuando el compuesto se adiciona a un producto también le afectan factores de procesamiento, influyen por ejemplo, cambios en la composición del sustrato, cambios en las poblaciones microbianas, cambios en la micro estructura. La mayoría de estos factores influyen la actividad del antimicrobiano de modo interactivo (46).

El pH es el factor más importante que actúa en la efectividad de un antimicrobiano, los antimicrobianos como ácidos débiles penetran la membrana citoplasmática de un microorganismo más efectivamente en la forma protonado (46).

Otro factor es la polaridad, porque guarda relación con la ionización de la molécula y la contribución de cualquier grupo alquílico o moléculas hidrofóbicas parentales (46).

Los antimicrobianos deben ser como mínimo parcialmente hidrofóbicos al unirse y pasar a través de la membrana celular pero también ser como mínimo parcialmente solubles en la fase acuosa en la cual se encuentra el microorganismo (46).

1.6 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La concentración mínima inhibitoria se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$ o mg/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C . La CMI se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (31).

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIA PRIMA

- Material procedente de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet.
- Liofilizado del agua de cocción
- Liofilizado del agua de hidratación
- Aceite de lupanina 2%
- Extracto etéreo crudo de alcaloides (lupanina 7,6%)
- Aguas del proceso de desamargado preparadas en el laboratorio filtradas y no filtradas (filtros Millipore 0,45 µm)
 - a) Cocción de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (300 g/L-1 H)
 - b) Hidratación de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (300 g/L - 48 H)
- Extracto etéreo crudo de alcaloides totales de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet
- Extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet

2.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon cepas tipo de hongos patogénicos: *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402, las que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez de Guayaquil.

2.2.3 MATERIALES

- Asa de platino
- Balón de 500 mL
- Bandejas plásticas
- Buretas
- Caja de guantes estériles
- Cajas petri
- Calculadora
- Capuchones para tubo
- Embudos de separación de 1000mL, 500mL
- Erlenmeyers
- Gradilla para tubos de ensayo
- Gradillas
- Mangueras
- Marcador
- Masquen
- Mechero
- Papel aluminio
- Papel de despacho
- Papel filtro
- Pinzas para buretas
- Pipetas regulables de 10 μ L ; 1,000 μ L
- Pipetas de 10 mL
- Placas porta y cubre objetos 24 x 50

- Probeta 250 mL
- Probeta 50 mL
- Probeta 500 mL
- Puntas estériles
- Regla
- Reverbero eléctrico
- Rollos de algodón
- Soporte universal
- Tapones para embudo
- Trípode
- Tubos de ensayo.
- Tubos tapa rosca
- Varillas de vidrio
- Vasos de precipitación 1.000 mL; 500 mL; 250 mL; 100 mL

2.2.4 REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 0,01N
- Ácido sulfúrico 0,01N
- Agar Müller Hinton
- Agar Sabouraud 4 %
- Agua destilada
- Caldo soya trypticasa
- Cloranfenicol
- Éter
- Hidróxido de amoniaco
- Hidróxido de sodio 0,01N
- Hidróxido de potasio al 15%
- Etanol 96 °
- Acetato de etilo
- Hexano
- Dietil amina

- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo Mayer
- Reactivo Wagner
- Óxido de aluminio

2.2.5 EQUIPOS

- Autoclave (FEDEGARI)
- Balanza de precisión (ADAM AQT)
- Baño María (MLW)
- Estufa de secado (RICARDO PASSANI)
- Estufa bacteriológica (FANEN)
- Microscopio (ERMA)
- Refrigeradora (DUREX)
- Cámara de flujo laminar (ESCO)
- Rotavapor (BUCHI)
- Ultrasonido

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 ANÁLISIS “*in vitro*”

Considerando como factores de estudio cepas tipo de hongos patogénicos *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402 y el comportamiento de cultivos de estos en condiciones estándares de nutrientes e incubación, frente a liofilizados de aguas provenientes del procesamiento del chocho, (semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet).

La actividad antimicótica de los alcaloides presentes en las aguas del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet se determinó a través de mediciones del diámetro de crecimiento de las colonias de hongos de, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402, y la actividad antimicrobiana para *Candida*

albicans ATCC 10231 se determinó por la ausencia o presencia de crecimiento en el sitio de siembra.

2.3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

El material de origen vegetal a ensayar se obtuvo como se detalla a continuación

- Liofilizado del agua de cocción de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (suministrados por el INIAP)
- Liofilizado del agua de hidratación de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (suministrados por el INIAP)
- Aguas del proceso de desamargado preparadas en el laboratorio filtradas a través de (filtros Millipore 0,45 µm) y no filtradas.
 - a) El agua de cocción de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet se preparó cocinando 300 g de grano seco en 1 litro de agua destilada, durante una hora bajo presión atmosférica normal
 - b) El agua de hidratación de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet se obtuvo filtrando un macerado de 48 horas de 300 g de grano molido en 1 litro de agua.

2.3.2.1 EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE ALCALOIDES TOTALES DE LAS SEMILLAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet.

Granos enteros seleccionados se cocieron durante una hora (100 g/300 mL de agua destilada), se filtró, el filtrado se alcalinizó con amoníaco hasta pH 11, se dejó en reposo una hora, se extrajeron los alcaloides con éter (1:1), se recuperó la fase orgánica.

2.3.2.2.1 EXTRACTO ALCOHÓLICO CRUDO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet.

Las hojas frescas se secaron a 35 °C en una estufa de secado, se trituró en un molino se maceró en etanol de 96 ° Gay Lussac, se aplicó en el ultrasonido, se filtró, se adicionó sulfato de sodio, se dejó en reposo 24 horas, se filtró y evaporó a sequedad.

2.3.3 IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

En el material vegetal (Liofilizado) del agua de cocción e hidratación, aguas del proceso de desamargado preparadas en el laboratorio filtradas y no filtradas, extracto etéreo crudo de alcaloides totales de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet y extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet) se realizaron pruebas cualitativas de Dragendorff, Mayer y Wagner para identificación de los alcaloides (37)

2.3.3.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

Soluciones de los liofilizados de las aguas de cocción e hidratación del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet, y el material de control se analizaron por cromatografía en capa fina empleando de 10 a 20 µL de muestra, como adsorbente: sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck); solventes: acetato de etilo, hexano, dietil amina (77,5: 17,5: 5,5) y revelador reactivo de Dragendorff

2.3.4 CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

Se tomaron 0,2 mL de agua de desamargado de chocho, se agregó 0,6 g de óxido de aluminio básico, se mezcló bien y añadió 0,2 mL de KOH al 15%, se agitó hasta formar una pasta homogénea, se agregó 6 mL de cloroformo. Se agitó hasta homogenización y se centrifugó (entre 1.500 y 3.000 rpm), durante 2 minutos Se recuperó la fase clorofórmica, se repitieron las extracciones por lo menos 10 veces, hasta que 1 mL del último extracto evaporado a sequedad, suspendido en 4 o 5 gotas de ácido sulfúrico 0,01N, de reacción negativa con 3 o 4 gotas del reactivo de Dragendorff.

Se recogieron los lavados de todos los extractos, se evaporaron con calor suave sin llegar a sequedad, dejando en la etapa final 1 mL, que desaparecerá rápidamente al enfriar en un recipiente con agua fría. Se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico 0,01N, dos gotas de rojo de metilo y se tituló el exceso de ácido con NaOH 0,01 N. El contenido de alcaloides se reportó como Lupanina considerando que: 1 mL de H₂SO₄ 0,01 N equivale a 2,48 mg de Lupanina.

2.4.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

2.4.1.1 MÉTODO DE MITSCHER *et al* (56).

La actividad antimicótica “*in vitro*” de los alcaloides presentes en los liofilizados de las aguas del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet se evaluó contra *Candida albicans* en agar Müller Hinton suplementado con distintas concentraciones de extractos alcaloidales y observando la densidad del crecimiento, que puede ser abundante, parcial o ausente. Se preparó cantidad suficiente de caldo soya tripticasa (TSB), que fue repartido en matraces de 125 mL de capacidad 25 mL de caldo. Posteriormente se preparó 100 mL de agua destilada estéril y 100 mL de solución salina al 0,9 % repartiéndose 10 mL en tubos de ensayo tapa rosca 150 x 15 mm. El conjunto se autoclavó a 121 °C por 15 minutos. Se llevó a temperatura ambiente el matraz con 25 mL de TSB estéril, codificado con el nombre del microorganismo ATCC y la fecha de siembra.

Con una asa esterilizada a la llama, enfriada se tomó una asada de *C. albicans* del tubo inclinado y se transfirió al matraz codificado, se incubó a 37 °C por 24 horas.

Se preparó agar Müller Hinton que fue repartido en tubos de ensayo con tapa 150 x 15, esterilizado a 121 °C por 15 minutos y manteniendo fluido en baño maría a 45 °C hasta el momento de empleo.

Se sometieron a ensayo concentraciones de 1.000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg /mL, a demás de un tratamiento testigo (0 µg/mL).

Con precisión en un vial, limpio, seco y estéril se pesó 50 mg de las siguientes muestras a.) Liofilizado del agua de hidratación al (35% p/p) del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet, b) Liofilizado del agua de cocción al (36% p/p) del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet, c) Extracto crudo de alcaloides (lupaina al 7,6% p/p), de *Lupinus mutabilis* Sweet d) Aceite de lupanina al 2% de *Lupinus mutabilis* Sweet, e) Aguas del proceso de desamargado preparadas en el laboratorio del grano de *Lupinus mutabilis* Sweet). Las muestras se disolvieron en 500 µL de DMSO. La concentración final del extracto fue de 100.000 µg/mL.

Se preparó una dilución al décimo, utilizando tubos de ensayo 100 x 13 mm limpios, secos y estériles, a los que se añadió 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración de 100.000 µg/mL. La concentración final de esta dilución fue de 10.000 µg/mL.

Se preparó una segunda dilución al décimo, para lo cual se añadió 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración de 10.000 µg/mL. La concentración final de esta dilución fue de 1.000 µg/mL.

Se pipeteó 100 µL de las soluciones del material biológico (concentración de 100.000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 1.000 µg /mL) a los tubos de ensayo conteniendo 10 mL de agar a 45 °C.

Se mezcló con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasó a las cajas petri previamente codificadas con el nombre del extracto, la concentración final de los extractos en las caja fue de 1.000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg /mL respectivamente. Además se añadió directamente 1mL de las aguas del proceso de desamargado en 10 mL de agar.

Del mismo modo se ensayó la concentración mínima inhibitoria con el liofilizado del agua de cocción (36%) y liofilizado del agua de hidratación (35%) preparándose concentraciones de 300 µg/mL; 150 µg/mL; 75 µg/mL; 37,5 µg/mL; 18,75 µg/mL;

9,34 µg/mL; 4,68 µg/mL; 2,34 µg/mL; 1,17 µg/mL; 0,58 µg/mL; 0,29 µg/mL; 0,14 µg/mL en la caja.

También se prepararon concentraciones de 20.000 µg/mL; 10.000 µg/mL y 5.000 µg/mL, del extracto etéreo crudo de alcaloides totales de las semillas y extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet.

Una vez solidificado el medio de cultivo conteniendo el material vegetal se invirtieron las cajas petri y dejaron a temperatura ambiente por 18 a 24 horas. Las cajas petri preparadas no deben mostrar contaminación, si la tienen se desecha y se debe repetir con más cuidado.

Siembra de las cajas:

Se preparó a partir del cultivo caldo soya tripticasa visiblemente turbio, pipeteando 1 mL de suspensión en 10 mL de solución salina estéril. La suspensión de *C. albicans* debe ser equivalente al tubo 0,5 (densidad celular 1.5×10^8 / mL), de la escala Mc Farland. A partir de esta suspensión se tomaron inóculos para estriar cajas petri que se incubaron a 37 °C por 24 a 48 h.

La actividad se manifestó por ausencia de crecimiento visible en las cajas estriadas con la levadura (A). La presencia de poco crecimiento microbiano se califica como parcialmente activo (P), un crecimiento abundante corresponde a un compuesto inactivo (I)

Las cajas petri de control deben tener la apariencia esperada (crecimiento de *C. albicans* en las cajas de control negativo) de no ser ha si el experimento ha fallado y debe ser repetido.

La presencia de pocas colonias en el estriado es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja lejos de la parte donde se estrió, es señal de contaminación y generalmente se ignoran.

2.4.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA.

2.4.2.1 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR CON SUSPENSIÓN DE ESPORAS (56).

Se preparó la suspensión de esporas para lo cual se cultivaron los hongos en estudio, *Mycrosporium canis* ATCC 10214, *Trichophyton rubrum* ATCC 22402 en agar Sabouraud en tubos de ensayo inclinados, incubándolos de 2-3 semanas a 28 °C. A las colonias de los tubos se agregó 3 mL de agua estéril levantando cuidadosamente con una varilla de vidrio todo el crecimiento, se pasó el contenido a un tubo estéril, se agitó de 1 a 2 minutos en el vortex. Posteriormente se contaron las esporas en una cámara de Naeubauer, se diluyó con agua estéril hasta lograr una concentración de 100 esporas/mL y se guardó en viales estériles a 4 °C.

La actividad antimicótica “*in vitro*” de los alcaloides presentes en los liofilizados de las aguas del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet y el extracto crudo de alcaloides (lupanina 7,6% p/p), se evaluaron en base a la capacidad de inhibición del crecimiento micelial de las dos especies de hongos patógenos.

Con el propósito de evaluar concentraciones de 10 µg/mL; 100 µg/mL, 1.000 µg/mL, a demás de un tratamiento testigo (0 µg/mL) y un control positivo (Nistatina), en un vial, limpio, seco y estéril se pesó 150 mg del material vegetal (Liofilizado del agua de hidratación al (35%), Liofilizado del agua de cocción al (36%) del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet y extracto crudo de lupanina al (7,6%)), cada muestra de 150 mg se disolvió en 1.000 µL de DMSO. La concentración final del extracto fue 150.000 µg/mL.

Se realizó una dilución al décimo, utilizando tubos de ensayo 100 x 13 mm limpios, secos y estériles con 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración 150.000 µg/mL. La concentración final de esta dilución fue 15.000 µg/mL.

Se realizó una segunda dilución al décimo para lo cual se añadió 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración de 15.000 µg/mL, a tubos estériles. La concentración final fue 1.500 µg/mL.

