



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN “*IN VITRO*” DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS
ALCALOIDES DEL AGUA DE COCCION DEL PROCESO DE
DESAMARGADO DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*)”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

ADRIANA ISABEL RODRÍGUEZ BASANTES.

RIOBAMBA – ECUADOR

2009

DEDICATORIA

A dos seres extraordinarios, mis padres quienes con su apoyo, dedicación, y paciencia incondicional me motivaron a culminar mi carrera, siendo pilares fundamentales en mi educación espiritual y profesional.

A mi esposo por su comprensión.

A mis hijos por ser la luz de mi vida.

A mi abuelito, por brindarme su apoyo, y por siempre creer en mí.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

*Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP, en especial al Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina y a través de éste a la Ing. Elena Villacrés, Directora del Proyecto PIC-05-2006-2-003 “Evaluación y aprovechamiento de la Actividad antibacterina y antifúngica de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), sobre cepas ATCC; por todas las facilidades brindadas.*

A la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología SENACYT, por el financiamiento para la realización del presente estudio.

Mi eterna gratitud y sincero agradecimiento a la Dra. Janneth Gallegos, por su valiosa dirección durante el desarrollo y culminación de la presente investigación.

A la Dra. Lourdes Cuadrado Merino, por su valiosa colaboración incondicional brindada en el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Susana Abdo, por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

Y a todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN “*in vitro*” DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ALCALOIDES DEL AGUA DE COCCION DEL PROCESO DESAMARGADO DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) ”**, de responsabilidad de la señorita egresada Adriana Isabel Rodríguez Basantes, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Edmundo Caluña.
DECANO FACULTAD CIENCIAS

Dr. Luis Guevara.
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE
BIOQUÍMICA Y FARMACIA.

Dr(a)Janeth Gallegos
DIRECTORA DE TESIS

Dr(a).Susana Abdo
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Dr. Carlos Rodríguez.
DIRECTOR DEL CENTRO DE
DOCUMENTACION

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, Adriana Isabel Rodríguez Basantes, 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

ADRIANA ISABEL RODRÍGUEZ BASANTES

INTRODUCCIÓN

Es indudable que las plantas constituyen una fuente inagotable de una serie de principios activos, muchos de los cuales han sido de gran utilidad en el tratamiento de diversas patologías, las cuales son tan críticas como la falta de medicamentos, además de los altos precios de estos, en el mercado nacional e internacional que los hace inalcanzable para aquellas personas de menores recursos económicos, así como la gran diversidad de manifestaciones adversas y el incremento de interacciones medicamentosas. Igualmente, muchos de los usos de las plantas como parte de la medicina tradicional, se encuentran a nivel de testimonios, por lo que se hace indispensable el estudio sistematizado de las mismas por parte de las instituciones científicas con el objeto de validar los usos tradicionales.

El *Lupinus mutabilis Sweet* (chocho), es una leguminosa oriunda de los Andes Sudamericanos, las semillas desamargadas y en cocimiento son utilizadas por el poblador andino de nuestro país como alimento y medicina.

Si bien es cierto que el género *Lupinus*, ha sido muy estudiado desde el punto de vista nutricional; sin embargo por su alto contenido de alcaloides no ha permitido el consumo directo, debiendo previamente eliminarse estos. El producto líquido del desamargado ha sido utilizado por pequeños agricultores para combatir a las garrapatas en el ganado ovino y en camélidos, asimismo se utiliza como regulador del crecimiento o fertilizante en los cultivos de maíz, trigo, soja y papa.

En el proceso hídrico de desamargado se elimina el 99.92% de alcaloides, siendo su contenido más alto en el agua de cocción, por lo que al ser eliminadas estas sustancias indiscriminadamente en los distintos cuerpos acuíferos, contribuye al proceso de contaminación ambiental, volviendo muy complicado y costoso el proceso de recuperación de estas aguas. Ante esta problemática se ha buscado alternativas para reutilizar este residuo y elaborar productos benéficos para el hombre, aprovechando las

propiedades benéficas que poseen los alcaloides quinolizidínicos presentes en el agua de desamargado.

Además no podemos dejar pasar por alto la gran incidencia que tienen en nuestro medio las infecciones gastrointestinales, respiratorio-pulmonares, de mucosas y de la piel, por lo que el control de los agentes implicados causales de estas enfermedades debe buscar nuevas alternativas, y una de ellas es la investigación de la actividad farmacológica de los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas.

En este contexto, y en base a estudios preliminares que han demostrado las propiedades que pueden ser explotadas a partir de los alcaloides quinolizidínicos, el objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de los alcaloides del chocho sobre cepas de microorganismos ATCC.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*)

El chocho o tarwi, es una leguminosa originaria de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú, tiene relevancia en la gastronomía de esos países desde la época prehispánica. Su alto contenido de proteínas, mayor que el de la soja, lo hace una planta de interés para la nutrición humana y animal. Según los especialistas, su consumo en diversas presentaciones (cremas, guisos, postres) ayuda a los niños en su crecimiento y desarrollo cerebral, pues tiene calcio y aminoácidos (21) (35).



FOTOGRAFÍA No. 1. EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*)

El género *Lupinus* consta de unas 200 especies distribuidas en América, se cultiva entre los 2500 a 3400 m.s.n.m., requiere entre 350-800 mm de precipitación anual, siendo cultivado exclusivamente en zonas secas, es susceptible al exceso de humedad, y moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado. No tolera las heladas en la fase de formación del racimo y madurez, aunque algunos ecotipos cultivados a orillas del lago Titicaca, tienen una mayor resistencia al frío. Prefiere

suelos francos y franco-arenosos, con balance adecuado de nutrientes, buen drenaje, y pH que oscila entre 5 y 7. (41, 42).

1.1.1. 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 (52)

1.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Lupinus mutabilis* Sweet.

1.1.2.1 Hojas

La hoja de *Lupinus* es de forma digitada, generalmente compuesta por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. En la base del pecíolo existen pequeñas hojas estipulares, muchas veces rudimentarias (Fotografía No. 2). Se diferencia de otras especies de *Lupinus* en que las hojas tienen menos vellosidades (31).



FOTOGRAFÍA No. 2. HOJAS DEL CHOCHO

El color de las hojas puede variar de amarillo verdoso a verde oscuro, dependiendo del contenido de antocianina (11, 12, 24, 31).

1.1.2.2 Tallos y ramificaciones

La altura de la planta está determinada por el eje principal que varía entre 0,5 a 2,00 m, el tallo del chocho es generalmente muy leñoso y se puede utilizar como combustible. Su alto contenido de fibra y celulosa, hace que se lo emplee como material de combustión, sin embargo podría permitir un proceso de industrialización. El color del tallo oscila entre verde oscuro y castaño. En las especies silvestres es rojizo a morado oscuro (24, 31).



FOTOGRAFÍA No. 3. TALLOS DEL CHOCHO

El número de ramas varía desde unas pocas hasta 52 ramas. El número de vainas y de ramas fructíferas tiene correlación positiva con una alta producción (Ticona, 1975), ((24, 30, 31).

1.1.2.3 Flores e inflorescencia

El chocho pertenece a la subfamilia *Papilionoideas* por lo cual presenta una corola grande de 1 a 2 cm, con cinco pétalos y compuesta por un estandarte, dos quillas y dos alas (24, 31).

Según el tipo de ramificación que presente la planta, puede tener hasta tres floraciones sucesivas. Blanco, (1980) menciona que en una sola planta pueden existir hasta 1000 flores (11, 12, 24, 39).

La coloración de la flor varía entre el inicio de su formación hasta la maduración, de un azul claro hasta uno muy intenso y de allí se origina su nombre científico, *mutabilis*, es decir que cambia. Los colores más comunes son los diferentes tonos de azul e incluso púrpura; menos frecuentes son los colores blanco, crema, rosado y amarillo (Fotografía No. 4) (11, 12, 24, 39).



FOTOGRAFÍA No. 4. FLORES E INFLORESCENCIAS DEL CHOCHO

1.1.2.4 Semilla.

Las semillas del chocho están incluidas en número variable en una vaina de 5 a 12 cm y varían de forma (redonda, ovalada a casi cuadrangular), miden entre 0,5 a 1,5 cm. Un

kilogramo tiene 3500 a 5000 semillas. La variación en tamaño depende tanto de las condiciones de crecimiento como del ecotipo o variedad (24, 29, 31).

La semilla está recubierta por un tegumento endurecido que puede constituir hasta el 10% del peso total. Los colores del grano incluyen blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón y colores combinados como marmoleado, media luna, ceja y salpicado (Fotografía No.5) (Gross, 1982) (24, 29, 31).



FOTOGRAFÍA No. 5. SEMILLAS DE CHOCHO DE DIFERENTES ECOTIPOS

La genética en la herencia del color de la semilla es bastante compleja y existen genes tanto para el color principal, como para cada una de las combinaciones (Blanco, 1980) (24, 29, 31).

1.1.2.5 Raíces y nódulos

Como leguminosa, el chocho tiene una raíz pivotante vigorosa y profunda que puede extenderse hasta 3 m de profundidad.

En la raíz se desarrolla un proceso de simbiosis con bacterias nitrificantes que forman nódulos de variados tamaños (1 a 3 cm). En suelos con presencia de bacterias, la formación de nódulos se inicia a partir del quinto día después de la germinación (Meza 1974), los nódulos pueden alcanzar un diámetro hasta de 3 cm; se localizan principalmente en la raíz primaria, por encima de la ramificación radicular, e incluso en las raíces secundarias (Fotografía No.6), (Lange y Parker, 1960) (24, 34, 31).



FOTOGRAFÍA No. 6. RAÍCES Y NÓDULOS DEL CHOCHO

Bernal, (1982) encontró cepas de *Rhizobium lupini* con gran efectividad y su presencia en el eje central de la raíz estuvo altamente correlacionada con plantas más vigorosas y productivas. Estas bacterias tienen la propiedad de fijar nitrógeno de la atmósfera en el suelo, las plantas pueden utilizar este nitrógeno como abono natural (29,31).

1.1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

1.1.3.1 Composición química y valor nutricional

En los ensayos sobre los componentes químicos del grano de *Lupinus mutabilis Sweet* a veces se encuentran ambigüedades, incoherencias y hasta contradicciones, mismas que dificultan una evolución de los datos (Tabla No. 1). Diferencias que pueden deberse a la variabilidad genética y a la influencia ambiental. La semilla cruda de chocho tiene un promedio del 19 % en aceite, lo que constituye un atractivo económico (14).

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

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

FUENTE: CAICEDO C. (2000)

1.1.3.2 Proteínas solubles en agua.

El contenido de proteínas en el chocho es tan alto como en los granos de soja. Las globulinas corresponden a la mayor fracción proteica, siendo la albúmina la restante. Las globulinas presentan un amplio punto isoeléctrico entre pH 4 – 6 con solubilidad mínima de nitrógeno entre 10 – 20 % (14,24).

El comportamiento de las proteínas en cuanto a la solubilidad es muy diverso y depende del número de grupos polares y apolares y de su ordenación en la molécula.

En general, las proteínas sólo son solubles en disolventes fuertemente polares, como por ejemplo agua, glicerol, formamida, dimetil-formamida, ácido fórmico, en disolventes menos polares, como por ejemplo el etanol, solo en caso excepcionales hay una notable solubilidad. La solubilidad en agua depende del pH y la presencia de sal (25, 27).