Se pipeteó separadamente 100 µL, de las soluciones del material biológico (concentración 150.000 µg/mL; 15.000 µg/mL; 1.500 µg/mL) a tubos de ensayo conteniendo 15 mL de agar Sabouraud a 45 °C, luego se transfirió inmediatamente a las cajas petri. La concentración final de los extractos fue 1.000 µg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL, respectivamente.

A demás se prepararon concentraciones de 20.000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 5.000 µg/mL; 1.250 µg/mL; 156 µg/mL; 10 µg/mL de extracto etéreo crudo de alcaloides totales de las semillas y extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet, con agar Sabouraud a 45 °C. Para el control positivo se utilizó nistatina preparada en concentraciones iguales a las del material vegetal con agar Sabouraud a 45 °C.

Una vez solidificados los medios de cultivo conteniendo los extractos las cajas se dejaron a temperatura ambiente por 18 a 24 horas.

Posteriormente se hizo un agujero en el centro de las cajas preparadas, con un saca bocados de 6 mm de diámetro, colocándose en cada agujero 30 µL de la suspensión de esporas, se incubó a 28 °C durante 14 días para *M. canis* y por 21 días en el caso de *T. rubrum*.

La actividad antimicótica, se determinó como el porcentaje de inhibición, se midió el diámetro de las colonias en cm, y se comparó con el control negativo utilizándose la siguiente relación:

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{\text{Diámetro de la muestra}}{\text{Diámetro de control}} \times 100$$

En donde, un porcentaje de crecimiento menor al 25% indicó que el hongo es inhibido, en cambio un porcentaje de crecimiento mayor al 25% indicó que el hongo no es inhibido.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Después de finalizar el tiempo de incubación, a las variables crecimiento del micelio y concentraciones, se les realizó un análisis de varianza (ANOVA). Con el paquete computacional Statistical Analysis System (SAS) y algunas medidas se compararon por el test de Tukey ($P= 0,05$)



CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DE LOS ALCALOIDES DE *Lupinus mutabilis* Sweet.

El análisis cromatográfico se desarrollo en: a) aguas del proceso de desamargado; b) extracto etéreo crudo de *Lupinus* obtenido de la extracción básica líquido- líquido de las aguas del desamargado c) extracto crudo alcohólico de las hojas de *L. mutabilis* Sweet.

Las aguas obtenidas en el proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet provenientes del INIAP dieron positivos los ensayos de Dragendorff, Mayer, Wagner verificándose cualitativamente el contenido de alcaloides.

La cromatografía en capa fina para la determinación de alcaloides reveló la presencia de Lupanina en los dos liofilizados, donde el valor teórico referencial fue Rf 0,43 el cual coincidió con el valor del Rf práctico (5) Fotografía No (5y 6).

En estudios preliminares de *Lupinus mutabilis* realizados en Italia se detectó en el extracto crudo de alcaloides que la lupanina es el mayor constituyente, pues alcanzó el 2,5 % en el grano crudo y el 11,5 % en el extracto. El alcaloide segundo en importancia fue la esparteína (0,32 % en grano crudo y 2,5 % en el extracto). Mientras que otros compuestos como la 3- β -hidroxilupanina y 13-hidroxilupanina y tetrahidrorombifolina, se encontraron en menor cantidad (70).



Lupanina Rf 0,43 (mancha de color naranja)

FOTOGRAFÍA No. 5. PLACA CROMATOGRÁFICA DEL LIOFILIZADO DEL AGUA DE COCCIÓN DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet, PARA LA DETECCIÓN DE ALCALOIDES, UTILIZANDO COMO ADSORBENTE: SILICA GEL 60 F₂₆₄ (MERCK). SISTEMA DE SOLVENTES: ACETATO DE ETILO, HEXANO, DIETIL AMINA (77,5: 17,5: 5,5). REVELADOR: REACTIVO DE DRAGENDORFF-



Lupanina Rf 0,43 (mancha de color naranja)

FOTOGRAFÍA No. 6. PLACA CROMATOGRÁFICA DEL LIOFILIZADO DEL AGUA DE HIDRATACIÓN DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet, PARA LA DETECCIÓN DE ALCALOIDES, UTILIZANDO COMO ADSORBENTE: SILICA GEL 60 F₂₆₄ (MERCK). SISTEMA DE SOLVENTES: ACETATO DE ETILO, HEXANO, DIETIL AMINA (77,5: 17,5: 5,5). REVELADOR: REACTIVO DE DRAGENDORFF-

De igual manera en el extracto etéreo crudo de los alcaloides y en el extracto alcohólico de las hojas se identificó la presencia de lupanina.

La cuantificación de lupanina en el agua de cocción reveló una concentración de 36% (p/p) y en el agua de hidratación 35% (p/p), adicionalmente el extracto crudo de alcaloides presentó 137 mg/g de lupanina.

3.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La actividad antifúngica se desarrolló frente a: *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402.

3.2.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LIOFILIZADOS DEL AGUA DEL PROCESO DE DESAMARGADO; EXTRACTO CRUDO DE LUPANINA, EXTRACTO CRUDO ETÉREO DE ALCALOIDES TOTALES Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE *Candida albicans* ATCC 10231.

Liofilizados del agua de cocción en concentraciones de 1.000µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL no mostraron actividad frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Concentraciones intermedias entre estos ensayos también fueron inactivas. Se estima que las concentraciones ensayadas son demasiado bajas para activar mecanismos inhibitorios de estos patógenos.

Los métodos de extracción empleados en las aguas del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet pueden suministrar alcaloides y otros principios en concentración insuficiente para dar respuesta positiva al ensayo de Mitscher; se sugiere que la metodología de extracción puede afectar en alguna medida a los compuestos activos.

Se presumió que el liofilizado pudo afectar la potencial actividad de los alcaloides de *Lupinus* por lo que se prepararon las aguas de proceso a nivel de laboratorio para someter

a ensayo el material sin liofilizar; encontrándose inactividad en las concentraciones 1.000µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL, inclusive 1 ml de las aguas ensayadas (purificada y no purificada) fue inactivo contra *Candida albicans*. Adicionalmente se ensayaron aceite de *Lupinus* con 2% de lupanina y extracto de las semillas de alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet, con 7,6% de lupanina a las concentraciones de 1.000µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL resultando también inactivos.

En tales concentraciones no se observó sensibilidad de *C. albicans* al extracto, concentraciones de los liofilizados superiores a 1.000 µg/mL no se analizaron debido a que su solubilidad fue un factor limitante, coincidiendo con los estudios de Galarza, J. *et .al* (23).

Sin embargo se ensayaron dosis de desafío del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano obteniéndose actividad frente a *Candida albicans* en concentraciones de 20.000 µg/mL; 10.000 µg/mL y 5.000 µg/mL, lo cual corrobora que la metodología de extracción degrada a los compuestos activos.

El extracto alcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet a las concentraciones de 20.000 µg/mL; 10.000 µg/mL y 5.000 µg/mL fue inactivo frente al patógeno.

La acción antimicrobiana de los alcaloides se atribuye a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida (23).

3.2.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402.

En relación al desarrollo de hongos filamentosos, el material ensayado (liofilizados del agua de cocción e hidratación del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet) no inhibe completamente a *Mycrosporium canis* ATCC 10214 puesto que se observó crecimientos superiores al 25%, sin embargo se observó reducción en el porcentaje de crecimiento en un rango de 0,54% a 14,95%. *T. rubrum* ATCC 22402 tampoco fue inhibido, pero su crecimiento se redujo entre 1,3% a 2,6%. (Anexo: Gráfico No. 1 y 2).

3.2.2.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LIOFILIZADOS DEL AGUA DEL PROCESO DE DESAMARGADO FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214

Los efectos de los liofilizados de las aguas del procesamiento del chocho se observaron durante tres estadíos de crecimiento a los 6,10 y 14 días de cultivo en agar Sabouraud glucosado al 4% a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. bajo estas condiciones los análisis de varianza al 0,05 % mostraron diferencias significativas (Cuadro No 1), indicando que en el comportamiento de *Mycrosporium canis* influenciaron las distintas dosis ensayadas y la procedencia del material analizado.

CUADRO No. 1. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA DETERMINACIÓN “ in vitro” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DE LAS AGUAS DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.

a. Porcentaje de crecimiento al día 6.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	1223,329722			
A	1	387,4336111	387,4336111	67,67	<,0001
B	2	405,2688889	202,6344444	35,39	<,0001
A*B	2	258,8688889	129,4344444	22,61	<,0001
Error	30	171,758333	5,725278		

b. Porcentaje de crecimiento al día 10.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	1149,368889			
A	1	260,2844444	260,2844444	168,28	<,0001
B	2	384,5038889	192,2519444	124,29	<,0001
A*B	2	458,1772222	229,0886111	148,11	<,0001
Error	30	46,403333	1,546778		

c. Porcentaje de crecimiento al día 14.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	2642,018889			
A	1	712,8900000	712,8900000	479,06	<,0001
B	2	984,5538889	492,2769444	330,81	<,0001
A*B	2	899,9316667	449,9658333	302,37	<,0001
Error	30	44,643333	1,488111		

La evaluación en el día 6 indicó que las concentraciones de (10 µg/mL) del liofilizado del agua de cocción del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet (LC) y liofilizado del agua de hidratación del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet (LH), son estadísticamente iguales, no presentaron poder de inhibición micótica debido a que el porcentaje de crecimiento del hongo fue superior al 25%. Igual comportamiento se observó en la concentración 1.000 µg/mL (Cuadro 2).

Por otro lado, al comparar los promedios de la tasa de crecimiento de *M. canis*, por efecto de las diferentes concentraciones, de los liofilizados (LC y LH), se determinaron diferencias estadísticas (Cuadro No 2).

Al utilizar el LC ensayado en las concentraciones de 10; 100 y 1.000 µg/mL, el hongo creció en porcentajes superiores al 25%. No hubo actividad antimicótica, pero los porcentajes de crecimiento difieren estadísticamente entre si. (Cuadro No 2).

Al emplear LH a las concentraciones de 10; 100 y 1.000 µg/mL no existe actividad frente a *M. canis*, el crecimiento micelial no mostró diferencias significativas entre si. Este tratamiento tampoco produjo inhibición (Cuadro No 2).

Los efectos de las concentraciones de (10; 100 y 1.000 µg/mL) del LC y LH, en el día 10, estadísticamente son diferentes, pero no presentan poder de inhibición micótica debido a que el porcentaje de crecimiento del hongo es superior al 25%. Igual comportamiento presentan los porcentajes de crecimiento ensayados en el día 14 (Cuadro No 2).

Por otro lado al comparar los promedios de la tasa de crecimiento de *M. canis* en el día 10, por efecto de la utilización de diferentes niveles de concentración, dentro de cada liofilizado (LC y LH), se determinaron diferencias estadísticas, así se determinó que al utilizar el LC ensayado en las concentraciones de 10 y 100 µg/mL, no difieren estadísticamente entre sí, la concentración de 1.000 µg/mL difiere estadísticamente de las anteriores. Ninguna concentración ensayada presentó actividad antimicótica. Un comportamiento igual sucedió el día 14 (Cuadro No 2).

CUADRO No. 2. TEST DE TUKEY AL 95% DE LA DETERMINACIÓN “ *in vitro* ” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DE LAS AGUAS DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008.

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE <i>Mycrosporium canis</i> EN LOS LIOFILIZADOS DEL AGUA DE COCCIÓN E HIDRATACIÓN DENTRO DE CADA CONCENTRACIÓN															
Concentraciones(µg/mL)	10				100				1.000				X	Prob.	CV (%)
Liofilizados	C		H		C		H		C		H				
Día 6	99,90	a	99,90	a	91,92	b	98,30	a	85,06	b	98,28	b	95,56	0,0001	2,50
Día 10	99,03	a	99,00	b	98,73	b	99,88	a	84,43	a	98,55	b	96,75	0,0001	1,28
Día 14	99,52	a	100,0	b	96,10	b	99,37	a	76,31	b	99,27	a	95,10	0,0001	1,29

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE <i>Mycrosporium canis</i> DE ACUERDO A LA CONCENTRACIÓN DENTRO DE CADA LIOFILIZADO															
Liofilizados	COCCIÓN						HIDRATACIÓN						X	Prob.	CV (%)
Concentraciones(µg/mL)	10		100		1.000		10		100		1.000				
Día 6	99,90	a	91,92	b	85,06	c	99,90	a	98,30	a	98,28	a	95,56	0,0001	2,5
Día 10	99,03	a	98,73	a	84,43	b	99,90	a	99,88	a	98,55	a	96,75	0,0001	1,28
Día 14	99,52	a	96,10	a	76,31	b	100,0	a	99,37	a	99,27	a	95,10	0,0001	1,29

3.2.2.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LIOFILIZADOS DEL AGUA DEL PROCESO DE DESAMARGADO FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402.

Los efectos de los liofilizados de las aguas del procesamiento del chocho se observaron durante tres estadios de crecimiento a los 8, 14 y 21 días de cultivo en agar Sabouraud glucosado al 4% a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, en estas condiciones el análisis de varianza al 0,05% analizado en los diferentes días indicó que en el comportamiento de *Trichophyton rubrum* no influenciaron las distintas dosis ensayadas; ni la procedencia del material analizado (Cuadro No 3)

CUADRO No. 3. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA DETERMINACIÓN “ *in vitro*” DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DE LAS AGUAS DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A DIFERENTES CONCENTRACIONES. FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008.

a. Porcentaje de crecimiento al día 8.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	35	408,1624306			
A	1	18,56173611	18,56173611	1,55	0,2234
B	2	16,06847222	8,03423611	0,67	0,5197
A*B	2	13,22513889	6,61256944	0,55	0,5823
Error	30	360,3070833	12,0102361		

b. Porcentaje de crecimiento al día 14.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	35	145,2563889			
A	1	4,91361111	4,91361111	1,15	0,2931
B	2	4,47055556	2,23527778	0,52	0,5992
A*B	2	7,16722222	3,58361111	0,84	0,4436
Error	30	128,7050000	4,2901667		

c. Porcentaje de crecimiento al día 21.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	35	72,05087500			
A	1	9,51722500	9,51722500	6,75	0,1440
B	2	16,56011667	8,28005833	5,87	0,2171
A*B	2	3,65711667	1,82855833	1,30	0,2884
Error	30	42,31641667	1,41054722		

Los análisis indicaron que no existen diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento del hongo por efecto de las concentraciones evaluadas en los días 8 y 14, En cambio en el día 21 los porcentajes de crecimiento evaluados a las concentraciones de 100 y 1.000 $\mu\text{g/mL}$ son iguales pero difieren estadísticamente del analizado a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Ninguna concentración de los liofilizados muestran actividad fungicida por presentar porcentajes de crecimiento superiores al 25% (Cuadro No 4).