Las sales neutras tienen en general una doble influencia sobre la solubilidad de las proteínas a concentraciones bajas (0,5-1 mol/L), actúan como consecuencia de la disminución de las interacciones electrostáticas proteína-proteína, aumentando la solubilidad (12,13,24)

La capacidad de imbibición es para las proteínas insolubles lo que la hidratación para las proteínas solubles. Por penetración de agua en la estructura, se produce un aumento de volumen y otras modificaciones de las propiedades físicas (29).

1.1.3.3 Lípidos.

El *Lupinus mutabilis* Sweet tiene un elevado contenido de grasa (18 - 25 %), lo que hace factible para la extracción de aceite a nivel industrial (17, 24, 29).

Los lípidos constan de ácidos grasos insaturados y su composición es semejante a la del maní, aproximadamente la mitad de estos constan de ácido oleico (36.1–54.6%), existiendo un 22.3 - 43.9% de ácido linoleico y el 2.1 - 2.7 % le corresponde al ácido linolénico. El aceite del *Lupinus albus* contiene pequeñas cantidades de ácido erúxico, mientras que la semilla del *Lupinus mutabilis* Sweet no lo contiene. (17, 24, 29).

1.1.3.3.1 Ácidos Grasos.

El ácido graso que predomina en el chocho, maní y soja es el ácido oleico, siendo así que su concentración en la semilla de chocho se aproxima al 40.40% (Tabla No. 2).

La concentración de ácido linolénico en la semilla del *Lupinus mutabilis* es baja, característica que favorece la conservación del aceite ya que este se oxida rápidamente y podría originar cambios indeseables en el sabor del aceite (17, 24, 29).

La composición de ácidos grasos, a diferencia de los aminoácidos, depende fuertemente de las influencias ambientales, de manera que puedan presentarse considerables variaciones según las localizaciones y los años (17, 24, 29).

TABLA No. 2 COMPOSICIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN CHOCHO, MANÍ Y SOJA

Ácidos Grasos	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet		Maní	Soja
	Amargo	Semidulce		
Mirístico	0.60	0.30	0.10	----
Palmítico	13.40	9.80	11.00	11.00
Palmitoleíco	0.20	0.40	-----	-----
Esteárico	5.70	7.80	3.0	4.00
Oleico	40.40	53.90	55.00	22.00
Linoleico	37.10	25.90	28.00	55.00
Linolénico	2.90	2.60	1.00	8.00
Araquídico	0.20	0.60	1.50	0.40
Behémico	0.20	0.50	3.50	0.30
Cuociente P/S ^a	2.00	1.5	----	-----

^a P/S: Poliinsaturados/saturados

FUENTE: VILLACRÉS, E; CAIGEDO, C; PERALTA, E. 1998. DISFRUTE COCINANDO CON CHOCHO. RECETARIO. PRONALEG. EESC-INIAP-FUNDACYT. P-BID-206. JUNIO. QUITO, ECUADOR. 48 P.

1.1.3.4 Fibra.

El contenido de fibra representa más del 6%, se debe principalmente a la cubierta seminal que comprende el 10% del peso de la semilla (17, 24, 29).

1.1.3.5 Aminoácidos

La distribución de los aminoácidos es relativamente estable, presenta mayor contenido de triptófano y tirosina frente a la soja y el fréjol (Tabla No. 3), los aminoácidos azufrados como la metionina son los primeros limitantes, pero se puede equilibrar este déficit combinando el chocho especialmente con cereales ya que estos en cambio son deficientes en lisina (17, 24, 29).

TABLA No. 3 CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN CHOCHO, SOJA, FRÉJOL Y MANÍ

Aminoácidos	Chocho	Soja	Fréjol	Maní
Isoleucina	274	284	262	211
Leucina	449	486	476	400
Lisina	331	399	450	221
Metionina	47	79	66	72
Cistina	87	83	53	78
Fenilalanina	231	309	326	311
Tirosina	221	196	158	244
Treonina	228	241	248	163
Triptófano	110	80	----	65
Valina	252	300	287	261
Arginina	594	452	355	697
Histidina	163	158	177	148
Alanina	221	266	262	243
Acido Aspártico	685	731	748	712
Acido Glutámico	1372	1169	924	1141
Glicina	259	261	237	349
Prolina	257	343	223	272
Serina	317	320	347	299
Total aminoácidos	6051	6157	5662	5887
Total aminoácidos Esenciales	2183	2457	2389	2026

FUENTE: VILLACRÉS, E; CAICEDO, C; PERALTA, E. 1998. DISFRUTE COCINANDO CON CHOCHO. RECETARIO. PRONALEG. EESC-INIAP-FUNDACYT. P-BID-206. JUNIO. QUITO, ECUADOR. 48 P.

1.1.3.6 Minerales solubles en agua

El contenido de sustancias minerales en el chocho se asemeja al de otras semillas de leguminosas (Tabla No. 4). Únicamente el contenido de fósforo y magnesio es un poco más elevado. La semilla de lupino representa, en total, una valiosa fuente de magnesio, fósforo y potasio para el hombre.

Dado que el calcio se encuentra principalmente en la cáscara, mientras que el fósforo se halla en el núcleo. Hay que tener presente que la relación calcio-fósforo se altera tras el descascarado del grano (17, 24, 29).

TABLA No. 4. CONTENIDO DE MINERALES EN EL CHOCHO

Macroelementos	mg/g	Microelementos	mg/kg
Calcio	1.07 -1.53	Hierro	46.00 – 73.3
Magnesio	2.00 – 3.02	Zinc	40.00 – 51.66
Sodio	0.25 – 0.75	Manganeso	21.33 – 29.10
Potasio	11.06 – 13.56	Cobre	4.00 – 12.10
Fósforo	0.44 – 0.88		

FUENTE: INTERNACIONAL LUPIN ASSOCIATION, (1990)

1.1.3.7 Carbohidratos

En Lupinus mutabilis Sweet, llama mucho la atención el bajo contenido de sacarosa y almidón, en cambio la proporción de oligosacáridos, que no son aprovechables para el hombre es relativamente alta (17, 24, 29).

Según Rackis citado en ILA, (1982) los oligosacáridos son los causantes de la producción de flatulencias en el hombre y animales caracterizada por la producción de gran cantidad de CO₂, H₂ y CH₄ (17, 24, 29).

En este grupo de α -galactósidos se han identificado: rafinosa, estaquiosa y verbascosa y otros de peso molecular más altos. En todos ellos está presente la galactosa con 1, 2 y 3 moléculas respectivamente, unidas a la sacarosa con enlaces (α 1-6) (17, 24, 29).

1.1.3.8 Vitaminas

El contenido de vitaminas como la tiamina, riboflavina, niacina (Tabla No. 5), se asemeja a otras leguminosas, debido a lo cual constituye una valiosa fuente de vitamina B para el hombre (17, 24, 29).

TABLA No. 5 CONTENIDO DE VITAMINAS EN LA SEMILLA CRUDA DE CHOCHO

Vitaminas	mg/100g
β -caroteno	0.09
Tiamina	0.51
Riboflavina	0.42
Niacina	4.1

FUENTE: GROSS, (1982)

1.1.3.9 Sustancias Antinutricionales.

Como en todas las semillas leguminosas, también en el grano de chocho se halla algunas sustancias antinutritivas, que limitan el uso directo de grano crudo en alimentación humana y animal (14, 17, 24, 28,32).

Entre las sustancias antinutritivas del chocho se citan:

- Inhibidores de proteasas, que tienen la propiedad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas.
- Hemaglutininas, que son proteínas que coagulan o aglutinan los glóbulos rojos y reaccionan como una especie de anticuerpo.
- Glucósidos cianogénicos, que liberan ácido cianhídrico por acción enzimática, sin embargo su concentración en el chocho no tiene importancia desde el punto de vista toxicológico.
- Alcaloides que constituye el principal obstáculo para la utilización directa, ya que su alto contenido determina que los granos sean tóxicos y amargos (14, 17, 24)

1.1.4 PROPIEDADES Y USOS DE LAS SEMILLAS DEL LUPINO

El grano desamargado tiene una infinidad de usos:

- Consumo humano: En fresco se puede utilizar en ceviche, sopas (crema de chocho); guisos, postres y refrescos (jugo de papaya con harina de chocho). (Anexo No.1)
- Industrialmente: La harina de chocho puede ser usada en panificación, tiene la ventaja de mejorar considerablemente el valor proteico y calórico el producto; asimismo permite una más larga conservación del pan debido a la retrogradación del almidón, obteniéndose un mayor volumen por las propiedades emulgentes que tiene la lecitina del chocho dulce (37,45)
- Uso Medicinal: Los alcaloides (esparteína, lupinina, lupanidina, etc) se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales. Ocasionalmente los agricultores utilizan el agua de cocción del tarwi como laxante y para el control de plagas en plantas (24)
- Uso Agronómico: En el estado de floración la planta se incorpora a la tierra como abono verde, con buenos resultados mejorando la cantidad de materia orgánica, estructura y retención de humedad del suelo (24, 44)
- Por su contenido de alcaloides se siembra a menudo como cerco vivo o para separar parcelas de diferentes cultivos, evitando el daño que pudieran causar los animales.
- Como combustible: Los residuos de la cosecha (tallos secos) se usan como combustible por su gran cantidad de celulosa que proporciona un buen poder calorífico. (24, 49)

El cultivo tiene potencial productivo y perspectivas de uso como oleaginosa, fuente de proteína, fijador de nitrógeno y productor de alcaloides con uso en sanidad animal y vegetal. (24, 49)

1.2 ALCALOIDES.

1.2.1 GENERALIDADES.

En el siglo XIX se lograron verdaderos adelantos en la farmacología, con el sucesivo aporte de remedios procedentes de plantas, este avance había sido precedido por los trabajos del sueco Carl Scheele, quien logró aislar los ácidos orgánicos de las plantas, y del joven boticario Friedrich Wilhelm Sertürner (1783-1841) que con sus audaces y llamativos experimentos descubrió en 1816 el principio activo más importante del opio de la amapola, la morfina cuyos cristales dieron lugar al “principium somniferum”(que Gay-Lussac llamaría luego “morfina”, por el dios griego Morfeo) que Osler llamó “La medicina de Dios”, porque revolucionó la lucha contra el dolor; al igual que otros compuestos orgánicos obtenidos de las plantas, fue llamada “alcaloide”, término acuñado en 1818 por Wilhelm Meissner y se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas, y que recuerdan la reacción de los minerales con carácter básico (45, 49)

No existe una definición sencilla de alcaloides, si se consideran las distintas diferencias en cuanto a estructura y propiedades de los 6000 compuestos descritos en este grupo. La dificultad principal radica en establecer el límite de separación de los alcaloides de otros compuestos orgánicos nitrogenados de origen natural. Se considera como alcaloide “Un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación”. De acuerdo a las características de esta definición, algunos autores han dividido a los alcaloides en cuatro clases (Figura No. 1) (6, 17)

- Alcaloides verdaderos
- Protoalcaloides
- Pseudoalcaloides
- Alcaloides imperfectos

Alcaloides Verdaderos cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloide: son formados a partir de aminoácidos, tienen siempre un nitrógeno intracíclico, son de carácter básico y existen en la naturaleza normalmente en estado de sal.

Protoalcaloides son aminas simples con nitrógeno extracíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos.

Pseudoalcaloides presentan algunas de las características de la definición de alcaloide, pero no son derivados de aminoácidos.