CUADRO No. 4. TEST DE TUKEY AL 95% DE LA DETERMINACIÓN “*in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DE LAS AGUAS DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008.

Días de incubación	CONCENTRACIONES DEL LIOFILIZADO DE AGUAS DE COCCIÓN E HIDRATACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)						X	Prob.	CV (%)
	10		100		1.000				
8	97,81	a	97,52	a	96,27	a	97,2	0,5197	3,56
14	98,76	a	98,26	a	97,92	a	98,31	0,5992	2,11
21	99,81	a	98,61	b	98,21	b	98,88	0,0100	1,20

3.2.2.3 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE LUPANINA AL 7,6%, FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214

El crecimiento de *Mycrosporium canis* en presencia de lupanina al 7,6% a los 6, 10 y 14 días del ensayo presentaron diferencias significativas ($P = 0,05$) por influencia de las distintas concentraciones evaluadas (Cuadro No 5).

CUADRO No. 5. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA DETERMINACIÓN “in vitro” DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE LUPANINA AL 7,6%, A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008.

a. Porcentaje de crecimiento al día 6.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	17	615,8234000			
Tratamiento	2	607,1296000	303,5648000	523,76	<,0001
Error	15	8,6938000	0,5795867		

b. Porcentaje de crecimiento al día 10.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	17	300,6672000			
Tratamiento	2	294,4656000	147,2328000	356,12	<,0001
Error	15	6,2016000	0,4134400		

c. Porcentaje de crecimiento al día 14.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	17	192,4862500			
Tratamiento	2	189,0625000	94,5312500	414,16	<,0001
Error	15	3,4237500	0,2282500		

M. canis presentó un crecimiento del 100% con las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, evaluadas en los días 6, 10 y 14. Las concentraciones tienen el mismo efecto sobre el patógeno. Sin embargo la concentración de 1.000 $\mu\text{g/mL}$, limitó el crecimiento a 87,76, 91,42 y 93,12%, en su orden respectivo. Ninguna concentración inhibió el crecimiento del hongo (Cuadro 6).

CUADRO No. 6. TEST DE TUKEY AL 95% DE LA DETERMINACIÓN “*in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE LUPANINA AL 7,6%, A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008

Días de incubación	CONCENTRACIONES DE LUPANINA AL 7,6%				x	Prob.	CV (%)		
	10		100	1.000					
6	100	a	100	a	87,76	b	95,92	0,0001	0,81
10	100	a	100	a	91,42	b	97,14	0,0001	0,66
14	100	a	100	a	93,12	b	97,71	0,0001	0,49

3.2.2.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE LUPANINA AL 7,6%, FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402.

Los análisis de varianza ($P=0,05$) evaluados los días 8, 14 y 21, mostraron diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por efecto de las concentraciones evaluadas (Cuadro No 7).

CUADRO No. 7. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA DETERMINACIÓN “*in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE LUPANINA AL 7,6%, A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008.

a. Porcentaje de crecimiento al día 8.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	17	57,32569444			
Tratamiento	2	21,31361111	10,65680556	4,44	0,0306
Error	15	36,01208333	2,40080556		

b. Porcentaje de crecimiento al día 14.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	17	10,97685000			
Tratamiento	2	6,30010000	3,15005000	10,10	0,0017
Error	15	4,67675000	0,31178333		

c. Porcentaje de crecimiento al día 21.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	17	3,88676111			
Tratamiento	2	1,85867778	0,92933889	6,87	0,0076
Error	15	2,02808333	0,13520556		

Los porcentajes de crecimiento (Cuadro No 8) indican que al utilizar concentraciones de 10 y 100 µg/mL, evaluadas en los días 8; 14 y 21, *T. rubrum*, presentó un crecimiento del 100%, cualquiera de las dos concentraciones actúa igual sobre el patógeno. Sin embargo el efecto de la concentración de 1.000 µg/mL difiere estadísticamente de los anteriores al permitir crecimientos de 97,69; 98,74 y 99,32%. Pero en todo caso ninguna concentración inhibe el crecimiento del hongo.

CUADRO No.8. TEST DE TUKEY AL 95% DE LA DETERMINACIÓN “*in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE LUPANINA AL 7,6%, A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008

Días de incubación	Concentraciones de lupanina al 7,6% (µg/mL)					x	Prob.	CV (%)	
	10	100	1.000						
8	100	a	100	a	97,69	b	99,23	0,0001	1,56
14	100	a	100	a	98,74	b	99,58	0,0001	0,56
21	100	a	100	a	99,32	b	99,77	0,0001	0,37

La falta de actividad antimicrobiana de los liofilizados de las aguas del procesamiento de *Lupinus mutabilis* Sweet pudo resultar de concentraciones insuficientes de alcaloides puros obtenidos por el método de extracción utilizado, pese a que pruebas clásicas de identificación de Dragendorff, Mayer, Wagner y una cromatografía en capa fina determinaron presencia de este principio activo en todas las soluciones testadas.

La eficacia antimicrobiana también pudo ser interferida por materia orgánica propias de las semillas del alimento coincidiendo con los hallazgos de Tomlinson, S y Palombo, E. en estudios similares efectuados en *fabaceae* (leguminosas) con actividad antimicrobiana (53).

En las concentraciones 10; 100 y 1.000 µg/mL de alcaloides totales procedentes de las aguas de cocción e hidratación del proceso de desamargado del chocho y extracto crudo de lupanina no se detectó sensibilidad de los hongos patogénicos, sin embargo no se ensayaron concentraciones más altas, debido a que la solubilidad es un factor limitante, de acuerdo a lo demostrado por GALARZA, J. *et. al* (23).

En el presente estudio al no encontrar actividad antifúngica en el material de ensayo se procedió a extraer y purificar en el laboratorio alcaloides totales del grano crudo, para realizar ensayos de actividad antimicrobiana que hasta el momento no se han reportado en la literatura. Esto debido a que trabajos similares con otras especies de *Lupinus* arrojaron resultados positivos para algunas fracciones de alcaloides, por ejemplo Fuertes, R. *et. al* reportaron inhibición de *Aspergillus niger* y *C. albicans* (22).

Debiendo anotarse que trabajos similares con otras especies de *Lupinus* como *Lupinus exaltatus* Zuccen han demostrado actividad de alcaloides contra fitopatógenos como *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (75).

Así mismo el extracto de alcaloides de *Lupinus angustifolius* mostró actividad antibacteriana contra, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*; excepto con *Escherichia coli* para la cual la actividad fue débilmente significativa. Adicionalmente hubo actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *C. krusei* (17).

3.2.2.5 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214.

Los efectos del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y extracto crudo alcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet se observaron en los días 6, 10 y 14, de crecimiento del patógeno; los análisis de varianza al (P = 0,05 %) mostraron diferencias significativas (Cuadro No 9), indicando que en el comportamiento de

Mycrosporium canis influenciaron las distintas dosis ensayadas y la procedencia del material analizado.

CUADRO No. 9. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA DETERMINACIÓN “ *in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008.

a. Porcentaje de crecimiento al día 6.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	71	166118,9318			
A	1	100,6781	100,6781	36,92	<,0001
B	5	165291,8411	33058,3682	12123,0	<,0001
A*B	5	562,7985	112,5597	41,28	<,0001
Error	60	163,6141	2,7269		

b. Porcentaje de crecimiento al día 10.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	71	154184,6104			
A	1	129,5782	129,5782	253,74	<,0001
B	5	150690,4626	30138,0925	59016,3	<,0001
A*B	5	3333,9292	666,7858	1305,70	<,0001
Error	60	30,6404	0,5107		

c. Porcentaje de crecimiento al día 14.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	71	144383,8661			
A	1	1073,3117	1073,3117	138,55	<,0001
B	5	136796,7340	27359,3468	3531,64	<,0001
A*B	5	6049,0043	1209,8009	156,17	<,0001
Error	60	464,8161	7,7469		

La evaluación del día 6; en el primer nivel de concentración (10 µg/mL), los tratamientos, Extracto Etéreo Crudo de los Alkaloides Totales del Grano de *Lupinus mutabilis* Sweet (ECAT) y Extracto Alcohólico Crudo de las Hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet (EAH) con promedios de 99,29 y 99,22% son estadísticamente iguales. (Cuadro No 10).

En el segundo nivel de concentración (156 µg/mL), los tratamientos, ECAT y EAH presentaron promedios de crecimiento de 97,40 y 98,17% que son estadísticamente iguales (Cuadro No 10).

Dentro del tercer nivel de concentración (1.250 µg/mL), se determinó un promedio de 82,47% para el EAH, el mismo que difiere estadísticamente del tratamiento ECAT que presentó un promedio de 97,32%, lo cuál indica una mayor eficiencia en la inhibición al utilizar el EAH, sobre *M. canis* (Cuadro 10).

Dentro de las concentraciones 5.000; 10.000 y 20.000 µg/mL, los tratamientos, ECAT y EAH presentaron una inhibición del 100%, al no registrar crecimiento de *M. canis* (Cuadro 10).

Por otro lado al comparar los promedios de la tasa de crecimiento de *M. canis*, por efecto de la utilización de diferentes niveles de concentración, dentro de cada extracto (ECAT y EAH), se determinaron diferencias estadísticas, así se determinó que al utilizar el ECAT se obtiene una inhibición del 100% mediante la utilización, de concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 µg/mL, a los que no se registró crecimiento de *M. canis*, sin embargo con niveles de 10; 156 y 1.250 µg/mL, se registraron tasas de crecimiento de 99,29; 97,40 y 97,32 % respectivamente, los mismos que no difieren estadísticamente entre si (Cuadro 10).

De la misma manera al utilizar EAH, se obtuvo una inhibición del 100% mediante el empleo de concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 µg/mL, al no registrar crecimiento de *M. canis*, debiendo resaltarse que el uso de niveles de 10; 156 y 1.250 µg/mL, registraron promedios de crecimiento de 99,22; 98,17 y 82,47 % en su orden, siendo estadísticamente iguales (Cuadro 10).

Los tratamientos, ECAT y EAH evaluados el día 10 a la concentración de 10 µg/mL con promedios de 99,13 y 99,39% son estadísticamente iguales (Cuadro 10).

En el segundo nivel de concentración (156 µg/mL), los tratamientos, ECAT y EAH son estadísticamente iguales al mostrar promedios de 91,1 y 99,09 % (Cuadro 10).

Dentro del tercer nivel de concentración (1.250 µg/mL), se determinó un promedio de crecimiento de 81,58 % para el EAH, el que difiere estadísticamente del tratamiento ECAT que presentó un promedio de 99,37%, lo cual indica una mayor eficiencia en la inhibición al utilizar el EAH, sobre *Mycrosporium canis* (Cuadro 10).

En el cuarto nivel de concentración (5.000 µg/mL), estadísticamente existió diferencias obteniéndose un promedio de crecimiento del hongo de 0,0 % para el ECAT y 39,59 para EAH, existiendo una mejor eficiencia en la inhibición del crecimiento al utilizar ECAT en este nivel (Cuadro 10).

Las concentraciones, 10.000 y 20.000 µg/mL, los tratamientos, ECAT y EAH presentaron una inhibición del 100%, al no registrar crecimiento de *M. canis* (Cuadro 10).

Por otro lado al comparar los promedios de la tasa de crecimiento del hongo, por efecto de la utilización de diferentes niveles de concentración, dentro de cada extracto (ECAT y EAH), se determinaron diferencias estadísticas, así se determinó que al utilizar el ECAT se obtiene una inhibición del 100% mediante la utilización, de concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 µg/mL, al no presentar crecimiento el hongo; en cambio al utilizar niveles de 10; 156 y 1.250 µg/mL, se registraron tasas de crecimiento de 99,13; 99,10 y 99,37 % respectivamente, los que no difieren estadísticamente entre si (Cuadro 10).

De igual manera, con el EAH, se obtiene una inhibición del 100% mediante el empleo de concentraciones de, 10.000 y 20.000 µg/mL, al no existir crecimiento del hongo, debiendo resaltarse que el uso de niveles de 10; 156 y 1.250 y 5.000 µg/mL, registraron promedios de crecimiento de 99,39; 99,09; 81,58 y 30,59 %, los mismos que difieren estadísticamente entre si (Cuadro 10).

Los efectos de las concentraciones (20.000; 10.000; 5.000; 1.250; 156; 10 $\mu\text{g/mL}$) evaluadas en el día 14 son las siguientes; en el primer nivel de concentración (10 $\mu\text{g/mL}$), los tratamientos, ECAT y EAH son estadísticamente iguales, presentando promedios de 99,78 y 99,68% (Cuadro 10).

Dentro del segundo nivel de concentración (156 $\mu\text{g/mL}$), los tratamientos, ECAT y EAH mostraron promedios de 99,59 y 99,56 % siendo estadísticamente iguales (Cuadro 10).

Para el tercer nivel de concentración (1.250 $\mu\text{g/mL}$), existió un promedio de 81,66 % para el EAH, el que difiere estadísticamente del tratamiento ECAT que presentó un promedio de 99,59%, lo cuál indica una mayor eficiencia en la inhibición al utilizar el EAH, sobre *M. canis* con este nivel de concentración (Cuadro 10).

A las concentraciones (5.000 $\mu\text{g/mL}$ y 10.000 $\mu\text{g/mL}$), estadísticamente existió diferencias obteniéndose un promedio de crecimiento del hongo de 0,0 % para el ECAT en el cuarto y quinto nivel; en cambio con EAH el porcentaje de crecimiento fue de 42,69 y 18,29% en su orden (Cuadro 10).

En la concentración de 20.000 $\mu\text{g/mL}$, los tratamientos, ECAT y EAH presentaron una inhibición del 100%, al no registrar crecimiento de *M. canis*. Son estadísticamente iguales. (Cuadro 10).

Al utilizar ECAT se obtuvo una inhibición del 100% con concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, al no presentar crecimiento de hongo, en cambio al utilizar niveles de 10; 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$, se registraron crecimientos de 99,68; 99,59 y 99,59 % respectivamente, valores que no difieren estadísticamente entre sí (Cuadro 10).

De igual manera, con EAH, se obtuvo una inhibición del 100% con la concentración de 20.000 $\mu\text{g/mL}$ y 87,71% con 10.000 $\mu\text{g/mL}$, debiendo resaltarse que el uso de niveles de 10; 156 y 1.250 y 5.000, registraron promedios de crecimiento de 99,78; 99,56; 81,66; 42,69 y 18,29%, los mismos que difieren estadísticamente entre sí. Actividad antifúngica se registró al emplear la concentración de 5.000 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 10).

CUADRO No. 10. TEST DE TUKEY AL 95% DE LA DETERMINACIÓN “ *in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A DIFERENTES CONCENTRACIONES. FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE <i>Mycrosporium canis</i> EN LOS EXTRACTOS DENTRO DE CADA CONCENTRACIÓN																											
Concentraciones (µg/mL)	10		156		1.250		5.000		10.000		20.000		X	Prob.	CV (%)												
	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT	EAH															
Día 6	99,29	a	99,22	a	97,40	a	98,17	a	97,32	a	82,47	b	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	47,83	0,0001	3,43		
Día 10	99,13	a	99,39	a	99,10	a	99,09	a	99,37	a	81,58	b	0,00	b	30,59	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	50,68	0,0001	1,42
Día 14	99,68	a	99,78	a	99,59	a	99,56	a	99,59	a	81,66	b	0,00	b	42,69	a	0,00	b	18,29	a	0,00	a	0,00	a	53,40	0,0001	5,24

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE <i>Mycrosporium canis</i> DE ACUERDO A LA CONCENTRACIÓN DENTRO DE CADA EXTRACTO																													
Extractos	ECAT						EAH						X	Prob.	CV (%)														
	Concentraciones (µg/mL)		10	156	1.250	5.000	10.000	20.000	10	156	1.250	5.000				10.000	20.000												
Día 6	99,29	a	97,40	a	97,32	a	0,00	b	0,00	b	0,00	b	99,22	a	98,17	a	82,47	b	0,00	c	0,00	c	0,00	c	0,00	c	47,83	0,0001	3,45
Día 10	99,13	a	99,10	a	99,37	a	0,00	b	0,00	b	0,00	b	99,39	a	99,09	a	81,58	b	30,59	c	0,00	d	0,00	d	0,00	d	50,68	0,0001	1,42
Día 14	99,68	a	99,59	a	96,59	a	0,00	b	0,00	b	0,00	b	99,78	a	99,56	a	81,66	b	42,69	c	18,29	d	0,00	e	0,00	e	53,15	0,0001	5,24

3.2.2.6 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402.

Los análisis de varianza (P=0,05) analizados los días 8, 14 y 21, mostraron diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por efecto de las concentraciones evaluadas (Cuadro 11).

CUADRO No. 11. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA DETERMINACIÓN “ *in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008

a. Porcentaje de crecimiento al día 8.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	71	172982,5241			
A	1	1,0512	1,0512	0,20	0,6564
B	5	172633,4814	34526,6963	6566,13	<,0001
A*B	5	32,4931	6,4986	1,24	0,3037
Error	60	315,4983	5,2583		

b. Porcentaje de crecimiento al día 14.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	71	127167,4340			
A	1	9733,6128	9733,6128	15967,4	<,0001
B	5	106025,3728	21205,0746	34785,7	<,0001
A*B	5	11371,8729	2274,3746	3730,98	<,0001
Error	60	36,5755	0,6096		

c. Porcentaje de crecimiento al día 21.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	71	131305,0804			
A	1	7878,4720	7878,4720	19701,6	<,0001
B	5	113697,4358	22739,4872	56864,4	<,0001
A*B	5	9705,1793	1941,0359	4853,92	<,0001
Error	60	23,9934	0,3999		

En el día 8 fueron evaluadas las siguientes concentraciones (20.000; 10.000; 5.000; 1.250; 156 y 10 $\mu\text{g/mL}$); encontrándose que el desarrollo de *T. rubrum* por efecto de el ECAT y EAH a las concentraciones de 10; 156 $\mu\text{g/mL}$ son estadísticamente iguales, no presentan poder de inhibición micótica debido a que el porcentaje de crecimiento del hongo es superior al 25% (Cuadro 12).

De igual manera en el tercer nivel de concentración (1.250 $\mu\text{g/mL}$), los tratamientos, ECAT y EAH presentaron promedios de 95,49 y 97,79 % difieren estadísticamente entre si y carecen de actividad micótica (Cuadro 12).

Dentro de las concentraciones 5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, los tratamientos, ECAT y EAH presentaron una inhibición del 100%, al no registrar crecimiento del hongo (Cuadro 12).

Por otro lado al comparar los promedios de la tasa de crecimiento de *T. rubrum*, por efecto de la utilización de diferentes niveles de concentración, dentro de cada extracto (ECAT y EAH), se determinó diferencias estadísticas en las concentraciones dentro de cada extracto, así se determinó que al utilizar el ECAT se obtiene una inhibición del 100% mediante la utilización, de concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, al no registrar crecimiento del hongo, sin embargo al utilizar niveles de 10, 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$, el extracto no presenta actividad al registrarse tasas de crecimiento de 99,48; 98,17 y 95,40 % respectivamente, Las concentraciones de 10, 156 $\mu\text{g/mL}$ difieren estadísticamente de la concentración 1.250 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 12).

De la misma manera al utilizar EAH, se obtiene una inhibición del 100% mediante el empleo de concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, al no registrar crecimiento de *T. rubrum*, debiendo resaltarse que el uso de niveles de 10, 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$, registraron promedios de crecimiento de 97,79; 98,27 y 87,79 % en su orden, siendo estadísticamente iguales (Cuadro 12).

Al comparar los promedios de la tasa de crecimiento de *T. rubrum*, por efecto de la utilización de extractos crudos de los alcaloides a diferentes concentraciones evaluadas

en el día 14 registraron diferencias significativas; de esta manera en las concentraciones (10; 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$), del ECAT y EAH son estadísticamente iguales. No presentan poder de inhibición micótica debido a que el porcentaje de crecimiento del hongo es superior al 25% (Cuadro 12).

En la concentración de 5.000 $\mu\text{g/mL}$, el tratamiento, ECAT inhibe completamente el crecimiento del hongo, mientras que el EAH revela que no existe una inhibición (Cuadro 12).

Las concentraciones de 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, utilizadas en las pruebas “*in vitro*”, sobre *T. rubrum*, son significativamente diferentes sobre el poder de inhibición micótica, en el cuadro 12, se observa claramente que el tratamiento mejor es el ECAT que inhibe el crecimiento completamente, mientras que el tratamiento EAH no produjo inhibición (Cuadro 12).

Al comparar los promedios de crecimiento de *T. rubrum*, por efecto de la utilización de diferentes concentraciones, dentro de cada extracto (ECAT y EAH), se determinó diferencias estadísticas; así que al utilizar el ECAT se obtiene una inhibición del 100% mediante la utilización, de concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, al no registrar crecimiento del hongo, sin embargo al utilizar niveles de 10; 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$, no presenta actividad el extracto al registrarse porcentajes de crecimiento de 99,45; 99,40 y 99,39 % respectivamente, los mismos que no difieren estadísticamente entre si (Cuadro 12).

Al emplear EAH a las concentraciones de 10; 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$ no existe actividad frente a *T. rubrum*, el crecimiento micelial no mostró diferencias significativas entre si, al incrementarse la concentración (5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$), se presentó una reducción en el porcentaje de crecimiento del hongo, los efectos de los extractos difieren estadísticamente entre si, sin embargo a la concentración más alta se registró el menor crecimiento del micelio lo cuál reflejo una inhibición del desarrollo micelial de 69,99%; sin embargo carece de actividad antimicótica ya que para presentar esta actividad debe

existir una inhibición mayor al 75%, para lo cual debe tener un porcentaje de crecimiento menor al 25%.

De igual manera las concentraciones (20.000; 10.000; 5.000; 1.250; 156 y 10 $\mu\text{g/mL}$) ensayadas el día 21 mostraron los siguientes resultados; en las concentraciones de 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$, los tratamientos, ECAT y EAH carecen de actividad, estadísticamente los porcentajes de crecimiento del hongo patógeno son iguales (Cuadro 12).

Las concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, utilizadas en las pruebas “*in vitro*”, sobre *T. rubrum*, son significativamente diferentes sobre el poder de inhibición micótica. El mejor tratamiento es el ECAT por inhibir completamente, mientras que el tratamiento EAH a las concentraciones de 5.000; 10.000 $\mu\text{g/mL}$ no causó inhibición, sin embargo a la concentración más alta (20.000 $\mu\text{g/mL}$), se registró el menor crecimiento del micelio lo cuál se reflejó en una inhibición del desarrollo micelial de 78,84% (Cuadro 12).

Por otro lado al comparar los promedios de la tasa de crecimiento de *T. rubrum*, por efecto de la utilización de diferentes niveles de concentración, dentro de cada extracto (ECAT y EAH), se determinaron diferencias estadísticas, así se determinó que al utilizar el ECAT se obtiene una inhibición del 100% mediante la utilización, de concentraciones de 5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$, al no registrar crecimiento del hongo, sin embargo al utilizar niveles de 10, 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$, no presenta actividad el extracto al registrarse porcentajes de crecimiento de 99,38; 99,22 y 98,53 % respectivamente, los mismos que no difieren estadísticamente entre si (Cuadro 12).

Concentraciones de 10; 156 y 1.250 $\mu\text{g/mL}$ del EAH carecen de actividad frente a *T. rubrum*, el crecimiento micelial no mostró diferencias significativas entre si, al incrementarse la concentración (5.000; 10.000 y 20.000 $\mu\text{g/mL}$), se presentó una reducción en el porcentaje de crecimiento del hongo, difieren estadísticamente entre sí, sin embargo a la concentración más alta se registró el menor crecimiento del micelio lo cuál reflejó una inhibición del desarrollo micelial de 78,84 % (Cuadro 12).

CUADRO No. 12. . TEST DE TUKEY AL 95% DE LA DETERMINACIÓN “ *in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. A DIFERENTES CONCENTRACIONES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2008

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE <i>Trichophyton rubrum</i> EN LOS EXTRACTOS DENTRO DE CADA CONCENTRACIÓN																											
Concentraciones (µg/mL)	10		156		1.250		5.000		10.000		20.000		X	Prob.	CV (%)												
	Extractos	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT	EAH	ECAT				EAH											
Día 8	98,48	A	97,79	a	98,17	a	98,27	a	95,40	b	98,78	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	48,91	0,66	4,68		
Día 14	99,45	A	99,53	a	99,40	a	99,43	a	99,39	a	99,26	a	0,00	b	63,01	a	0,00	b	46,52	a	0,00	b	30,01	a	61,33	0,0001	1,27
Día 21	99,38	B	99,88	a	99,22	a	99,48	a	98,53	a	98,46	a	0,00	b	60,84	a	0,00	b	40,48	a	0,00	b	22,16	a	59,96	0,0001	1,05

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE <i>Trichophyton rubrum</i> DE ACUERDO A LA CONCENTRACIÓN DENTRO DE CADA EXTRACTO																											
Extractos	ECAT						EAH						X	Prob.	CV (%)												
	Concentraciones (µg/mL)	10	156	1.250	5.000	10.000	20.000	10	156	1.250	5.000	10.000				20.000											
Día 8	99,48	a	98,17	a	95,40	b	0,00	c	0,00	c	0,00	c	97,79	a	98,27	a	97,79	a	0,00	b	0,00	b	0,00	b	48,91	0,0001	4,68
Día 14	99,45	a	99,40	a	99,39	a	0,00	b	0,00	b	0,00	b	99,53	a	99,43	a	99,26	a	63,01	b	46,52	c	30,01	d	61,33	0,0001	1,27
Día 21	99,38	a	99,22	ab	98,53	b	0,00	c	0,00	c	0,00	c	99,88	a	99,48	a	99,46	a	60,84	b	40,48	c	22,16	d	59,95	0,0001	1,05

En este estudio al no encontrarse actividad antifúngica a concentraciones usuales para este tipo de ensayos, se probó una concentración de desafío de 20.000µg/mL del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano coincidiendo con el estudio de Fuertes, R. *et. al*; también se usaron dos diluciones consecutivas 1:2 obteniéndose concentraciones de 10.000µg/mL y 5.000µg/mL; encontrándose actividad frente a *M. canis* ATCC 10214 y *T. rubrum* ATCC 22402 en las concentraciones de 20.000µg/mL; 10.000µg/mL y 5.000µg/mL.

Sin embargo, estos extractos son inhibidores débiles de acuerdo con Aligiannis *et. al*, quien propuso una clasificación de materiales de planta basado en los resultados de MIC (Inhibidores fuertes: MIC hasta 500 µg / mL; inhibidores regulares: MIC entre 600 y 1.500 µg/mL; inhibidores débiles: MIC anterior 1.600 µg / mL) (67).

Adicionalmente se ensayaron concentraciones cercanas a las empleadas en el método de Mitscher *et. al*, (10; 100 y 1.000 µg/mL.) las cuáles no inhibieron a los agentes patógenos en estudio.

La inactividad de los extractos de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet a concentraciones de orden de 156 µg/mL significaría falta de utilidad clínica de estos extractos, pues Recio, M, *et. al*, sostiene que cuando un extracto de plantas es activo a 100 µg/mL tiene un buen nivel de potencia ; por lo que dependiendo del agente responsable de la actividad se puede decidir la purificación posterior (57).

La insuficiente actividad de *Lupinus mutabilis* Sweet en este estudio puede explicarse por variantes atribuibles a origen geográfico, fenotipo, clima, procedimiento de extracción, tejido vegetal en estudio, pues este tipo de influencias se ha visto en estudios con aceites esenciales (52)

La actividad antifúngica a la concentración de desafío señala la potencialidad de este alcaloide para ser incorporado en formulados de uso externo destinados al control de *M. canis* y *T. rubrum*.

La mayoría de antibióticos de uso clínico se han obtenido de microorganismos, sin embargo en los últimos 20 años surge un interés renovado por antimicrobianos obtenidos a partir de plantas (18).

En el mundo pocas especies vegetales se han evaluado para actividad antifúngica; por ello, pensando que los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet, podrían funcionar como agentes antifúngicos nuevos y ambientalmente amigables se diseñó el presente estudio.