Alcaloides imperfectos son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides (6, 17, 32)

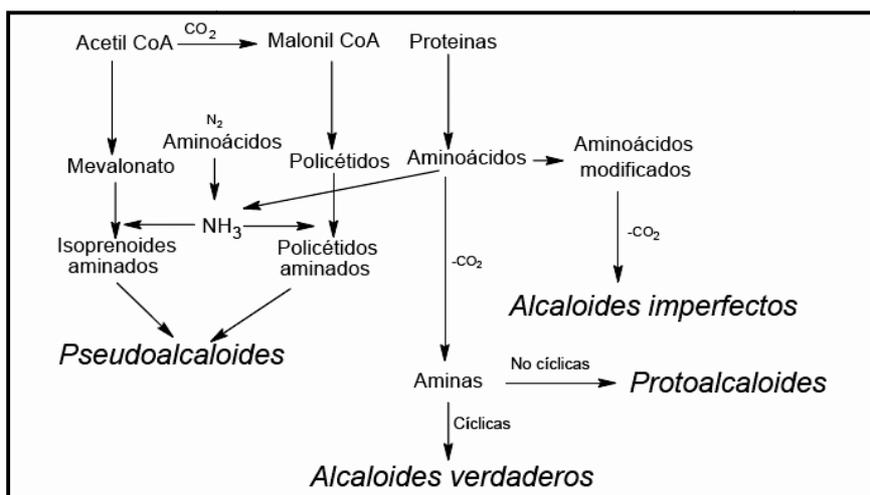


FIGURA No. 1 ASPECTOS BIOGÉNÉTICOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES

En cuanto a su estado natural, los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas (cocaína, nicotina, pilocarpina), en flores (escopolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniina), en semilla (piperina, arecolina), en corteza (quinina, tubocurarina), en la raíz (emetina y cefalina) (6, 17).

1.2.2. FUNCIÓN DE LOS ALCALOIDES EN LAS PLANTAS

La función de los alcaloides en las plantas no es aun clara, existen algunas sugerencias sobre el “rol” que juegan estas sustancias en los vegetales como:

- Sirven como productos de desecho o almacenamiento del nitrógeno sobrante, esta función es equivalente a la del ácido úrico o de la urea en los animales.
- Debido a que en su mayoría, los alcaloides son asociados con ácidos orgánicos que le facilita el transporte en la planta, pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado o para transporte del mismo; en el caso de las Solanaceas midriáticas, los ésteres del tropano se forman en las raíces y son transportados a las partes aéreas donde pueden ser hidrolizados.
- La microquímica ha permitido mostrar en forma general, que los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; esto nos permite pensar que los alcaloides cumplen una importante función como es la de proteger a la planta, por su sabor amargo de estos, del ataque de insectos (6, 17, 32, 45).
- Los alcaloides pueden servir de reguladores del crecimiento, se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente durante la germinación de algunas plantas como la cebada, cuando se encuentran en suelos deficientes de potasio (6, 17, 32, 45).
- Mediante técnicas biotecnológicas, las plantas que normalmente acumulan alcaloides en las partes aéreas, como es el caso de la *Nicotiana* y *Daturas*, se han producido sin alcaloides, la pérdida de alcaloides en el vástago, no impide el desarrollo de la planta, lo cual sugiere que los alcaloides no son esenciales para los vegetales Si bien, la presencia de alcaloides no es vital para la planta, estos deben de participar en secuencias metabólicas y no son solamente productos de desecho del metabolismo (6, 17, 32, 45).

1.2.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ALCALOIDES.

Algunas bases no oxigenadas son líquidas a temperatura ambiente, los alcaloides bases son normalmente sólidos cristalizables, raramente coloreados. Casi siempre están dotados de poder rotatorio específico y las bases cristalizadas tienen puntos de fusión netos, sin descomposición por debajo de 200 °C (2, 15, 56)

Por regla general, los alcaloides bases son muy poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares o poco polares y solubles en alcoholes de más elevada graduación (2, 15, 56).

El carácter básico de los alcaloides es muy variable, dependiendo esta propiedad de la disponibilidad del doblete libre del nitrógeno.

Los agrupamientos electrofílicos adyacentes al átomo de nitrógeno, disminuyen la basicidad y los de carácter contrario la aumentan. El sistema heterocíclico puede permitir una basicidad muy variable. En el caso del pirrol o del indol, el doblete del nitrógeno participa en la aromaticidad, por lo que no son básicos (2, 15, 56).

Por su carácter básico, los alcaloides forman sales con ácidos minerales u orgánicos, éstas son hidrosolubles, insolubles en disolventes orgánicos apolares y solubles en alcoholes. La formación de sales, estabiliza la molécula, por lo que comercialmente los alcaloides se encuentran al estado de sales (2, 15, 56).

Los alcaloides son sustancias interesantes, por sus actividades farmacológicas que se ejercen sobre los más variados terrenos: SNC, SNV (simpático y parasimpático), cardiovascular, anestesia, tumores, enfermedades parasitarias, etc. (2, 15, 56).

1.2.4. ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS

En el género *Lupinus* los alcaloides quinolizidínicos 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 (38).

Los alcaloides quinolizidínicos poseen un heterociclo nitrogenado bicíclico, quinolizidina y se encuentra tanto en los alcaloides indólicos como en los que derivan del metabolismo de la tirosina (32).

Las quinolizidinas auténticas son aquellas que se derivan de la lisina, y se pueden dividir en bicíclicas como la lupanina, tricíclicas como la cisticina o tetracíclicas como la esparteína (49).

Más de 150 especies de lupinus son conocidos en la naturaleza. Los alcaloides quinolizidínicos están ampliamente distribuidos entre las leguminosas *Lotoideas*, siendo los lupinos los más ricos en este tipo de alcaloides (49).

Cho y Martín, (1971), citado por Gross, (1982), aislaron casi 60 diferentes alcaloides en mas de 180 especies de leguminosas. En *Lupinus mutabilis* se han encontrado 25 alcaloides quinolizidínicos de los cuales 19 se han identificado hasta la presente (Tabla 6) (3, 49).

TABLA No. 6 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
Multiflorita	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: GROSS (1982)

Estudios realizados por Peñaloza, (1988) indican que las principales fracciones de alcaloides del chocho son:

TABLA No. 7 PRINCIPALES FRACCIONES DE ALCALOIDES DEL CHOCHO

Alcaloides	Porcentaje %
Lupanina	60
13-Hidroxlupanina	15
Esparteína	7,5
4-Hidroxlupanina	9
Isolupanina	3

FUENTE: JARRIN P. (2003)

1.2.5. BIOSÍNTESIS DE LOS ALCALOIDES

La biosíntesis se basa casi siempre en los aminoácidos: ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y ácido antranílico, los que pueden reaccionar con otros productos elementales del metabolismo general: acetato o mevalonato. La formación del heterocíclico, es decir el establecimiento de una unión carbono-nitrógeno, se realiza por un proceso Inter o intramolecular simple que implica la formación de una base de Schiff o por una reacción de Mannich (9).

El heterocíclico nitrogenado, quinolizidina se encuentra tanto en alcaloides indólicos como en los que derivan del metabolismo de la tirosina (2, 15, 56)

Las quinolizidinas auténticas (derivadas de la lisina), se localizan en las leguminosas lotoideas y se pueden subdividir en bicíclicas como la lupanina, tricíclicas como la citosina o tetracíclicas como la esparteína. La biosíntesis de estos alcaloides es compleja (Figura No.2). (2, 15, 29, 56)

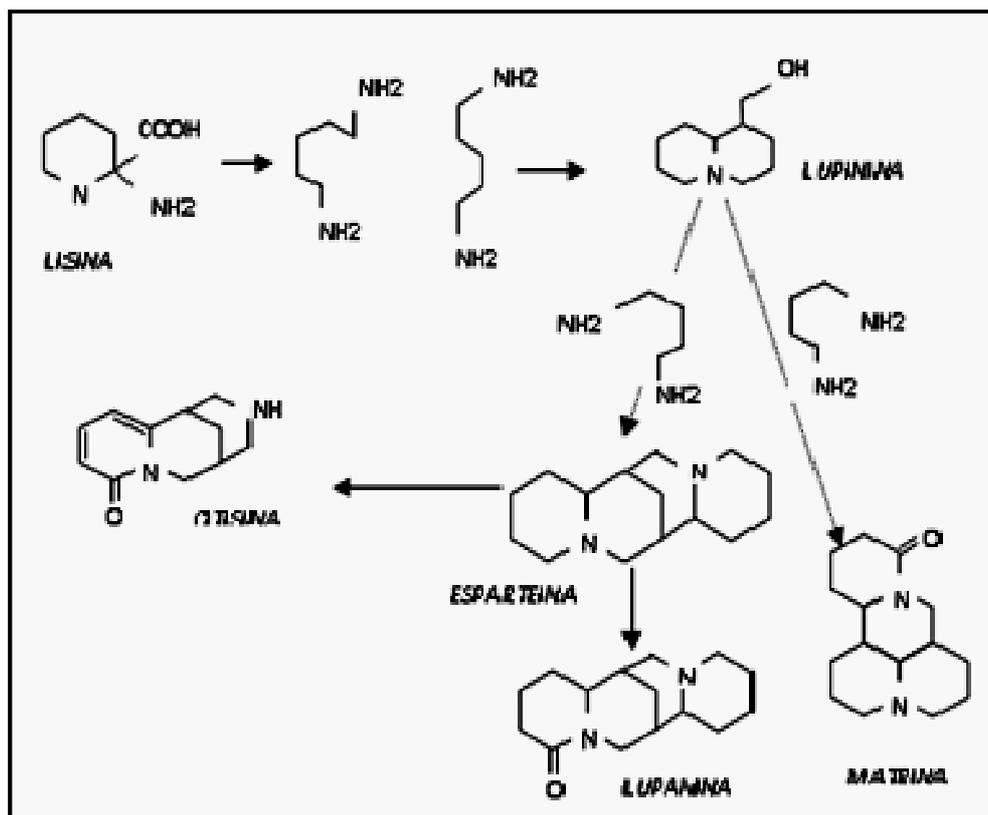


FIGURA No. 2 BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS

1.2.6. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS GENERALES DE LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS.

Los principales alcaloides presentes en el chocho son los siguientes: Lupanina (46%), esparteína (14%), 4-hidroxilupanina (10%), isolupanina (3%), n-metilangustifolina (3%), 13-hidroxilupanina (1%) (2, 17, 29, 48).

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 agua, poco solubles en alcohol y solubles 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 (2, 17, 29, 48).

1.2.6.1. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DE LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS.

1.2.6.1.1. 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. 3), tiene un peso molecular de 248.36 g/mol, es soluble en agua, cloroformo, éter y alcohol e insoluble en éter de petróleo (2, 17, 29, 56)

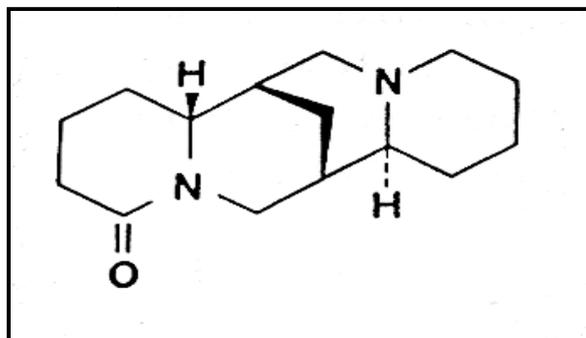


FIGURA No. 3. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA LUPANINA

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.

La d-lupanina es un líquido espeso cristalino con agujas higroscópicas, punto de fusión entre 40 a 44 °C, con punto de ebullición entre 190 a 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, etc (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 (33).