CAPITULO IV

4 CONCLUSIONES

1. El agua del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet contiene alcaloides expresado como luanina en concentración menor al 40 % (p/p), la cocción facilita una mayor liberación de este compuesto.
2. Las aguas de cocción e hidratación del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet, no presentaron actividad antimicótica contra a *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402, en las condiciones del presente ensayo, en el resultado pudo influir considerablemente presencia de materia orgánica interferente.
3. No se determinó la concentración mínima inhibitoria, de los extractos acuosos debido a la falta de actividad en las pruebas de screening sobre los agentes patogénicos tipo.
4. El extracto etéreo crudo de los alcaloides totales de *Lupinus mutabilis* Sweet empleado a una concentración de desafío 20.000 µg/mL y dos diluciones consecutivas: 10.000 µg/mL y 5.000 µg/mL, fue activo contra *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402
5. El extracto crudo alcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet fue activo contra *Mycrosporium canis* ATCC 10214 por inhibir su crecimiento micelial a las concentraciones de 10.000 µg/mL y 20.000 µg/mL. En cambio la concentración más alta presentó actividad frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 22402, el mismo extracto fue inactivo para *Candida albicans* ATCC 10231.

6. Los alcaloides del chocho muestran actividad antimicótica a concentraciones muy altas en relación a 100 $\mu\text{g/mL}$ que es la asociada a un buen nivel de potencial para aplicaciones de utilidad clínica. Por tanto los alcaloides de *Lupinus* pueden aprovecharse para otro tipo de aplicaciones, por ejemplo para el control de microorganismos de interés en el campo alimenticio.

CAPÍTULO V

5 RECOMENDACIONES

1. Ensayar nuevas formas de extracción que optimicen la concentración de compuestos activos o metabolitos responsables de la actividad antifúngica de los extractos vegetales, de *Lupinus mutabilis* Sweet.
2. El desarrollo de las técnicas de extracción con fluidos supercríticos (EFS) representa una alternativa frente al empleo de solventes orgánicos. La EFS es una aplicación de ingeniería verde, el principio se basa en el empleo de compuestos químicos que son excelentes solventes, para ciertos solutos bajo una combinación de presión y temperatura. Por tanto los extractos de *Lupinus* obtenidos con esta tecnología podrían responder mejor a los ensayos de actividad antimicrobiana.
3. En la presente investigación al realizar el análisis “*in vitro*” de la actividad antifúngica de los extractos de las aguas del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet, sobre hongos patogénicos, se determinó que la actividad fue efectiva en la dosis de desafío ensayada y en las dos diluciones consecutivas, por lo que se recomienda realizar un estudio “*in vivo*” para de esta manera determinar si bajo estas condiciones el extracto sigue siendo activo.
4. Al realizar un estudio “*in vivo*” elaborar una forma farmacéutica de uso tópico para aplicar a personas infectadas con los microorganismos patógenos.
5. Se recomienda investigar la toxicidad de los extractos de *Lupinus mutabilis* Sweet, para adecuar aplicaciones destinados a uso humano o animal.

CAPÍTULO VI

6 RESUMEN

En el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se determinó “*in vitro*” la actividad antifúngica de los liofilizados de las aguas de cocción e hidratación del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho), frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 y *Trichophyton rubrum* ATCC 22402; la investigación esta enfocada a reducir la contaminación ambiental utilizando los alcaloides presentes en las aguas, causantes de la muerte de especies vegetales en el lugar donde son vertidos por la gran toxicidad que poseen. Contó con el financiamiento del INIAP y SENACYT; al realizar el análisis de los liofilizados se determinó la actividad antimicótica utilizando como metodología de ensayo las técnicas de Mitscher *et. al.*, y dilución en agar con suspensión de esporas. Las aguas en las concentraciones de 1.000 µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL no mostraron actividad frente a *Candida albicans* por presentar una densidad de crecimiento abundante. El porcentaje de crecimiento de *Mycrosporium canis* fue mayor al 25% resultando una inhibición negativa para las concentraciones de 1.000 µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL de los liofilizados ensayados; *Trichophyton rubrum* tampoco fue inhibido. Luego del estudio realizado se rechaza la hipótesis debido a que los alcaloides del agua del proceso de desamargado no presentan actividad antifúngica en las distintas concentraciones ensayadas sobre los agentes patogénicos. Por lo que se recomienda investigar nuevas formas de extracción para obtener los alcaloides más puros.

SUMMARY.

At the Food Microbiology Lab of the Science Faculty of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo the anti - fungi activity *in vitro* of the liofilized elements of the cooking and hydration water of the de - embittering process of the *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho) was determined against *Candida albicans* ATCC 10231, *Mycrosporium canis* ATCC 10214 and *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. The investigation is focused on reducing the environmental contamination using the alkaloids present in the water, causing the death of vegetal species in the place it is poured because of the high toxicity it has. It had the INIAP and SENACYT financing. Upon carrying out the liofilized elements analysis the activity antimicotic activity was determined using as an essay methodology the techniques of Mitscher *et. al.* and agar dilution with spore suspension. The water in concentrations of 1.000 µg/mL, 100 µg/mL and 10 µg/mL showed no activity against *Candida albicans* because of the abundant growth density presence. The growth percentage of the *Mycrosporium canis* was higher than 25% resulting in a negative inhibition for the 1.000 µg/mL, 100 µg/mL and 10 µg/mL of the essayed liofilized elements; the *Trichophyton rubrum* was not inhibited either. After carrying out the study, the hypothesis is rejected due to the fact that the alkaloids of the de - embittering process water do not present an antifungi activity in the different concentrations essayed on pathogenic agents. It is therefore recommended to investigate new extraction forms to obtain purer alkaloids.

CAPÍTULO VII

7 BIBLIOGRAFÍA

1. ALCALODES QUINOLIZÍDICOS.

[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$File/web_alcaloides.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/web_alcaloides.htm)
20070528

2. ALLEVATO, M. GALIMBERTI, R. 2007. Antifúngicos ayer, hoy y mañana.

Buenos aires.

20080912

http://www.atdermae.com/pdfs/atd_30_01_02.pdf

3. ASGHARI, F. KHAKSAR, S. BASIRI, G. SADEGHI, A. NAJAFI, A. 2008.

Prevalence of *Trichophyton rubrum* in Tehran, Isolated from Different Levels of Society and Study of Its Probable Organ Orientation. Abstracts, Poster Presentations, 13th International Congress on Infectious Diseases.(Iran) (45): 289

4. ASTUDILLO, C. MANCHENO, M. 1996. Estudio de la Actividad

Antimicrobiana en Extractos Metanólicos de 10 plantas del Oriente Ecuatoriano. Tesis de Dr en Química. Riobamba. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Doctorado en Química. pp. 91-92

5. BAERHIM. A. VERPOORTE, R. 1983. Chromatography of alkaloids. (New

York) (23): 70

6. **BELMAR, R y NAVA R.** Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos
http://www.sian.infove/porcinos/publicaciones/encuentros/viii_encuentro/roberto.ht
20080730
7. **BROPHY, M. CASTRO, M.** Dosis Efectiva Media (DE50) del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Metanólico de *Lupinus mutabilis Sweet* en ratas.
<http://www.medicina.usmp.edu.pe/congresomundial/000data/temlib.htm>.
20070528.
8. **BRUNETÓN, J.** 1991. Elementos de Fotoquímica y Farmacognosia. Traducido por: Ángel Villar del Fresno. Zaragoza. Acribia. pp. 357-407.
9. **CAICEDO, C. PERALTA, C. VILLACRES, E.** 2001. Poscosecha y Mercadelo de Chocho. *Lupinus mutabilis Sweet*. Quito: INIAP. pp. 38 (Boletín Técnico número. 89).
10. **CAMPOS, R. y LOURDES,** Estudio Comparativo de Polifenoles y Determinación de la Presencia de Citoquininas en *Lupinus mutabilis Sweet* y Zea mays variedad de Nueva Granada
<http://www.alfaeditores.com/web/images/stories/REVISTAS/industria/lupinus.pdf>
20070605.
11. **COLQUEHUANCA, H.** 1982. Desamargado del Tarwi en la Planta Piloto del Cuzco. III Congreso Internacional de Cultivos Andinos. La Paz-Bolivia. 8 marzo del 1981. La Paz: Universidad del Cuzco. pp. 291-297.
12. **DERMATOLOGÍA.**
http://www.saludalia.com/starmedia/temas_de_salud/doc/dermatologia/doc/micosis_superficiales.htm
200706

13. DESCRIPTORES DE LUPINOS.

http://www.bioversityinternational.org/publications/Web_version/103/ch2.htm
0070517.

14. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀) DE ALCALOIDES DEL LUPINO EN POLLAS DE REPOSICIÓN BLANCAS Y MARÓN

<http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/articulos/1990/143/pdf/3c enteno.pdf>
2008-07-30

15. DÍAZ .A, 1999, Determinación del efecto de Lupanina y de Esparteína, administradas por vía oral, sobre el comportamiento de pollos Broiler, en el laberinto en cruz elevado. Tesis de Licenciado en Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias pp 8-10

16. DURANTI, M. CONSONNI, A. MAGNI, CH. SESSA, F. SCARAFONI, A. 2008. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. Trends in Food Science & Technology. (Italia) (20): 1-11

17. ERDEMOGLU, N. OZKA, S. TOSUN, F. (2007). Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. Phytochemistry Reviews. (Turquía) (6): 197-201

18. FENNER, R. SORTINO, M. KUZE, M. DALL'AGNOL, R. FERRAZ, A. BERNARDI, A. ALBRING, D. POSER, C. SCHAPOVAL, E. ZACCHINO, S. (2003). Antifungal activity of some Brazilian Hypericum species. Phytomedicine. (Argentina) (12): 236-240

19. **FERNÁNDEZ, B.** 2005. Sensibilidad Antifúngica de los Dermatofitos. Universidad Rovira i Virgili. Tesis doctoral Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. España. pp. 3-6
20. **FORO BIOQUÍMICO.**
<http://www.forobioquimico.com.ar/glosario.html>
20070620
21. **FRANCKI, M. WHITAKER, P. SMITH, P. ATKINS, C.** 2002. Differential expression of a novel gene during seed triacylglycerol accumulation in lupin species (*Lupinus angustifolius* L. and *L. mutabilis* L.). *Funct Integr Genomics.* (Australia) (2): 292-300
22. **FUERTES, R. ROQUE, M. TRISTAN, M.** 1998. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* c.p. Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación (Perú)* (1): 1-10
23. **GALARZA, J. JORDÁ, G. TOTARO, M. NEMETH, L. SALVATIERRA, K. BARGARDI, S. KRAMER, F.** 2007., Concentración inhibitoria mínima de extractos de Katay (*Polygonum punctatum* elliot).
<http://www.unam.edu>.
20081105
24. **GAMARRA, C. GALÁN, L. QUISPE, H.** Evaluación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Acuoso de las Semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet
http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art3_Vol2_N1-2.pdf
20080730
25. **GARCÍA - RODRÍGUEZ, J. A.** 1996. Microbiología Médica. Madrid, Mosby, pp. 179-191, 244-246, 372-374, 691-697.

26. **GAVILÁNES, M.** 2003. HACCP para la planta de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y especificaciones de calidad del grano. Tesis de doctor en Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp. 92-95.
27. **GISPERT, C.** Diccionario Médico Océano. España. MCMXCVI Océano Grupo. pp. 89
28. **GROOS, R.** 1982. El cultivo y la utilización de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). FAO, GTZ, Roma. pp. 150-156.
29. **GUERRERO, M.** 1987. Algunas Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Instituto de Investigaciones Tecnológicas Escuela Politécnica Nacional. Ecuador. pp. 1-2.
30. **HENRÍQUEZ, K. SERRACÍN, D.** Atlas de Micología Médica. 2005. Universidad de Panamá. Facultad de Medicina
http://www.telmeds.org/AVIM/Amico/index_Amico_files/dermatofitos.jpg&imgrefur
20081213
31. **HORNA, G. SILVA, D. VICENTE, W. TAMARIZ, J.** 2005. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Revista Médica Herediana. (Perú) (16): 1-9
32. **INFECCIONES FÚNGICAS SUPERFICIALES**
<http://www.uv.es/derma/CLindex/CLdermatofit/CLdermatofit.html>
20070511

33. **ISHIDA, K. PALAZZO DE MELLO, J. GARCIA, D. DIAS, B. UEDA NAKAMURA, T. VATARU, C.** 2006. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. (Brazil) (58): 942-949
34. **JACOBSEN, S. MUJICA, A.** 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz
<http://beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>
2008-07-23
35. **JAMES, E.** 1979. Farmacognosia. Buenos Aires. Argentina. El Ateol. pp. 34,197.
36. **JARRÍN P.** 2003. Tratamiento del agua de Desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. Tesis de doctor en Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp. 20, 21,81.
37. **JATIVA, C.** 2001. Programa del curso de Farmacognosia y Fotoquímica. pp. 21-24
38. **JÁTIVA, C.** 2000. Texto básico de Farmacognosia. 1^{ra} ed, Riobamba. CDR-XEROX ESPOCH. pp 55-56.
39. **LEE, M. PATE, J. HARRIS, D. ATKINS, C.** 2006. Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* Journal of Experimental Botany L. (Australia): 1-12
40. **LÍNEA DE CULTIVOS ANDINOS.**
<ftp://ftp.Fao.org/docrep/fao/010/ai185s/ai185s04.pdf>
20080925
41. **LITLER, M.** 1975. Farmacología. Argentina. El Ateneon, pp. 6

42. **LLORET, A. y SEGARRA, C.** *Mycrosporium canis*, Características y Diagnóstico. Unidad de Microbiología del Hospital Arnau de Vilanova, Valencia.
http://www.seimc.org/control/revi_Mico/dermatof.htm
20080622
43. **MARRERO, Y. et. al.** Aspectos actuales y revisión de los mecanismos de acción de los fármacos
<http://www.uv.es/divulga/misitio/articulos/ciencia%20y%20tecnologia/marrer01.pdf>
20081222.
44. **MARTÍNEZ, C. ZIELIN, H. FRIAS. J, PISKUŁA, M. KOZŁOWSKA, H. VIDAL, C.** 2008. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. Food Chemistry (Madrid) (30): 1-5
45. **MIMS, C. y PLAYFAIR, J.** 1999. Microbiología Médica. 2^a ed .Madrid. Harcourt Brace. pp. 323-324.
46. **MONTVILLE, T Y WINKOWSKI, K.** 1997. Sistemas biológicos de conservación y bacterias probióticas, en métodos de conservación y conservantes. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. pp. 581-583
47. ***Mycrosporium canis*.**
http://en.citizendium.org/wiki/Microsporium_canis
20090222
48. ***Mycrosporium canis*.**
<http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/033.PDF>
20070603

49. **NOSSACK, A. VILEGAS, J. BAER D. LANCAS, F.** 2000. Supercritical Fluid Extraction and Chromatographic Analysis (HRGC-FID and HRGC-MS) of *Lupinus spp.* Alkaloids. Journal of the Brazilian Chemical Society. (Brazil) (11): 1-12
50. **ORTÍZ, P.** 2005. Incidencia de vaginitis causada por *Candida albicans* en mujeres sexualmente activas en edades comprendidas entre 15- 45 años, atendidas en el Laboratorio Médico Automatizado de la ciudad de Riobamba, durante el periodo enero 2003- julio 2004. Tesina de tecnólogo médico en Laboratorio Clínico e Histopatológico. Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp. 2
51. **ORTÍZ, P.** 1990. Informe de prácticas de grado Área: Bacteriología Clínica y Serología. Tesis de tecnólogo químico la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp. 75
52. **OUSSALAH, M. CAILLET, S. SAUCIER, L. LACROIX, M.** 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. (Canada) (18): 414 - 420
53. **OWEN, R., PALOMBO, E.** 2007. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. Food Control.(Australia) (18): 387-390.
54. **PALACIOS, A. et. al.** Obtención de alcohol a partir de la malta de *Lupinus mutabilis* (Tarwi).
<http://www.uncp.edu.pe/ci/proyectos/trabajos/QUIMICA/OBTENCION%20DE%20ALCOHOL%20A%20PARTIR%20DE%20LA%20MALTA%20DE%20LUPINUS.pdf>
20090315

55. **PORRES, J. ARANDA, P. LÓPEZ, M. VILCHEZ, A. URBANO, G.** 2008. Effects of hydroalcoholic a-galactoside extraction and phytase supplementation on the nutritive utilization of manganese, iron, zinc and potassium from lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*)-based diets in growing rats. Food Chemistry. (España) (109): 554-563
56. **PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO. (CYTED).** 1995 Manual de Técnicas de Investigación. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Antigua: Cytel,. pp. 64, 65, 71.
57. **RECIO, M. RIOS, J. VILLAR. A.** 1988. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. Journal of Ethopharmacology . (España) (13): 127-149.
58. **RODRÍGUEZ, S. MARTÍNEZ, A. MILLÁN, F. DÁVILA G.** 2005. Composition and Functional Properties of *Lupinus campestris* Protein Isolates. Plant Foods for Human Nutrition. (Mexico) (60): 99-107
59. **RUÍZ, M. RODRIGUÉZ, R. NAVARRO, S.** 2006. Evaluación químico nutricional de *Lupinus exaltus* Zucc, del Nevado de Colina, México como fuente potencial de forraje. Interciencia. (Venezuela) (31): 758- 761
60. **RUÍZ, R.** 19845. Nuevo Diccionario Médico. Barcelona. Teide S. A. pp. 113.
61. **SÁNCHEZ. Z, 2006.** Tarwi, otra maravilla peruana
<http://golpeagato.blogspot.com/2006/09/tarwi-otra-maravilla-peruana.html>
20080730
62. **SCHMIDT, H.** Tóxicos Químicos en Alimentos
http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10_esp_05/pla03405.htm
20070610.

63. **SEGUNDO, M.** *Candida albicans*.
http://www.miherbolario.com/01_articulos_ficha.php?art_id=11
20070510
64. **SOSA, L.** *Candida albicans*.
<http://www.odontologia-online.com/casos/part/LST/LST04/lst04.html>
20070523
65. **SUJAK, A. KOTLARZ, A. STROBEL, W.** 2007. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. Agricultural University of Lublin. *Phytomedicine*. (Germany) (14): 508-516
66. **TARWI.**
<http://www.ciedperu.org/productos/tarwi.htm>
20070610
67. **TEIXEIRA, M. LEME, E. DELARMELINA, C. SOARES, A. FIGUEIRA, G. SARTORATTO, A.** 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*. (Brazil) (111): 197–201
68. ***Trichophyton rubrum***
[http://es.wikipedia.org/wiki/Gore_\(Nueva_Zelanda\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Gore_(Nueva_Zelanda))
20090222
69. **VÉLEZ, A.** *Fundamentos de Medicina* 5^a. ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas, 1996. pp. 274, 425, 455-461.
70. **VILLACRÉS, E. et, al.** 2009. Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). INIAP, ESPOCH, SENACYT. Ecuador. pp. 8

71. **VILLACRECÉS, L.** 1996. Estudio de la Actividad Antimicrobiana en Extractos Metabólicos en 6 Plantas de la Flora Ecuatoriana. Tesis de doctor en Química, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp. 88-89.
72. **WECKESSER, S. ENGEL, K. SIMON-HAARHAUS, B. WITTMER, A. PELZ, KSCHEMPP, C.** (2006) Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Food Chemistry. (Polonia) (98): 711-719
73. **YANG, X. SUGITA, T. TAKASHIMA, M. HIRUMA, M. LI, R. SUDO, H. OGAWA, H. IKEDA, S.** 2009. Differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. Journal of Dermatological Science. (Japón) (54): 38-45
74. **ZACCHINO, S. SANTECCHIA, C. LÓ PEZ, S. GATTUSO, S. MUNÓZ, J. CRUANÉS, A. VIVOT, E. CRUANÉS, J. SALINAS, A. RUIZ, R. RUIZ, S.** 1998. In vitro antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine. Phytomedicine (Argentina) (5): 389-395
75. **ZAMORA, J. BERNAL, A. RUÍZ, M. HERNÁNDEZ, S. ESCALANTE, A. VIBRANS, H.** 2005. Perfil de alcaloides de semilla de *Lupinus exaltus* zucc. (fabaceae) y la evolución antigua del extracto alcaloideo y lupanina contra fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. (México) (23): 124-129
76. **ZAPER, R.** Atlas de Diagnóstico Micológico. 2^a. ed. Buenos Aires. El Ateneo. pp. 109, 110

- 77. ZAUGGA, CH. JOUSSONB, O. LÉCHENNEA, B. STAIBA, P. MONODA, M. 2008.** *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. International Journal of Medical Microbiology.(Italia) (298): 669-682

ANEXOS

GRÁFICOS

GRÁFICO No 1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE AGUAS DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet, MÉTODO DE DILUCIÓN CON SUSPENSIÓN DE ESPORAS (100 esporas/mL) FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH- RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.

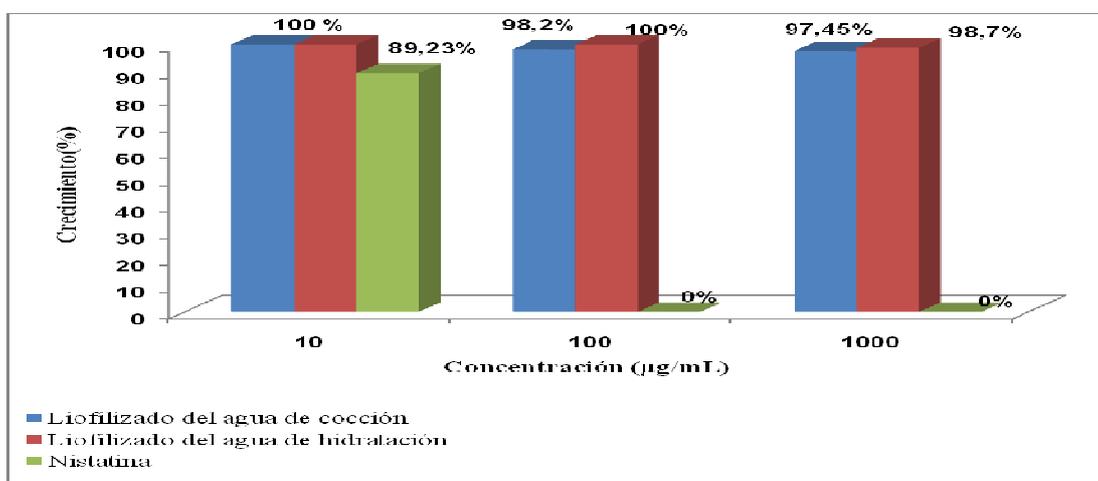
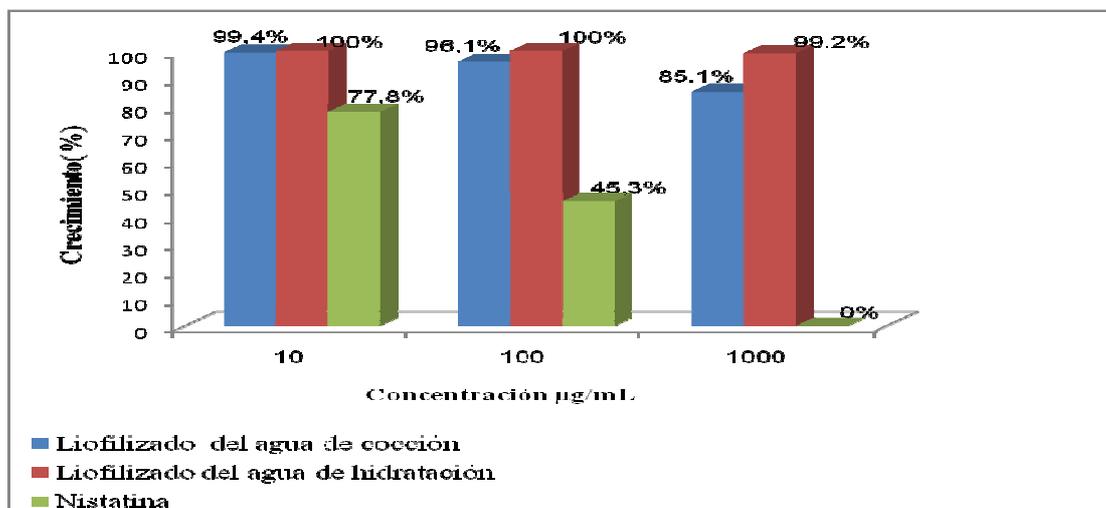


GRAFICO No 2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE AGUAS DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet, MÉTODO DE DILUCIÓN CON SUSPENSIÓN DE ESPORAS (100 esporas/mL) FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE 2008.

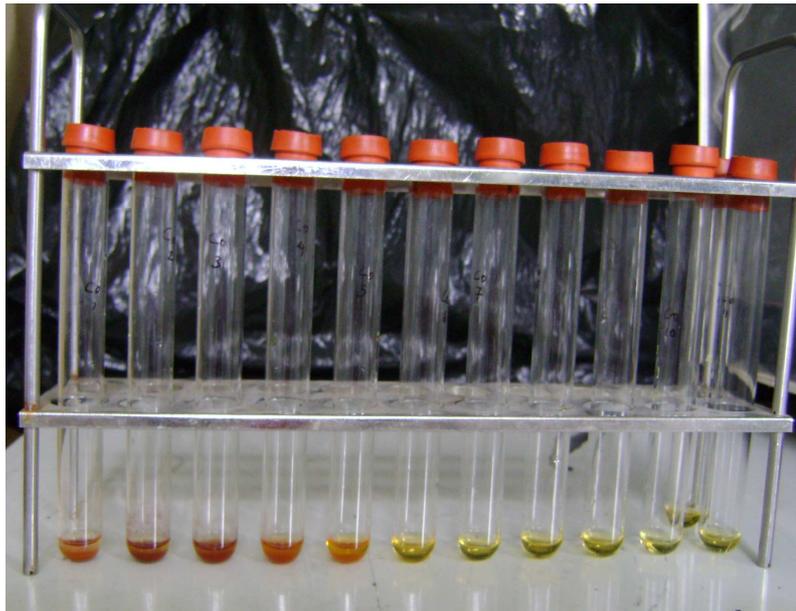


FOTOGRAFÍAS

**FOTOGRAFÍA No 6. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES PRUEBA DE DRAGENDORFF
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA. FACULTAD DE CIENCIAS.
ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.**



**FOTOGRAFÍA No 7. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES PRUEBA DE MAYER
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA. FACULTAD DE CIENCIAS.
ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.**



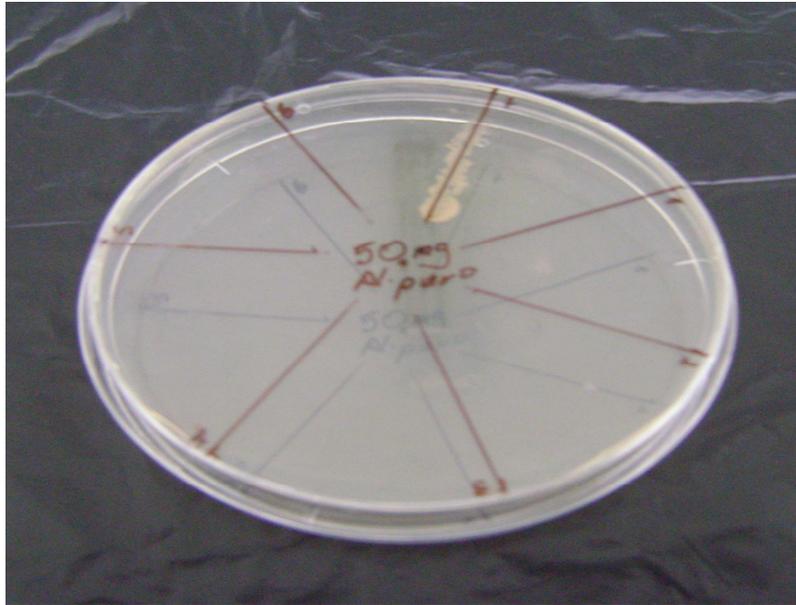
**FOTOGRAFÍA N o 8. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES PRUEBA DE WAGNER
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA. FACULTAD DE CIENCIAS.
ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.**