La lupanina tiene actividad antibacteriana, nematicida, puede utilizarse como insecticida contra lepidópteros y coleópteros, también produce inhibición de las actividades moduladoras, inhibe la síntesis de proteínas, inhibe la fase de elongación de Phe – tRNA, además posee actividad antiarrítmica, hipotensora, y actividad hipoglicemiante (14, 52).

1.2.6.1.2. ESPARTEÍNA

Su fórmula estructural es $C_{15}H_{26}N_2$, los dos átomos de nitrógeno de la esparteína están unidos en forma terciaria, tienen un peso molecular de 234 g/mol, (Figura No. 4). Es un líquido oleoso, espeso, incoloro con olor débil a anilina y sabor sumamente amargo. Tiene un peso específico de 1.02 a 20 °C y hierve a 311 °C en corriente alcalina. Es insoluble en agua, alcohol, éter, y cloroformo, con reacción alcalina (19, 26).

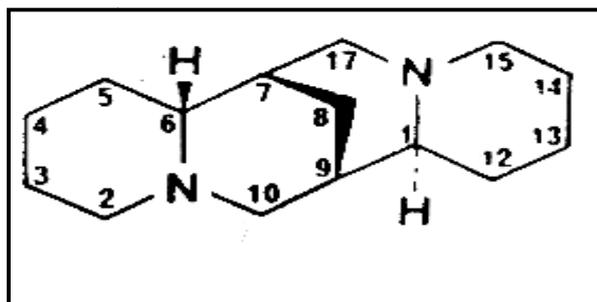


FIGURA No. 4 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ESPARTEÍNA

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

La esparteína tiene sus efectos tóxicos al inhibir los canales de K^+ , además inhibe la síntesis y formación del RNAt, es un depresor del sistema nervioso central, posee actividad, oxiotóxica, uterotónica, antiarrítmica, diurética, hipoglicemiante, estimulante respiratorio (51).

1.2.6.1.3. HIDROXILUPANINA

La hidroxilupanina tiene la siguiente fórmula estructural $C_{15}H_{24}N_2O_2$, con un peso molecular igual a 264 g/mol. Los compuestos salinos más representativos de la hidroxilupanina son: Hidrocloruro pf. 275 °C, cloruro aúrico pf. 210 °C, picrobromato pf. 174-175°C, hidroyoduro monohidratado pf. 91-93 °C, tiocianato monohidratado pf. 125 °C. (51)

Se han identificado dos formas isómeras de la hidroxilupanina como unidades químicas representativas, dependiendo de la localización del grupo hidroxilo (OH^-) en la estructura básica de la molécula, estas son: 4-hidroxilupanina (Figura No. 5) y la 13-hidroxilupanina (Figura No. 6) (29, 42).

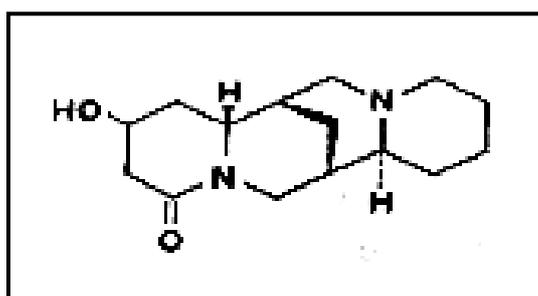


FIGURA No. 5 4-HIDROXILUPANINA

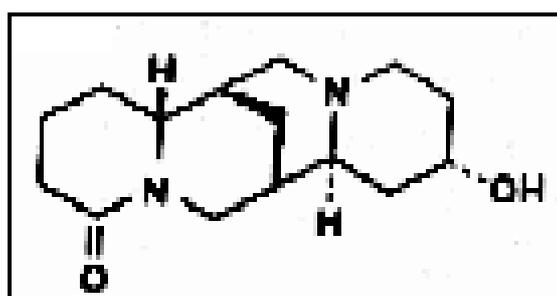


FIGURA No. 6 13-HIDROXILUPANINA

1.2.6.1.4. ANGUSTIFOLINA.

La angustifolina inhibe el crecimiento bacteriano de *Bacilo subtilis*, *Bacilo thuringiensis* y *E. coli*, participa en la inhibición de las actividades moduladoras y en la biosíntesis de las proteínas. La angustifolina posee actividades similares a las de la esparteína, Lupanina, Angustifolina, 13-hidroxilupanina, Lupinina, 17-oxoesparteína, 13-tigloiloxilupanina. La anagirina produce mal formaciones congénitas en terneros (54).

1.3. APLICACIONES POTENCIALES DE LOS ALCALOIDES DEL LUPINO

El principal propósito de los alcaloides del chocho es la defensa de la planta contra insectos, herbívoros y patógenos microbianos.

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, nemátodos, abejas, caracoles, langostas, gusanos y escarabajos (54).

Los alcaloides del lupino tienen una significativa actividad biológica que puede ser explotada en el campo de la farmacia, agricultura, e industria (52, 54).

La Lupanina, Esparteína, 13-Hidroxilupanina, Angustifolina, inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacilo 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 ésta manera eliminan su supervivencia (52).

La Esparteína tiene utilidad práctica comercial, gracias a sus aplicaciones en medicina y en el campo industrial. En el campo médico, la esparteína tiene acción cardiovascular, es agente dilatador de las coronarias y analgésico, cardiotónico, oxiotótico (32).

En el área industrial, tiene utilidad en la elaboración de polímeros ópticamente activos, como catalizador de la polimerización del etileno y en la telomerización (obtención de polímeros de bajo peso molecular) del etileno con otras olefinas (26, 28).

Desde el punto de vista farmacológico, el lupino también tiene interés pues algunos de sus componentes, principalmente los alcaloides, presentan efecto secretagogo de insulina. En medicina tradicional se les ha atribuido actividad hipoglucemiante que clásicamente se ha considerado debida a la presencia de los alcaloides, también con actividad hipocolesterolemia. Igualmente se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y preventivas del cáncer por los flavonoides y hepatoprotectoras por sus saponinas (26, 28).

El efecto hipoglucémico se ha comprobado para algunas especies de lupino administrados por vía oral en animales con diabetes inducida experimentalmente (conejo, rata, ratón). Igualmente en conejos diabéticos y con niveles de colesterol elevados, se comprobó como la adición de semillas de lupino a su alimentación produjo una disminución de la hiperglucemia postprandial y del colesterol (26, 28, 48).

Los principios activos responsables de la actividad hipoglucemiante podrían ser además de los alcaloides, los compuestos de naturaleza saponínica presentes en el extracto de lupinus, pues muchos de ellos han demostrado ser capaces de inhibir la gluconeogénesis hepática y la glucogenólisis y además son capaces de activar la producción de insulina o inducir un incremento en el metabolismo periférico de la glucosa (26, 28).

Por otra parte se ha comprobado que este extracto es capaz de normalizar los sistemas de detoxificación del organismo, anormalmente alterados en animales diabéticos (26, 28, 48).

La actividad de la esparteína se ha estudiado también en humanos sanos y en pacientes diabéticos insulino-dependientes y con diabetes tipo 2. La administración intravenosa del sulfato de esparteína en personas sanas incrementa la secreción de insulina basal o inducida por glucosa y, en pacientes con diabetes tipo 1 aumenta la secreción de glucagón. En diabéticos tipo 2, la esparteína estimula la secreción de las células beta, produciendo una caída en los niveles plasmáticos de glucosa (26, 28).

Recientemente (2004) se ha estudiado el efecto sobre la secreción de insulina de tres alcaloides aislados de lupinos: lupanina, 13-alfa-OH lupanina y 17-oxo-lupanina así como un compuesto derivado sintético: 2-tionosparteína, comprobándose *in vitro*, un incremento en la liberación de insulina inducida por glucosa. La intensidad del efecto depende de la concentración de glucosa en el medio y se debe, al menos en parte, al bloqueo de canales de *K* sensibles a ATP en células beta (2, 11, 27, 29).

Los autores del trabajo sugieren que la administración de los alcaloides de lupino puede disminuir el riesgo de hipoglucemia que se produce con algunos hipoglucemiantes orales que, estimulan la secreción de insulina en presencia de bajas concentraciones de glucosa. (26, 28).

1.4. TOXICIDAD DE LOS ALCALOIDES DEL CHOCHO

La toxicidad de estos compuestos ha sido demostrada a dosis muy altas tanto en animales como en seres humanos. Han ocurrido casos aislados de envenenamiento con semillas de lupino. 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 (11, 29).

Los síntomas de envenenamiento son: midriasis, calambres, cianosis, parálisis respiratoria, violentos dolores estomacales, vómitos e incluso coma (11, 29).

La reacción toxicológica frente a los alcaloides quinolizidínicos varía entre las diferentes especies animales; Eichekbaum, (1927), citado por Gross, (1982), señala que los peces en general y en especial las truchas *Salmo gairdnerii* muestran una elevada sensibilidad a un exceso de estos compuestos (11, 29).

Entre las propiedades toxicológicas de los alcaloides del chocho *Lupinus mutabilis* Sweet, también se menciona su capacidad para inhibir la germinación de varias semillas (2, 11, 29).

1.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Un agente antimicrobiano, es un compuesto químico que inhibe el crecimiento o mata a los microorganismos. La contribución de nuevos estudios acerca de sustancias que posean actividad antimicrobiana es muy importante dado que en la actualidad se ha creado resistencia a muchos compuestos y productos químicos conocidos como antibacterianos, además éstos agentes terapéuticos son en su mayoría responsables de efectos colaterales indeseables para el ser humano (47, 48)

Se conoce que la presencia de metabolitos en las plantas está en relación directa a su bioactividad, por lo que es necesario para la selección de las mismas conocer sobre los tipos de compuestos de un determinado taxón vegetal (37, 31).

Investigaciones en la búsqueda de metabolitos secundarios, a los que se les atribuye actividades antibacterianas en vegetales superiores, demuestran que en la mayoría de los casos esta actividad farmacológica es debida a la presencia de alcaloides bis-bencil-isoquinolínicos, isoquinolínicos, complejos de indol, entre otros (24).

El abuso de antimicrobianos en los hospitales como medida de profilaxis en las operaciones quirúrgicas está incrementando la resistencia antimicrobiana sin realmente beneficiar en muchos casos al paciente (32, 53).

1.5.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La concentración mínima inhibitoria se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/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 (3, 48, 53).

1.5.2. DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS MICROBIANAS

1.5.2.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 13709

- CLASIFICACIÓN.

Orden: Eubacteriales
Familia: Micrococaceae
Género: *Staphylococcus*
Especie: *aureus*

- MORFOLOGÍA.