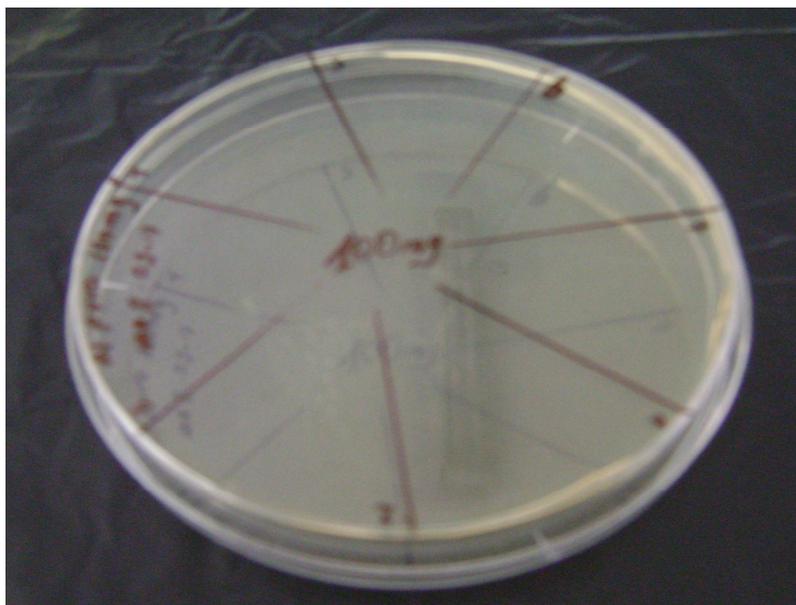
**FOTOGRAFÍA N o 9. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS
ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet
MEDIANTE RECUPERACIÓN DE ÉTER POR ROTAVAPOR
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA. FACULTAD DE CIENCIAS.
ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.**



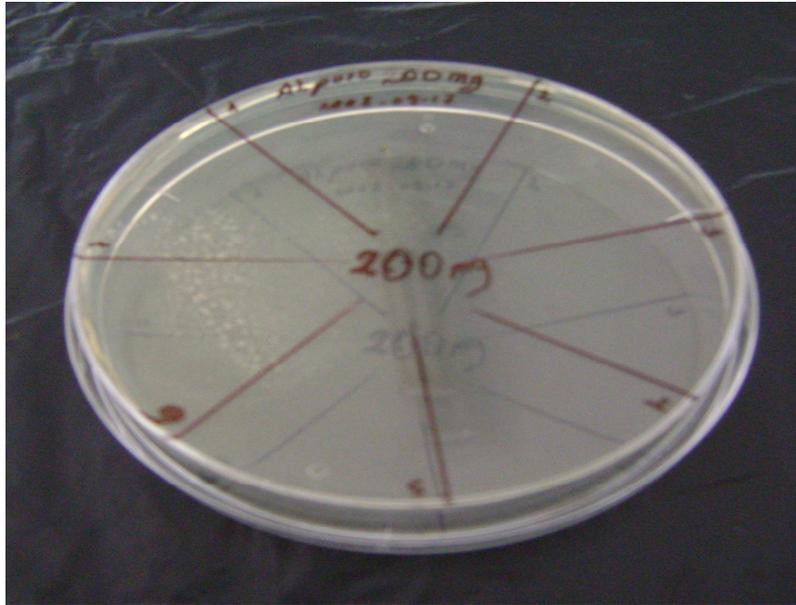
FOTOGRAFÍA No 10. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 5.000 µg/mL FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231 LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



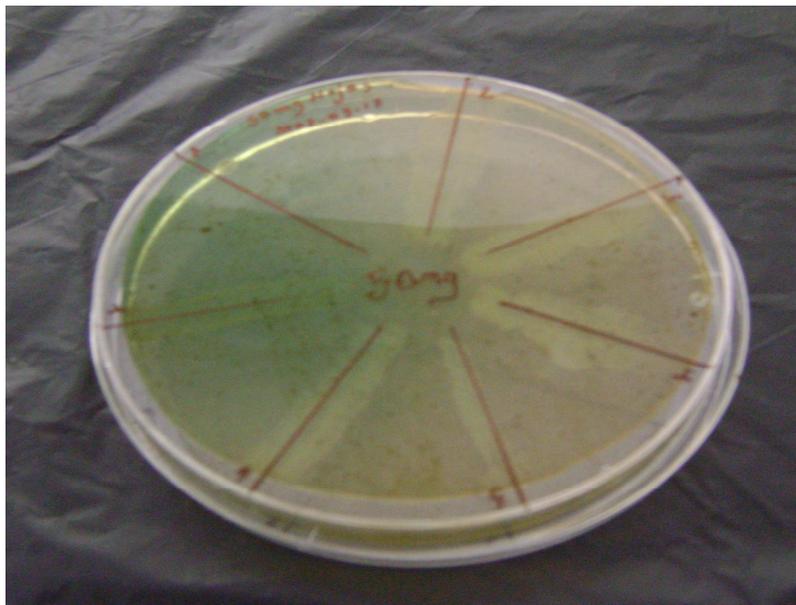
FOTOGRAFÍA No 11. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 10.000 µg/mL, FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



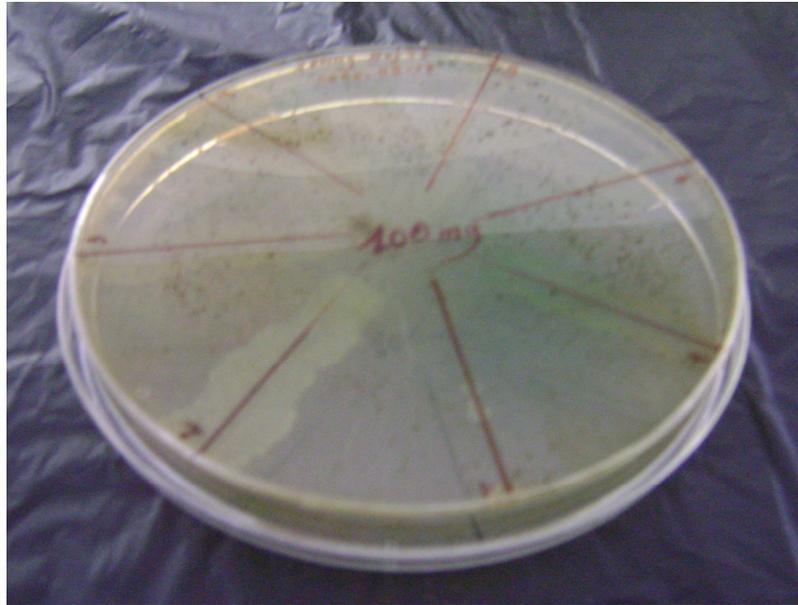
FOTOGRAFÍA N o 12. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 20.000 µg/mL FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



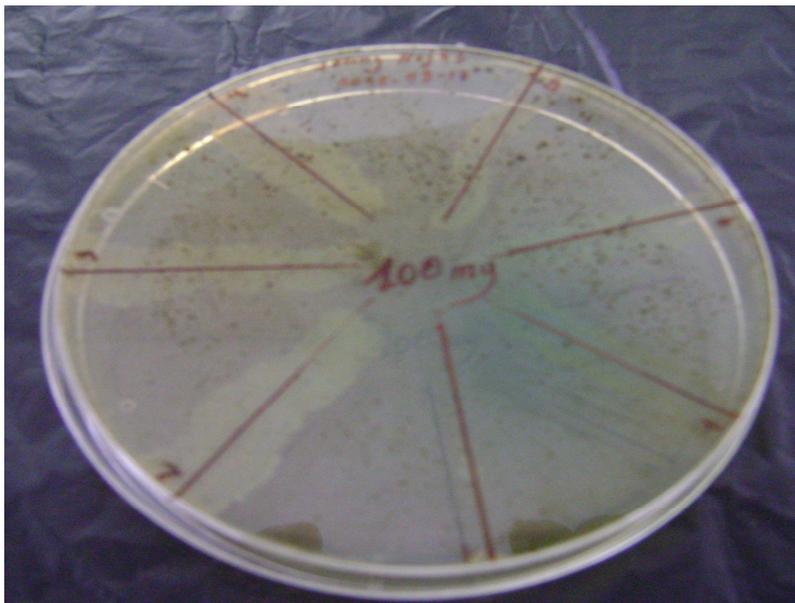
FOTOGRAFÍA N o 13. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231 A 5.000 µg/mL, LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



FOTOGRAFÍA N o 14. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 10.000 µg/mL, FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



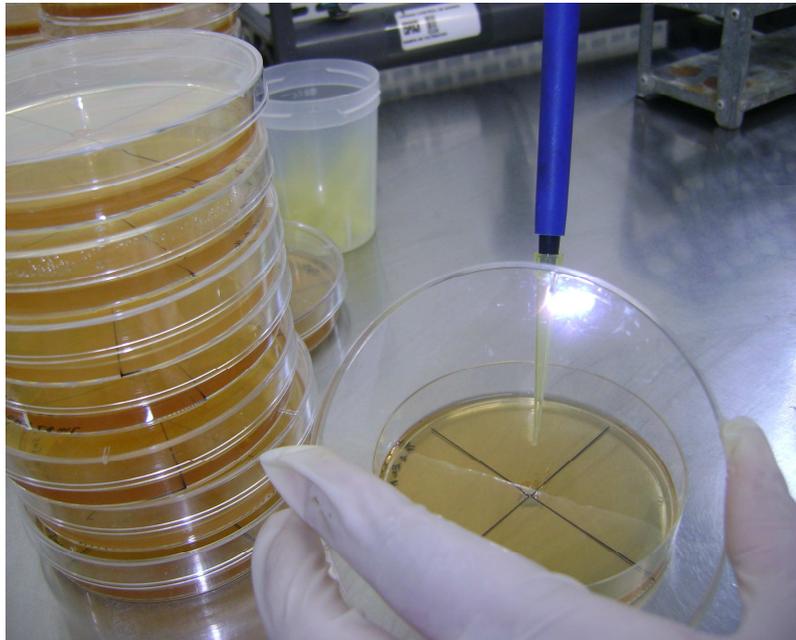
FOTOGRAFÍA N o 15. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 20.000 µg/mL FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



FOTOGRAFÍA N o 16. AGUJERO EN EL CENTRO DE LAS CAJAS QUE CONTIENEN LOS EXTRACTOS LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



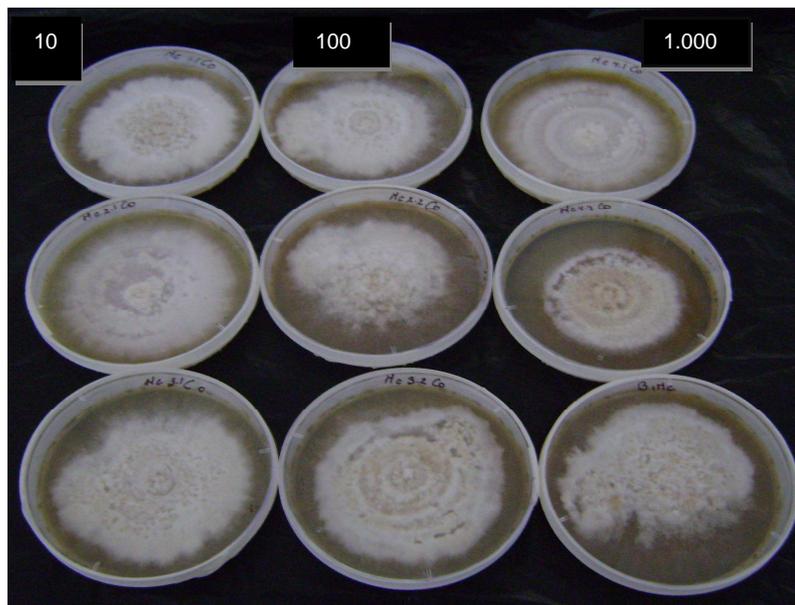
FOTOGRAFÍA N o 17. INOCULACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN MEDIOS DE CULTIVOS COMPUESTOS POR EXTRACTOS VEGETALES. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



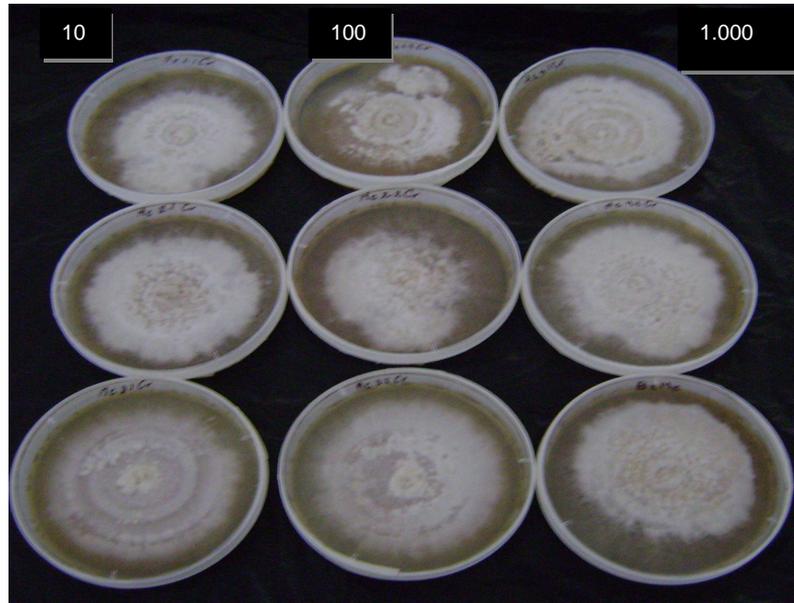
FOTOGRAFÍA N o 18. BLANCO DE *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



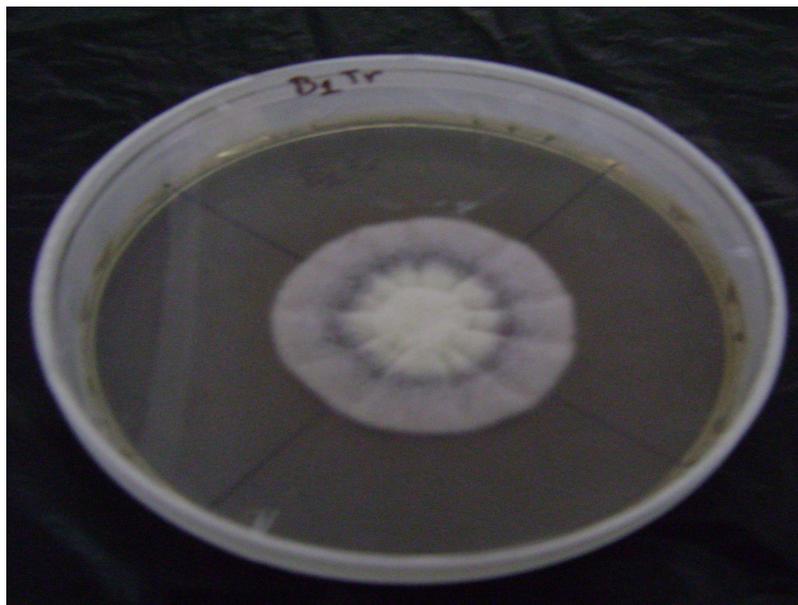
FOTOGRAFÍA N o 19. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DEL AGUA DE COCCIÓN AL (36%) DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL; FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