Los *Staphylococcus* son esferas facultativamente anaerobias, grampositivas, de 0.8 a 1.0 µm de diámetro. En el pus se observan aisladas, apareadas, y en cúmulos irregulares; ocasionalmente forman cadenas cortas, rara vez de más de cuatro cocos de longitud. El agrupamiento característico en racimos es notorio en gérmenes que crecen en medios sólidos. (23, 53)

La pared de la célula estafilocócica contiene una columna vertebral de peptidoglucano, y ácidos teicoicos específicos de cada especie. Además, *S. aureus* posee un componente

antifagocítico de superficie, denominado proteína A, que está unido a la capa de peptidoglucano, pero también puede ser liberado parcialmente en forma extracelular. (27, 53)

S.aureus es un coco Gram positivo, inmóvil, que se presenta aislado, en pares, en cadenas cortas o en racimos irregulares. Esta última disposición es quizá la más característica. (53)

S. aureus puede desarrollar resistencia a los antibióticos con sorprendente facilidad. Por lo menos el 90% de las cepas de estafilococos hospitalarias son resistentes a la penicilina, la cual es medida por una beta-lactamasa o penicilinasa. (53)

- INFECCIONES EN HUMANOS

Los estafilococos están entre los gérmenes más fáciles de cultivar. El estado de portador intermitente de *S. aureus* se considera que existe en el 30-50% de los individuos, y las fosas nasales suelen ser el hábitat de bacterias en portadores. El hecho de que los individuos puedan transportar y diseminar *S. aureus* patógeno durante largo tiempo indica que ellos, y la mayor parte de sus contactos tiene un grado importante de inmunidad para el organismo. Solamente cuando las defensas normales del hospedero faltan o están comprometidas, el microorganismo tiene probabilidad de ser invasor. Así es como la enfermedad puede presentarse en lugares de lesión local, como quemaduras, abrasión u otras heridas. Las anormalidades que originan inmunodepresión sistemática y predisponen a enfermedades estafilocócicas incluyen diabetes, leucemia, insuficiencia renal, terapéutica. (55, 53)

Los estafilococos se han reconocido como causa de enfermedades piógenas desde los primeros tiempos de la microbiología; principalmente en infecciones postquirúrgicas y obstétricas graves, con frecuencia mortales. (55, 53)

1.5.2.2. *Escherichia coli* ATCC 9637

- CLASIFICACIÓN.

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *coli*

- MORFOLOGÍA

Escherichia coli son bacilos de 1 a 3 μm por 0.5 μm , sus formas varían desde cocos a pequeños bastoncillos, que se presentan solos, en pares, en cortas cadenas, agrupados: en general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes móviles no flageladas. No forman esporas; y son Gram negativos. (55, 53)

En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en los cultivos viejos se presentan formas de un tamaño mayor. Son aeróbicos y anaeróbicos facultativos, produce dos tipos de fibras o cilos que rigen su capacidad patógena.

E. coli Produce un tipo de encima denominada bacteriocina que se sabe regula la flora normal según el principio de la antibiosis. (55, 53)

- INFECCIONES EN HUMANOS.

E. coli Es un huésped permanente del tracto intestinal del hombre y los animales y no es considerado como un patógeno primario, por su abundancia en el tracto intestinal y su facilidad de cultivo, se lo usa como índice de potabilidad del agua para el consumo humano; su presencia en el agua o los alimentos constituyen un indicador de contaminación fecal (55, 53)

Las infecciones causadas por *E. coli*, pueden ser divididas en extraintestinales e intestinales (55, 53)

Extraintestinales: resultado de un contacto de persona a persona, provocando infecciones urinarias como: cistitis, pielitis, pielonefritis, esto ocurre probablemente por la íntima asociación entre el hábitad normal de los microorganismos y el tracto urinario, estas infecciones están alrededor del 20% de todas las infecciones urinarias: en pacientes tratados con drogas inmunosupresoras y antibióticos; *E. coli* puede producir infecciones graves (55, 53)

E. coli es una bacteria que habita normalmente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, y desempeña un importante papel en la fisiología del intestino. La distribución en el ambiente está determinada por su presencia en el intestino. Por ser un habitante regular y normal del intestino se usa desde hace un siglo como "el mejor" indicador de contaminación de los alimentos con materia fecal (55, 53)

1.5.2.3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184

- CLASIFICACIÓN.

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Especie: *gallinarum*

- MORFOLOGÍA.

Algunos serotipos son siempre inmóviles. *S. gallinarum* es serotipo de *S. enteritidis*. Habitualmente son móviles. Forma bacilar de 1 a 3 um por 0.6 um, móviles por flagelos peritricos; se presenta solo o en pares, no forma esporas ni cápsulas. Son agentes gran negativos. (48).

- INFECCIONES EN HUMANOS

S. gallinarum puede ser transportada por cualquier animal o pájaro doméstico y por algunos vertebrados de sangre caliente y sangre fría. Brotes de salmonelosis en el hombre provienen de reservorios de tortugas caseras, polluelos, patitos, gallinas, ganado y otros diversos animales domésticos. (48, 55).

1.5.2.4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

- CLASIFICACIÓN.

Orden : Eubacteriales.
Familia : Enterobacteriaceae.
Género : *Klebsiella*.
Especie : *pneumoniae*.

- MORFOLOGÍA.

K. pneumoniae son bacilos Gram negativos, no esporulados. Miden de 0.3 - 1 μm de diámetro y de 0.6 - 6.0 μm de longitud, dispuestas en pares, solos, o en cadenas cortas. (48, 55).

- INFECCIONES EN HUMANOS.

Klebsiella pneumoniae es el agente etiológico de un 3 por 100 de las neumonías de origen bacteriano. Es causa común de la neumonía lobar adquirida en la comunidad, particularmente frecuente en individuos alcohólicos, diabéticos y en pacientes con enfermedad obstructiva crónica; también se asocia a cuadros respiratorios severos como bronconeumonía y bronquitis. El género *Klebsiella* se aísla de las infecciones del tracto urinario y de las bacteriemias de origen nosocomial. Esta bacteria es resistente a muchos antibióticos entre ellos la ampicilina (48, 55).

1.5.2.5. *Mycobacterium smegmatis* ATCC607

- CLASIFICACIÓN.

Orden : Mycobacteriaceae.
Familia : Mycobacterium.
Género : *Mycobacterium*.
Especie : *smegmatis*.

- MORFOLOGÍA.

Esta bacteria está clasificada dentro de las micobacterias de crecimiento rápido , con pigmento irregular. *M. smegmatis* es un bacilo delgado de forma recta o ligeramente curvada, su tamaño suele ser de 1.0-10 μm de largo por 0.2-0.7 μm de ancho, no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula. Cuando se tiñen de Gram, las micobacterias lo hacen escasamente, comportándose como Gram positivas débiles. Son bacilos ácido-alcohol resistente. (BAAR) (48, 55).

- INFECCIONES EN HUMANOS.

Son bacterias saprófitas, se conoce muy poco acerca de sus factores de patogenicidad. Por lo general, las micobacterias no tuberculosas son mucho menos tóxicas que *M. tuberculosis*, aunque se encuentren en una concentración elevada en el tejido infectado. Este tipo de micobacterias producen la infección llamada micobacteriosis que generalmente afectan a individuos que tienen sus mecanismos de defensa locales o generales deteriorados. La puerta de entrada de los microorganismos es tanto aérea como digestiva. (48, 55).

1.5.2.6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- CLASIFICACIÓN.

Orden : Eubacteriales.
Familia : Pseudomonodaceae.
Género : *Pseudomonas*.
Especie : *aeruginosa*.

- MORFOLOGÍA.

Son bacilos Gram negativos, miden de 1-3 μm de longitud y 0.5-1 μm de grosor. Son móviles, presentan de 1-3 flagelos polares, y pueden estar rodeados de una pseudocápsula, son aerobios no fermentadores de la glucosa, oxidasa negativa. (48, 55).

- INFECCIONES EN HUMANOS.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista como tal infecta a pacientes con sus defensas generales disminuidas.

A esta bacteria se le ha agente de infecciones: respiratorias, urinarias, oculares y óticas, cutáneas, bacteriemia, endocarditis, enfermedades meníngeas, infecciones gastrointestinales (48, 55).

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2.EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.

2.2.1. EQUIPOS.

- Autoclave
- Balanza técnica
- Baño María.
- Cámara de flujo laminar.
- Centrífuga
- Refrigeradora.
- Reverbero
- Rotavapor
- Ultrasonido

2.2.2. MATERIALES.

- Asa de platino.
- Balón de 500mL
- Caja de guantes estériles
- Calculadora.

- Embudos de separación con tapa de 500 mL
- Gradilla.
- Mangueras.
- Mechero
- Papel filtro
- Placas de silica gel
- Probetas de 25, 100 y 1000 mL
- Puntas estériles
- Regla
- Rollos de algodón
- Trípode
- Tubos de ensayo
- Varillas de vidrio
- Vasos de Precipitación de 100, 500 y 1000 mL

2.2.3. REACTIVOS

- Acetato de etilo
- Acido clorhídrico 0,01N
- Ácido Sulfúrico 0,01N
- Agar Muller Hinton
- Agar sabourad 4%
- Agua destilada
- Amoníaco
- Dietilamina
- Etanol 96⁰
- Éter etílico
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Sulfato de sodio

2.2.4. MATERIAL BIOLÓGICO

- Se utilizaron los siguientes microorganismos tipificados por la ATCC

Nº	BACTERIA	CÓDIGO
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13709
2	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637
3	<i>Salmonella gallinarum</i>	ATCC 9184
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
5	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607
6	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 27853

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. EXTRACTOS

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron los siguientes productos, los mismos que fueron suministrados por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)

- a) Liofilizado del agua de cocción
- b) Liofilizado del agua de hidratación
- c) Aceite de lupanina 2%
- d) Extracto crudo de alcaloides (lupanina 7,6%)

Además se utilizó hojas y grano de chocho de la línea INIAP 450 Andino, eco tipo de origen ecuatoriano, el cual fue tratado a nivel de laboratorio para la obtención de los siguientes extractos:

- e) Extracto etéreo crudo de alcaloides totales a partir del agua de cocción del grano de *Lupinus mutabilis* Sweet (300g /L por 1H)
- f) Extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet

2.3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ALCALOIDALES

2.3.2.1. PROCEDIMIENTO

- **Extracto etéreo crudo de alcaloides totales del grano de *Lupinus mutabilis Sweet*** : Granos enteros seleccionados se cocieron durante una hora, (300 g 1 L de agua destilada), se filtro, el filtrado se alcalinizó con amoníaco hasta pH 11, se dejó en reposo una hora, se extrajeron los alcaloides con éter etílico (1:1) y se recuperó la fase orgánica. (Anexo 2) (55, 60)
- **Extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis Sweet***: Las hojas frescas se secaron a 35 °C en una estufa, se maceró en etanol de 96° se aplicó en el ultrasonido, se filtró, se adicionó sulfato de sodio, se dejó en eposo 24 horas luego se filtró, y evaporo a sequedad. (Anexo 3)

2.3.3. IDENTIFICACIÓN DE ALCALODES.

En el material vegetal (liofilizado) del agua de cocción e hidratación del proceso de desamargado preparadas en el laboratorio, filtradas y no filtradas, extracto etéreo crudo de alcaloides totales del grano de *Lupinus mutabilis Sweet*, y extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis Sweet* se realizaron pruebas cuantitativas de Dragendorff, Mayer y Wagner para identificación de los alcaloides. (37,58)

2.3.3.1. ANÁLISIS COMATOGRAFICO.

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: Silica 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. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES

Se tomó una alícuota de 0.2 mL de agua de desamargado de chocho, se agregó 0.6 g de óxido de aluminio, se mezcló bien y se añadió 0.2 mL de KOH al 15% y se agitó hasta formar una pasta homogénea, luego se transfirió a tubos de centrifuga y se agregó 6 mL de cloroformo. Se agitó hasta homogenización y se centrifugó por 2 minutos (entre 1.500 y 3.000 rpm)

Se recibió la fase clorofórmica, se repitieron las extracciones por lo menos 10 veces, hasta que 1 mL del último extracto fue evaporado a sequedad, suspendido en 4 o 5 gotas de ácido sulfúrico 0.01N, dando reacción negativa con 3 o 4 gotas del reactivo de Dragendorff.