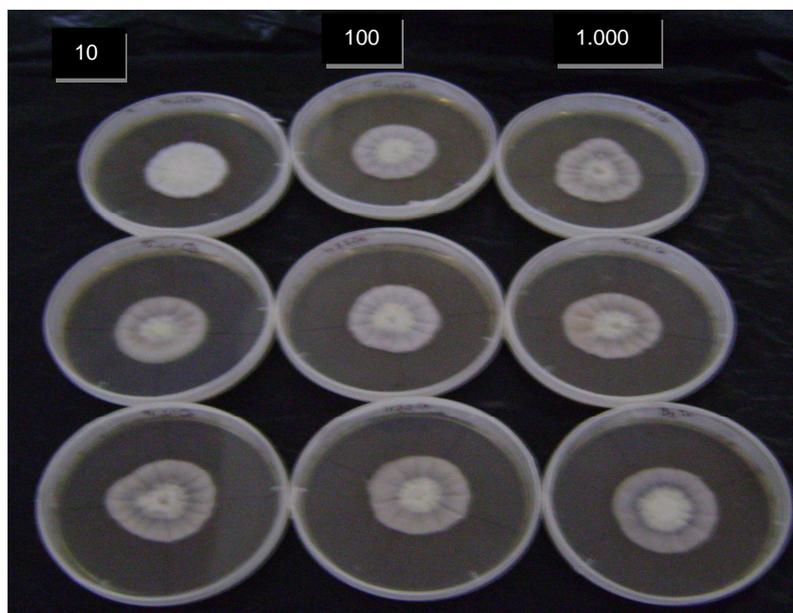
FOTOGRAFÍA N o 20. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DEL AGUA DE HIDRATACIÓN AL (35%) DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL, FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



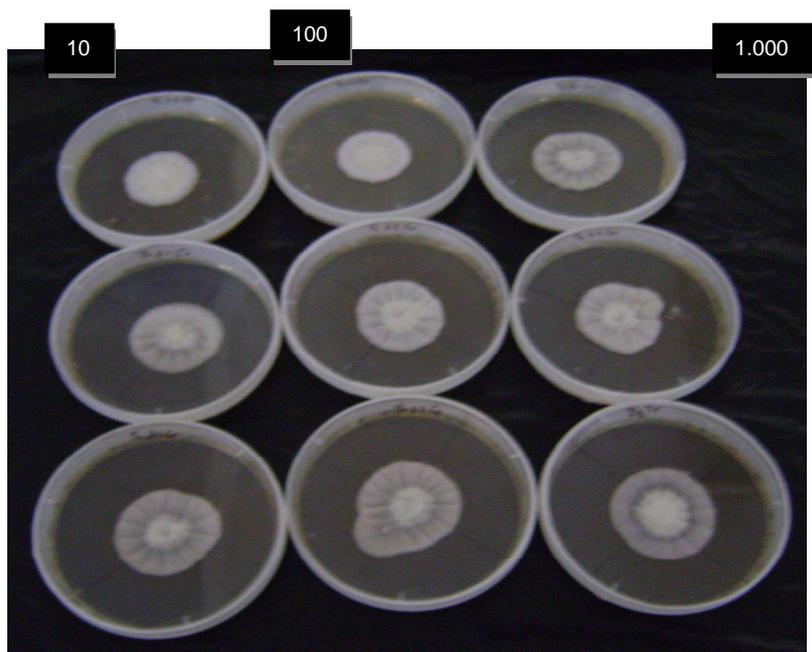
FOTOGRAFÍA N o 21. BLANCO DE *Trichophyton rubrum* ATCC 22402 LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



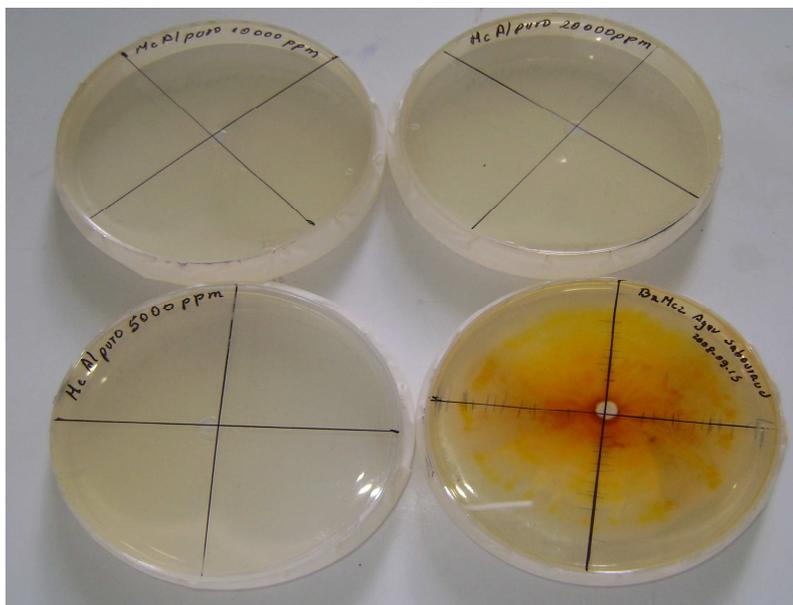
FOTOGRAFÍA N o 22. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DEL AGUA DE COCCIÓN AL (36%) DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL, FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



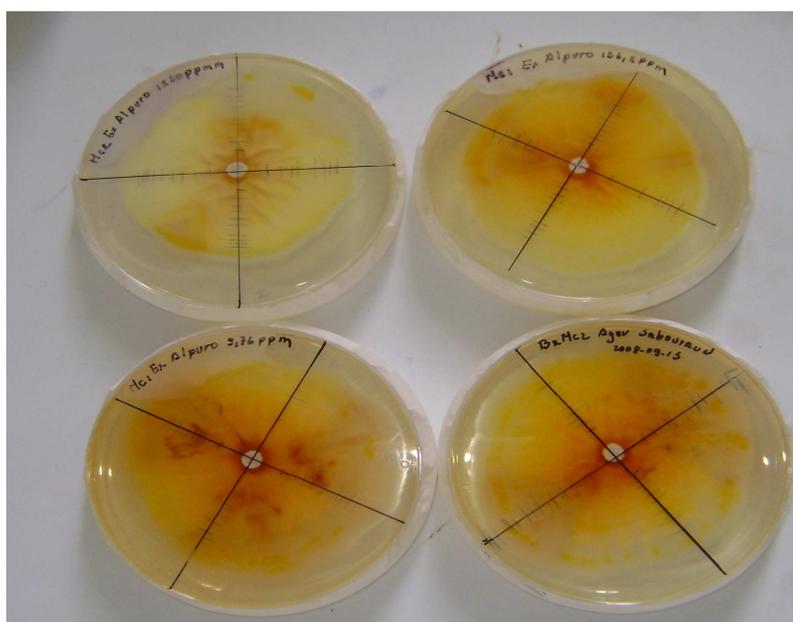
FOTOGRAFÍA N o 23. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LIOFILIZADO DEL AGUA DE HIDRATACIÓN AL (35%) DEL PROCESO DE DESAMARGADO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 10 µg/mL; 100 µg/mL; 1.000 µg/mL, FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



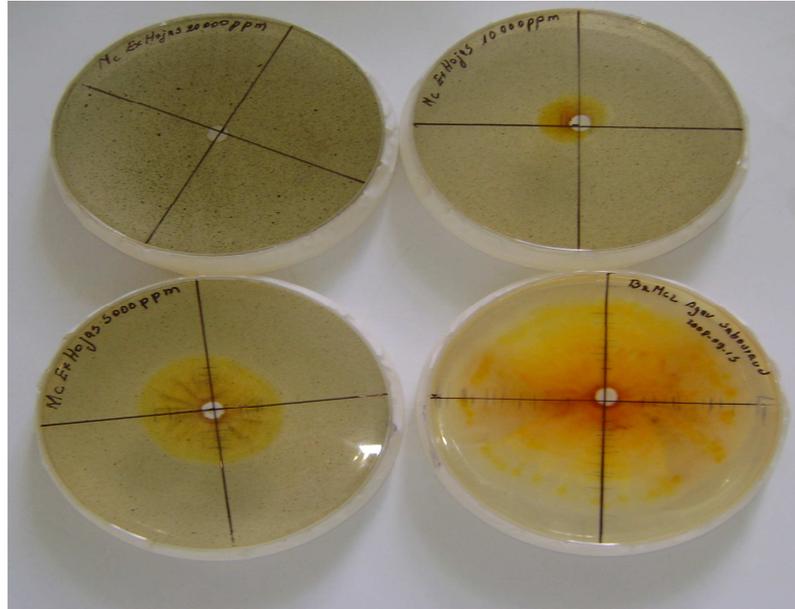
FOTOGRAFÍA N o 24. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/m; 20.000 µg/mL; BLANCO FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



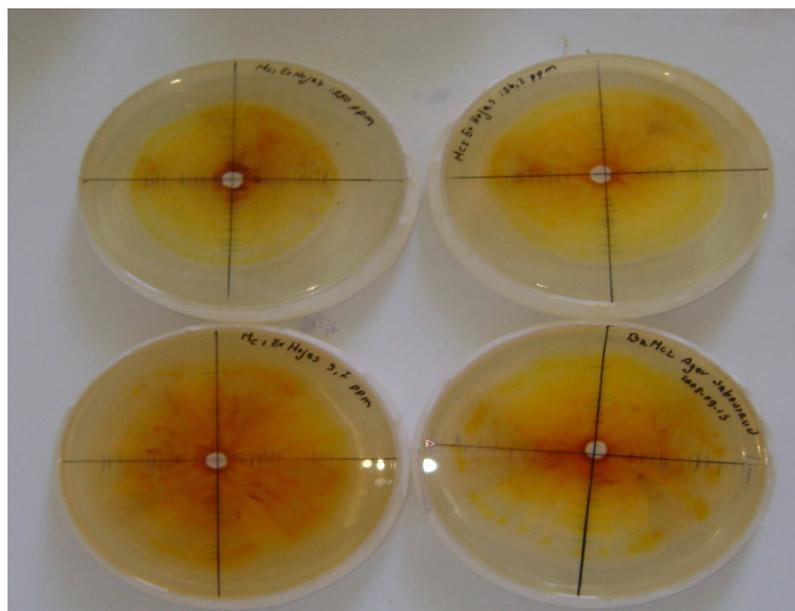
FOTOGRAFÍA N o 25. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 1.250 µg/mL; 156 µg/mL; 10 µg/mL; BLANCO FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



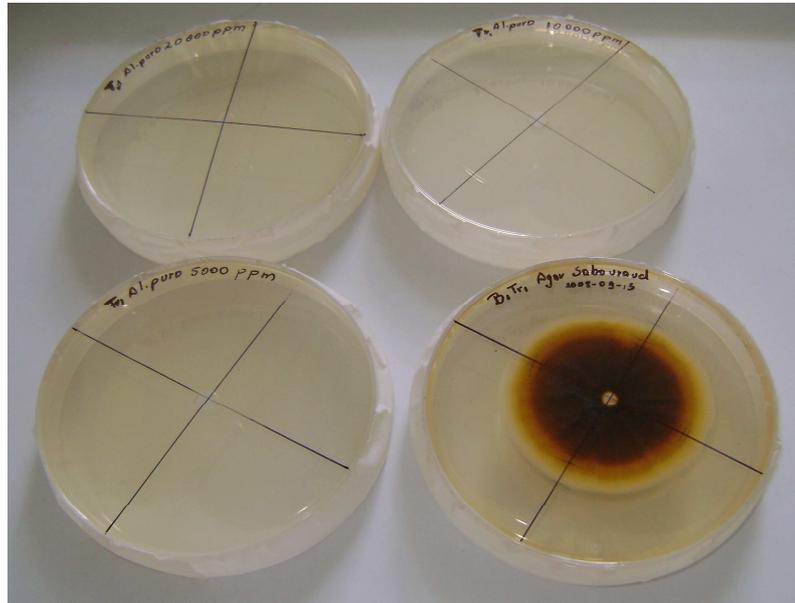
FOTOGRAFÍA N° 26. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 20.000 µg/mL; BLANCO, FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



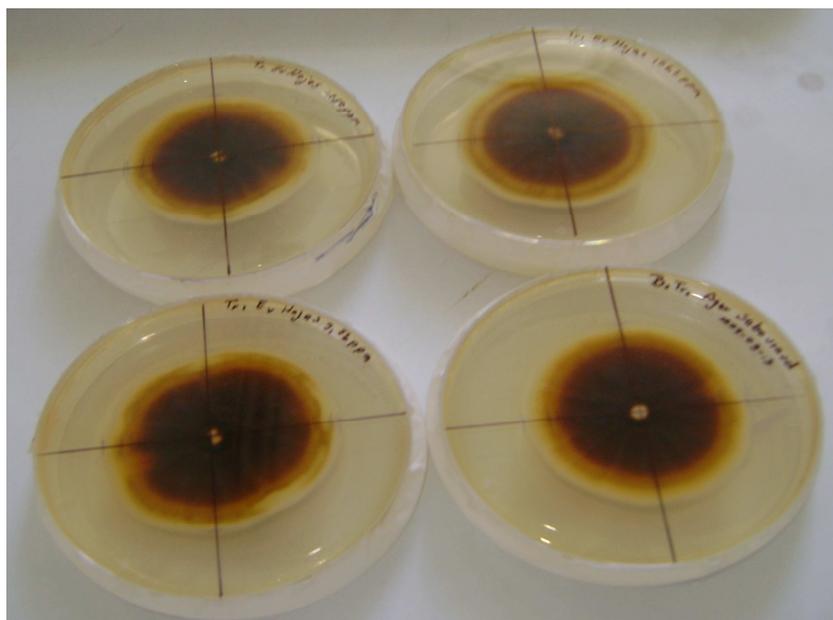
FOTOGRAFÍA N° 27. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 1.250 µg/mL; 156 µg/mL; 10 µg/mL; BLANCO FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



FOTOGRAFÍA N o 28. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 20.000 µg/mL; BLANCO, FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 22402. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



FOTOGRAFÍA N o 29. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 1.250 µg/mL; 156 µg/mL, 10 µg/mL, BLANCO, FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.



FOTOGRAFÍA N o 30. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet A 5.0000 µg/mL; 10.000 µg/mL; 20.000 µg/mL, BLANCO FRENTE A *Mycrosporium canis* ATCC 10214 LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2008.