Se recogió los lavados de todos los extractos, se evaporó con calor suave sin llegar a sequedad, dejando en la etapa final 1 mL, que desaparecerá rápidamente al dejarlos en un recipiente con agua fría. Se agregó 5 mL de ácido sulfúrico 0.01N, dos gotas de rojo de metilo y se tituló el exceso de ácido con NaOH 0.01N. El contenido de alcaloides se reportó como lupanina considerando que: 1 mL de H₂SO₄ 0.01N equivale a 2.48 mg de Lupanina.

2.3.5. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ALCALOIDALES DEL *Lupinus mutabilis Sweet* (MÉTODO DE MITSCHER) (16)

2.3.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRA PARA EL ENSAYO

a. Extractos Crudos y Totales

En un vial limpio, seco y estéril, se codificó el nombre del extracto de la planta. Con precisión se pesó 50 mg del extracto crudo o total y se disolvió en 500 µL de DMSO. La concentración final de esta disolución fue 100000 µg/mL.

Se realizó diluciones al décimo, utilizando tubos de ensayo, secos, limpios y estériles a los que se añadió 900 μL de DMSO y 100 μL del extracto de la concentración anterior, las concentraciones finales fueron de 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se codificaron cajas Petri estériles, con el nombre del extracto y la concentración final (una caja para la concentración 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, una caja para la concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y una caja para la concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se pipeteó separadamente 100 μL de las disoluciones con los extractos a los tubos de ensayo que contenían 10 mL de TSA a 45 $^{\circ}\text{C}$.

Se mezcló con la ayuda de un vórtex e inmediatamente se pasó a las cajas Petri previamente codificadas con el nombre de los extractos y de cada una de las concentraciones preparadas. Una vez que se solidificó el medio de cultivo con los extractos, se invirtieron las cajas Petri y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas.

b. Fracciones del Extracto Crudo

Se pesó exactamente la cantidad de fracción del extracto crudo a ensayarse y se disolvió con agua, en tubos 100 X 13 limpios, secos y estériles, de tal manera que tenga una concentración inicial y un volumen, posible de realizar diluciones adicionales.

Utilizando tubos de ensayo 100 X 13 limpios y secos se realizó diluciones sucesivas (Ejemplo: 100 μL de extracto + 100 μL de DMSO. Se codificó las cajas Petri necesarias con la identificación de la fracción y las concentraciones finales respectivas.

Se pipeteó separadamente 100 μL de las disoluciones de la fracción del extracto y se pasó a los tubos de ensayo con 10 mL de TSA a 45 $^{\circ}\text{C}$. Se mezcló con la ayuda de un vórtex e inmediatamente se pasó a las cajas Petri previamente codificadas.

Las cajas Petri una vez solidificadas el medio de cultivo con las diluciones de los extractos, se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas, se realizaron blancos respectivos de reactivos y de DMSO.

c. Solución Control de Sulfato de Estreptomicina

Con precisión se pesó 100 mg de sulfato de estreptomicina y se disolvió con agua estéril en un balón aforado de 10 mL limpio, seco, esta solución no se esterilizó en autoclave. La concentración final fue de 10000 $\mu\text{g/mL}$.

Se prepararon varias diluciones sucesivas (Ejm: 500 μL de solución de sulfato de estreptomicina + 500 μL de agua estéril), concentraciones finales: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 $\mu\text{g/mL}$.

Se codificaron las cajas Petri con el nombre de control de estreptomicina y con las concentraciones finales: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.262 $\mu\text{g/mL}$.

Se pipeteó separadamente 100 μL de las disoluciones de estreptomicina a los tubos de ensayo que contenían 10 mL de TSA a 45 °C. Las concentraciones finales fueron: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.265 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Las caja Petri una vez solidificado el medio de cultivo con las disoluciones de los controles de estreptomicina, se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas.

c. Preparación de las cajas Petri

Las cajas Petri preparadas anteriormente no debieron presentar ningún tipo de contaminación. Todas las cajas se dividieron por la parte exterior en siete partes iguales y se marcaron del 1 al 7 (figura No. 8).

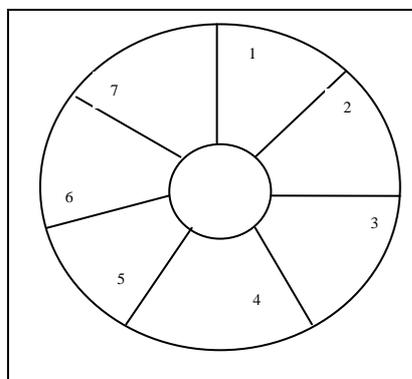


FIGURA No. 7 Patrón radial para marcaje de las cajas Petri

d. Preparación de las suspensiones de los microorganismos

En tubos de 150 X 15 con 10 mL de solución salina estéril se llevaron a temperatura ambiente y se codificaron con el nombre respectivo del microorganismo.

Los cultivos de los microorganismos para el ensayo deben estar visiblemente turbios, y a partir de estos se prepararon las siguientes suspensiones en los tubos con solución salina estéril (Anexo 6).

Nº	TIPO DE BACTERIA	CÓDIGO	
		ATCC	MODO DE PREPARACIÓN
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	13709	100 µL de susp.bact. en 10 mL sln salina
2	<i>Escherichia coli</i>	9637	100 µL de susp.bact. en 10 mL sln salina
3	<i>Salmonella gallinarum</i>	9184	100 µL de susp.bact. en 10 mL sln salina
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	100 µL de susp.bact. en 10 mL sln salina
5	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	Sin diluir
6	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	27853	1 µL de susp.bact. en 10 mL sln salina

e. Estriado de los Microorganismos

A partir de las suspensiones bacterianas en la solución salina, se tomó una asada de cada microorganismo en su turno y se estrió en cada suspensión, desde el límite hacia cerca del centro de la caja Petri, los cultivos se incubaron a 37 °C por 24-48 horas.

d. Lectura de Resultados

La actividad antibiótica se manifiesta por falta de crecimiento e la línea de estriado. Hay actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo. Las lecturas de los resultados se interpretaron de la siguiente manera: A = Activo, P = Parcialmente activo, I = Inactivo.

Si el microorganismo fue morfológicamente alterado, por ejemplo, si *P. aeruginosa* no muestra su pigmento verde característico, o si no crece bien, la caja puede ser registrada como **P**. (actividad parcial).

Las cajas Petri de control deben tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en las cajas de control negativo y la potencia apropiada en las cajas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así, el experimento ha fallado y debió ser repetido.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS Y DEL AGUA DE COCCIÓN DEL GRANO DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet), OBTENIDO A NIVEL DE LABORATORIO.

El análisis fitoquímico preliminar que se realizó: a) extracto alcohólico de las hojas, b) aguas de cocción del grano de chocho, determinándose que los alcaloides, triterpenos y esteroides se encuentran cualitativamente en mayor proporción en el grano de chocho que en las hojas en relación al resto de metabolitos secundarios. Algunos autores señalan que la distribución de los alcaloides es bastante selectiva, hallándose en mayor concentración en las primeras etapas de desarrollo de la planta en capas externas de hojas, tallos y flores, y cuando la planta ha llegado a su madurez los alcaloides se localizan principalmente en los tegumentos de las semillas. (Cuadro No.1). (11, 14, 31).

CUADRO No. 1. ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS Y DEL AGUA DE COCCIÓN DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis Sweet*. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO 2008.

RESULTADOS			
TIPO DE COMPUESTO	REACCIONES PRUEBAS	EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	AGUA DE COCCIÓN DEL GRANO DE <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>
Alcaloides	Wagner Mayer Dragendorff	(++)	(+++)
Triterpenos y Esteroides	Lieberman-Burchard	(++)	(+++)
Azúcares Reductores	Fehling	(++)	(++)
Fenoles y Taninos	FeCl ₃	(++)	(++)
Flavonoides	Shinoda Ensayo de Antocianidinas	(+)	(++)
Saponinas	Ensayo de la espuma	(+)	(++)
Aminoácidos Libres	Ninhidrina	(+)	(++)

+++ cuando la presencia del metabolito secundario es abundante

+ ó ++ cuando la presencia del metabolito es poco o escaso y

– cuando las reacciones han sido negativas, lo que indica ausencia del compuesto

Los alcaloides presentes en el género *Lupinus* son de tipo quinolizidínicos. Estos metabolitos secundarios constituyen un mecanismo de defensa contra microorganismos fitopatógenos, herbívoros y contra otras especies de plantas que causan competencia (Wink, 1998) (11, 14, 31, 46).

Desde el punto de vista farmacológico los alcaloides, las saponinas, flavonoides, triterpenos y esteroides han mostrado diversas actividades biológicas: antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, ictiotóxica, molusquecida, insecticida, antihelmíntica,

expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, gastroprotectora, analgésica, antipirética, sedante, antihepatotóxica, etc (6, 46).

De ahí el interés de comprobar si los alcaloides de las aguas del proceso de cocción del chocho poseen actividad antibacteriana.

3.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS ALCALOIDES DE *Lupinus mutabilis Sweet*

El análisis cromatográfico se desarrolló en:

- a) Aguas del proceso de cocción del grano de *Lupinus*
- b) Extracto etéreo crudo obtenido de la extracción básica líquido- líquido de las aguas de cocción del grano de *Lupinus*
- c) Extracto crudo alcohólico de las hojas de *L. mutabilis Sweet* (Anexo 4)

Los productos proporcionados por el INIAP: a) Liofilizado del agua de cocción, b) Liofilizado del agua de hidratación, c) Aceite de Lupanina 2%, d) Extracto crudo de alcaloides (Lupanina 7,6%); dieron positivos los ensayos de Mayer, Wagner, Dragendorf, 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 R_f 0,43 el cual coincidió con el valor práctico R_f práctico (5).

La identificación y cuantificación de los alcaloides del chocho, es de gran importancia, ya que la toxicidad y amargor del grano dependen del tipo y proporción de estos componentes. Estudios realizados en el Laboratory of Food Chemistry and Mass Spectrometry de la University of Milan, Italia verificaron que de los alcaloides identificados, la lupanina es el mayor constituyente, pues alcanzó el 2,5 % en el grano crudo y el 11,5 % en el extracto. El segundo en importancia fue la esparteína y corresponde al 0,32 % en el grano crudo y 2,5 % en el extracto. Otros compuestos como la 3- β -hidroxilupanina y 13-hidroxilupanina y tetrahidrorombifolina, se encontraron en menor cantidad. Este último alcaloide desaparece durante la purificación y concentración del extracto (Anexo 5)

De igual manera en el extracto etéreo crudo del grano y en el extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus* se identificó la presencia de lupanina.

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

3.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana se ensayó frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

3.3.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LIOFILIZADO DEL AGUA DE COCCION; LIOFILIZADO DEL AGUA DE HIDRATACIÓN; ACEITE DE LUPANINA 2%; EXTRACTO CRUDO DE ALCALOIDES (LUPANINA 7,6%) DE *Lupinus mutabilis Sweet* FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los liofilizados del agua de cocción e hidratación, el aceite de Lupanina 2% y el extracto crudo de alcaloides (Lupanina 7,6%) en concentraciones de 1.000µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL así como también concentraciones intermedias de estos ensayos, no mostraron actividad frente a las cepas estándar utilizada. (Cuadro No.2).

CUADRO No. 2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LIOFILIZADO DEL AGUA DE COCCION; LIOFILIZADO DEL AGUA DE HIDRATACIÓN; ACEITE DE LUPANINA 2%; EXTRACTO CRUDO DE ALCALOIDES (LUPANINA 7,6%) DE *Lupinus mutabilis Sweet* FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS. SEPTIEMBRE 2008.

PRODUCTOS DE ENSAYO	CONCENTRACION µg/mL	MICROORGANISMOS					
		1	2	3	4	5	6
	1000	I	I	I	I	I	I
a) Liofilizado del agua de cocción	100	I	I	I	I	I	I
b) Liofilizado del agua de hidratación	10	I	I	I	I	I	I
c) Aceite de Lupanina 2%							
d) Extracto crudo de alcaloides (lupanina 7,6%)							
BLANCO	-----	I	I	I	I	I	I
DMSO	10000	I	I	I	I	I	I

A = Activo, **PA** = Parcialmente activo, **I** = Inactivo

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 13709
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
6. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

Se sugiere que las concentraciones ensayadas son demasiado bajas para activar mecanismos inhibitorios de estos microorganismos, vale mencionar que pruebas clásicas de identificación de Dragendorff, Mayer, Wagner y cromatografías 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.

De otro lado se estimó que durante la obtención de los productos proporcionados por el INIAP, los procesos de liofilización, extracción y/o purificación pudieron afectar la potencial actividad de los alcaloides de *Lupinus*.

Estudios realizados por Cécile, M. *et,al*; denotan que los procesos de escaldado de las semillas o los de extracción y purificación de los alcaloides de *L. mutabilis* y *L. campestris* provocan una disminución en un 50% del contenido en alcaloides quinolizidínicos, oligosacáridos y compuestos fenólicos (11, 40, 31, 46).

Además no se analizaron concentraciones superiores a 1.000 µg/mL de los liofilizados, debido a que su solubilidad fue un factor limitante, coincidiendo con los estudios de Galarza, J. *et,al* (11, 31).

3.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis Sweet* FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Al no encontrar actividad antimicrobiana en los productos de ensayo proporcionados por el INIAP, se procedió a extraer y purificar alcaloides totales del grano y hojas de chocho de la línea INIAP 450 Andino, eco tipo de origen ecuatoriano, para probar la actividad antimicrobiana a concentraciones según el método de Mitscher *et,al*, (1.000µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL), las cuales no inhibieron a los microorganismos en estudio. (Cuadro No.3)

CUADRO No. 3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO Y EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS. SEPTIEMBRE 2008.

PRODUCTOS DE ENSAYO	CONCENTRACION µg/mL	MICROORGANISMOS					
		1	2	3	4	5	6
	1000	I	I	I	I	I	I
a) Extracto etéreo crudo del agua de cocción del grano	100	I	I	I	I	I	I
	10	I	I	I	I	I	I
b) Extracto alcohólico crudo de las hojas							
BLANCO	-----	I	I	I	I	I	I
DMSO	10000	I	I	I	I	I	I

A = Activo, **PA** = Parcialmente activo, **I** = Inactivo

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 13709
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
6. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

La respuesta negativa al ensayo de Mitscher y la positividad en los ensayos cualitativos de alcaloides llevaron a probar dosis de desafío del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano y del extracto etanólico crudo de las hojas de *Lupinus* en concentraciones de 20.000µg/mL; 10.000µg/mL y 5.000µg/mL. (Cuadro No.4)

CUADRO No. 4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DE LOS ALCALOIDES TOTALES DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS. SEPTIEMBRE 2008.

PRODUCTO DE ENSAYO	CONCENTRACION mg/mL	MICROORGANISMOS					
		1	2	3	4	5	6
Extracto etéreo crudo del agua de cocción del grano de <i>Lupinus</i>	200	A	A	A	A	A	A
	100	A	A	A	A	A	A
	50	A	A	A	A	A	PA
	25	A	A	A	A	A	I
	12.5	A	A	A	A	A	I
	6.25	A	A	A	A	A	I
	3.125	PA	PA	PA	PA	PA	I
	1.56	PA	PA	PA	PA	PA	I
BLANCO	-----	I	I	I	I	I	I
DMSO	200	I	I	I	I	I	I

A = Activo, PA = Parcialmente activo, I = Inactivo

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 13709
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
6. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

El extracto etéreo crudo de alcaloides totales, a las dosis de desafío inhibió a los microorganismos en estudio excepto a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 que fue parcialmente inhibida a (5.000µg/mL), siendo inhibida a las concentraciones más altas, lo cual hace pensar que la metodología de extracción y/o purificación degrada a los compuestos activos.

Al encontrarse actividad antibacteriana a la dosis de 5.000 µg/mL del extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano, coincidiendo con el estudio de Fuertes, R. *et al*; se probó actividad con diluciones consecutivas 1:2 de (2.500 µg/mL; 1.250 µg/mL;

625 µg/mL; 312,5 µg/mL y 156,25 µg/mL), encontrándose actividad frente a los microorganismos en estudio. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue de 625 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; y de 10.000 µg/mL para *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853. (Cuadro No.4) (Anexo 9)

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) (40,31,46).

El extracto alcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet a las concentraciones desafío no presentaron actividad frente a los microorganismos ensayados, exepcto con *Staphylococcus aureus* ATCC 13709, que a 5.000 µg/mL y 10.000 µg/mL se manifestó una actividad parcial pero a la concentración de 20.000 µg/mL se presentó una total inhibición frente a este microorganismo. (Cuadro No. 5) (Anexo 8)

CUADRO No. 5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO CRUDO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS. SEPTIEMBRE 2008.

PRODUCTO DE ENSAYO	CONCENTRACION mg/mL	MICROORGANISMOS					
		1	2	3	4	5	6
Extracto alcohólico crudo de las hojas de Lupinus	200	A	I	I	I	I	I
	100	PA	I	I	I	I	I
	50	PA	I	I	I	I	I
	25	PA	I	I	I	I	I
	12.5	PA	I	I	I	I	I
	6.25	PA	I	I	I	I	I
	3.125	I	I	I	I	I	I
	1.56	I	I	I	I	I	I
BLANCO	-----	I	I	I	I	I	I
DMSO	200	I	I	I	I	I	I

A = Activo, PA = Parcialmente activo, I = Inactivo

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 13709
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
6. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

Según Gross R. Von Baer E., en la determinación de los contenidos de proteína, compuestos fenólicos, ácido fenólico libre y taninos; se estableció que la inhibición de la prueba del crecimiento de bacterias depende principalmente del contenido total de compuestos fenólicos, lo cual descarta la posibilidad de la influencia de alcaloides en los resultados (11, 31, 40, 46).

Otras investigaciones realizadas por Reinhard, H., *et,al* indican que los compuestos fenólicos y en especial los isoflavonoides aislados del *Lupinus argenteus* podrían potenciar la actividad antibacteriana de los alcaloides y del ácido linolénico (11, 31,46).

La mayoría de antibióticos de uso clínico se han obtenido de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos), pero debido a la gran diversidad de manifestaciones adversas y el incremento de interacciones medicamentosas, en los últimos 20 años ha surgido mayor interés por antimicrobianos obtenidos a partir de plantas.

CUADRO No. 6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SULFATO DE ESTREPTOMICINA FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS. SEPTIEMBRE 2008.

PRODUCTO DE ENSAYO	CONC µg/mL	MICROORGANISMOS					
		1	2	3	4	5	6
Sulfato de Estreptomicina	100	A	A	A	A	A	A
	50	A	A	A	A	A	A
	25	A	A	A	A	A	A
	12.5	A	A	A	A	A	PA
	6.25	A	A	A	A	A	PA
	3.125	PA	PA	PA	PA	PA	I
	1.56	PA	PA	PA	PA	PA	I
BLANCO	-----	I	I	I	I	I	I
DMSO	100	I	I	I	I	I	I

A = Activo, **PA** = Parcialmente activo, **I** = Inactivo

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 13709
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
6. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. La cuantificación de los alcaloides expresados como lupanina en el agua de cocción del grano de *Lupinus* reveló una concentración de 36% (p/p), y en el agua de hidratación 35% (p/p), la cocción facilita una mayor liberación de este compuesto de interés farmacológico. Pruebas cualitativas de Mayer, Wagner, Dragendorf, dieron positivos los ensayos verificándose cualitativamente el contenido de alcaloides en el liofilizado del agua de cocción, liofilizado del agua de hidratación, aceite de Lupanina 2%, extracto crudo de alcaloides (Lupanina 7,6%)
2. Los alcaloides presentes en las agua de cocción e hidratación, el aceite de Lupanina 2%, el extracto crudo de alcaloides (Lupanina 7,6%) y los extractos obtenidos a nivel de laboratorio, a concentraciones de 10 µg/mL; 100 µg/mL y 1.000 µg/mL así como también concentraciones intermedias de estos ensayos, no mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, en las condiciones del presente ensayo, sugiriéndose que las concentraciones ensayadas son demasiado bajas para activar mecanismos inhibitorios de estos microorganismos.
3. El extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de *Lupinus mutabilis* Sweet empleado a una concentración de desafío de 20.000 µg/mL y diluciones consecutivas hasta 156,25 µg/mL, mostró actividad frente a los microorganismos en estudio.

4. Para el extracto etéreo crudo de los alcaloides totales del grano de *Lupinus mutabilis* Sweet se determinó que la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue de 625 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; y de 10.000 µg/mL para *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, deduciendo que los alcaloides del chocho muestran actividad antimicrobiana a concentraciones muy altas en las condiciones utilizadas en el presente ensayo, en relación a 100 µg/mL que es la asociada a un buen nivel de potencial para aplicaciones de utilidad clínica. Por todo lo expuesto anteriormente, los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet pueden ser aprovechados para otro tipo de aplicaciones, y así evitar el eliminar indiscriminadamente el residuo de los lavados del procesamiento del chocho.

5. El extracto alcohólico crudo de las hojas de *Lupinus mutabilis* Sweet presentó actividad únicamente contra *Staphylococcus aureus* ATCC 13709 a 5.000 µg/mL; y 10.000 µg/mL manifestó una parcial actividad, y a la concentración más alta (20.000 µg/mL) mostró una total inhibición frente a este microorganismo.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar nuevas técnicas de extracción y purificación para la obtención de los alcaloides del chocho con la finalidad que se garantice la mayor concentración de compuestos activos responsables de la acción antimicrobiana del *Lupinus mutabilis* Sweet.
2. Se debería realizar nuevas investigaciones con los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet, ampliando el número de microorganismos causantes de patologías comunes en nuestro medio.
3. Es necesario ampliar este estudio para evaluar otras posibles actividades que se le atribuye a nivel popular, así como realizar estudios de toxicidad subcrónica y crónica para obtener una mayor seguridad en el uso de los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet.
4. A pesar que los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet muestran actividad antimicrobiana a concentraciones muy altas en referencia a 100 µg/mL que es la relacionada a un alto nivel de potencia para usos farmacológicos, y ante la problemática ambiental que representa la eliminación indiscriminada del agua del proceso de cocción y desamargado del chocho en los distintos cuerpos acuíferos, se debería utilizar estos alcaloides para elaborar productos benéficos para el hombre, aprovechando las propiedades farmacológicas que poseen los alcaloides quinolizidínicos frente a microorganismos patógenos de gran incidencia en nuestro medio.

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 antimicrobiana de los liofilizados de las aguas de cocción e hidratación del proceso de desamargado de *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho), frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, la investigación está 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 vertidas por la gran toxicidad que presentan.

Contó con el financiamiento del INIAP, SENACYT, al realizar el análisis de los liofilizados se determinó la actividad antimicrobiana utilizando como metodología de ensayo técnicas de Mitscher et, al.

Las aguas a las concentraciones de 10 µg/mL; 100 µg/mL y 1000 µg/mL no mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853. Al no obtener respuesta positiva en la evaluación, se ensayaron dosis desafío de 5000 µg/mL; 10000 µg/mL y 20000 µg/mL; las cuales manifestaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Luego del estudio realizado se concluyó que los alcaloides del proceso de desamargado no mostraron actividad a concentraciones según el test de Mitscher et,al. las cuales son consideradas de uso clínico. Por lo que se recomienda investigar nuevas técnicas de extracción de alcaloides.

SUMMARY

At the Food Microbiology Lab of the Science Faculty of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, the anti-microbial activity in vitro of the lyophilized of cooking water and hydration of the-bittering process of *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho), in front of *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, was determined. This investigation was focused on reducing the environmental pollution using alkaloids present in water causing the death of vegetal species in the place where it is poured because of its high toxicity. It had the funding from INIAP and SENACYT. Upon carrying out the lyophilized analysis the microbial activity determined using as a trial methodology Mitscher et al. techniques. Water at concentrations of 10 µg/mL; 100 µg/mL and 1000 µg/mL did not show any activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Upon not obtaining a positive response in the evaluation challenge dosages of 5.000 µg/mL; 10.000 µg/mL and 20.000 µg/mL; were essayed: these manifested an anti-microbial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 13709; *Escherichia coli* ATCC 9637; *Salmonella gallinarum* ATCC 9184; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. It is concluded that the alkaloids of the-bittering process did not show any activity at concentrations according to the Mitscher et al. test. This is why it is recommended to investigate new extraction techniques of alkaloids.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ADESOGAN, E. y DURODOLA, J. I.** 1976. Antitumor and Antibiotic Principales de *Annona senegalensis*. *Phytochemistry*. 15 (3): 1311-1312
2. **ARIAS, L.** 1985. Análisis Comparativos de Dos Métodos de Aislamiento y Determinación de Alcaloides de *Lupinus mutabilis*. Tesis Ingeniero en Industrias Alimentarias. Lima – Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. pp. 57 - 60
3. **BASTARDO, H.** 1982. Producción de Truchas en Venezuela. Venezuela: Ministerio de Agricultura y Cría. pp. 40
4. **BLOMH, H.** 1962. *Lupinus mutabilis* In: Poisonous Plants of Venezuela. Cambridge Harvard University. 39 p.
5. **BRAVO, B.** 1988. Texto de Microbiología. Quito: Universidad Central del Ecuador. pp. 222-228.
6. **BRUNETON, J.** 1991. Alcaloides. In: Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Trad. por: Ángel Villar del Fresno. Zaragoza: Acribia. pp. 55-366
7. **BURKART, A.** 1952. *Lupinus mutabilis*. las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2a. ed. Buenos Aires: Acme Agency. pp. 321
8. **BUSTAMANTE, F.** 2002. Manual Sobre el Uso de las Plantas Medicinales. Managua, Nicaragua: Fundación Centro Nacional de la Medicina Popular Tradicional. pp. 212-216.

9. **CAICEDO, C. y PERALTA, E.** 2001. Sistemas de Producción y Procesamiento Artesanal del Chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), Quito: Estación Experimental Santa Catalina. pp. 49. (Boletín Técnico, n°. 105)
10. **CAICEDO, C.; PERALTA, E. y VILLACRÉS, E.** 2000. Poscosecha y Mercadeo de Chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), Quito: Estación Experimental Santa Catalina. pp. 38. (Boletín Técnico, n°. 89)
11. **CAMPANA, A.** 1988. Efecto del Hervido y del Lavado, Sobre el Peso, Volumen y Contenido de Alcaloides en el Grano de Tarwi. Perú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. pp. 303-305.
12. **CASTAÑEDA,** 1988. Estudio Comparativo de 10 variedades de Tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) Conducidos en Dos Ambientes de la Sierra, Norte y Centro del Perú. Tesis Ing. Agr. Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina. pp. 187-196
13. **CHÁVEZ, C.** 1986. Fermentación Sólida del Chocho. Tesis Ing. en Alimentos. Ambato – Ecuador: Universidad Técnica de Ambato; Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. pp. 79
14. **CRUZ, E.** 1987. Las Leguminosas y la Nutrición Humana. Evento de Información y Difusión de Resultados de Investigación sobre el Chocho. Ambato: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. pp. 17
15. **CZRNECKA, E. et. al.** 1977. Effects of some Lupanine Alkaloids on Rhythm of the Isolated Hearts. Acta Polónica Farmacéutica. Polonia. 24(3): pp. 545-548. Febrero 1977
16. **DÁVILA, J.** 1987. El Lupino como Alimento Humano: proteína y aceite. Ambato – Ecuador: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. pp. 1 – 21.
17. **DÍAZ, E.** 1990. Porcentaje de Proteínas, Aceites y Alcaloides de Seis Líneas Seleccionadas de Tarwi. Tesis Ing. Agr. Perú. Universidad Nacional del Perú. 64 p.

18. **DOMÍNGUEZ, X.** 1973. Alcaloides: métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa. pp. 211-226.
19. **DUKE, S.** 2000. Allelochemicals: natural products as source for new mechanisms of herbicidal action. México: s. edit. pp. 583-589.
20. **FATTORUSSO, V.** 2001. Vademécum Clínico del Diagnóstico al Tratamiento. 9a. ed. Buenos Aires: El Ateneo. pp. 976-985.
21. **GARCÍA, L.** 2004. Quinolozidine Alkaloids Isolated From Lupinus Species Enhance Insulin Secretion. Eur Pharmacology. EEUU: 1(2): 139-142.
22. **GROSS, R.** 1982. El Cultivo y la Utilización del Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. pp. 152, 154-158.
23. **GROSS, R.** 1982. El Cultivo y la Utilización del Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Roma: Producción y Protección Vegetal. pp. 141 – 169.
24. **GROSS, R. Y TUESTA, L.** 1977. El Cultivo y la Utilización de los Lupinos. Perú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. pp. 154-165
25. **GROSS, R., et al.** 1988. La Composición Química de una Nueva Variedad de Lupinus Andino (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) con Bajo Contenido de Alcaloides. Perú: Universidad Nacional del Altiplano. pp. 353 - 361.
26. **GUERRERO, M.** 1987. Algunas Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Evento de Información y Difusión de Resultados de Investigación sobre el Chocho. Quito: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. pp. 25- 28
27. **GUERRERO, M.** 1987. Alcaloides del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Evento de Información y Difusión de Resultados de Investigación sobre el Chocho. Ambato. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Ambato. Febrero 1987. pp. 7

28. **HEFLE, SL.; LEMANSKE, RF. y BUSH, R, K.** 1994. Adverse Reaction to Lupine-Fortified Pasta. *J. Allergy Clin Immunology*. EEUU. 3(2): 167-172.
29. **JARRÍN P.** 2003. Tratamiento del Agua de Desamargado del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Proveniente de la Planta Piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. Tesis Doctor en Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. pp. 62-96
30. **JURADO, J.** 1990. Industria y Medio Ambiente. Quito: Fundación Natura, pp. 50. (Serie Información para Líderes del Ecuador, n°. 4)
31. **KATZUNG, B. G.** 2005. Farmacología Básica y Clínica. 9a. ed. México: Manual Moderno. pp. 64-68
32. **LARA K.** 1999. Estudio de Alternativas para el Desamargado de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de Doctor en Química. Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. pp. 187 – 189
33. **LOCK, O.** 1988. Investigación Fitoquímica: métodos en estudio de productos naturales. Perú: Pontificia Universidad Católica, pp. 149-191. (Serie Productos Naturales, no. 27)
34. **MATHEU, V.; DE BARRIO, M. y SIERRA, Z.** 1999. Lupine Induced Anaphylaxis. *J. Allergy Clin Immunology*. EEUU: 5(1): 83. Agosto.
35. **MC CAWLEY, E.** 1985. Cardioactive Alkaloids. The alkaloids, chemistry and physiology. New York: Academic Press. pp. 85 – 88
36. **MERINO C.** 1999. Análisis de Aminoácidos y Azúcares Libres en Chocho (*Lupinus mutabilis* sweet), Durante el Tratamiento Previo al Consumo. Tesis de Doctor en Química. Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. pp. 48 – 154

- 37. MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; CUADRADO Y DE LA CUADRA, C. 1993.**
Determinación de Factores Antinutritivos Termorresistentes en Leguminosas I: Alcaloides. Investigación Agraria Producción y Protección Vegetal. México. pp. 351-361
- 38. NOVIEMBRE, E.; MORIONDO, M. y BERNARDINI, R. 1999.** Lupin Allergy in a Child. Allergy Clin Immunology. Atlanta: 1(4): 103 – 114. Octubre.
- 39. ORTEGA, R. y PALACIOS, J. 1995.** Efecto del Tiempo de Remojo, Cocción, y Lavado Sobre el Contenido de Alcaloides y Proteína en el chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de Ing. en Alimentos. Ambato. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. 67 p.
- 40. PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO. (CYTED). 1995.** Manual de Técnicas de Investigación. España: CYTED. pp. 63-67.
- 41. SALIS, A. 1985.** Cultivos Andinos Alternativa Popular. Cuzco: Centro de Estudios Rurales Andinos Bartolomé de las Casas CEDEP – AYLLU. 89 p.
- 42. SIAVICHAY, G. 1986.** Evaluación Agronómica de Quince Ecotipos de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y Aspectos Relacionados al Mejoramiento Genético de Ésta Especie. Tesis de Ing. Agrónomo. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad Ingeniería Agronómica. 63 p.
- 43. VELASCO, E. y VALDIVIA, Y. 1981.** Origen y Evaluación del Tarwi. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina. 56 p.
- 44. VILLACRÉS, E; CAICEDO, C; PERALTA, E. 1998.** Disfrute Cocinando con Chocho. Recetario. Quito – Ecuador: PRONALEG. 48 p.
- 45. WINK, M. 1992.** *Lupinus mutabilis*: composition and potencial applications of quinolizidine alkaloids. Luxemburgo: s. edit. pp. 130

46. **WINK, M.** 1998. Chemical Ecology of Alkaloids: alkaloids biochemistry, ecology and medicinal applications. New York: Plenum Press. pp. 265-296.
47. **ZAMORA, N. et. al.** 2002. *In vitro* Antifungal Activity of *Lupinus montanus* Extract and Lupanine on *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis*. In. Proc. 10th Int. Lupin Conference. México. Abril 07 2003. México: s. edit. pp. 255-256

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

48. AGENTES ANTIMICROBIANOS Y MICROORGANISMOS

<http://coli.usal.es/web/educativo/micro2/tema20.html>
20080315

49. ALCALOIDES QUINOLIZÍDICOS

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

50. ANTIBIÓTICOS

<http://www.monografias.com/trabajos5/antibio/antibio.shtml>.
20070923

51. BROPHY M. CASTRO M. Dosis Efectiva Media (DE50) del Efecto

Antiinflamatorio del Extracto Metabólico de *Lupinus mutabilis* Sweet en Ratas. <http://www.medicina.usmp.edu.pe/congresomundial/000data/temlib>.
20070528

52. CULTIVOS ANDINOS FAO

http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/cap03_1_3.htm.
20070816

53. LOS ANTIBIOTICIOS

http://www.danival.org/microclin/antibiot/madre_antibiot.html.

20071103

54. LUPINUS

<http://es.wikipedia.org/wiki/Lupinus#Descripci.C3.B3n>.

20070816

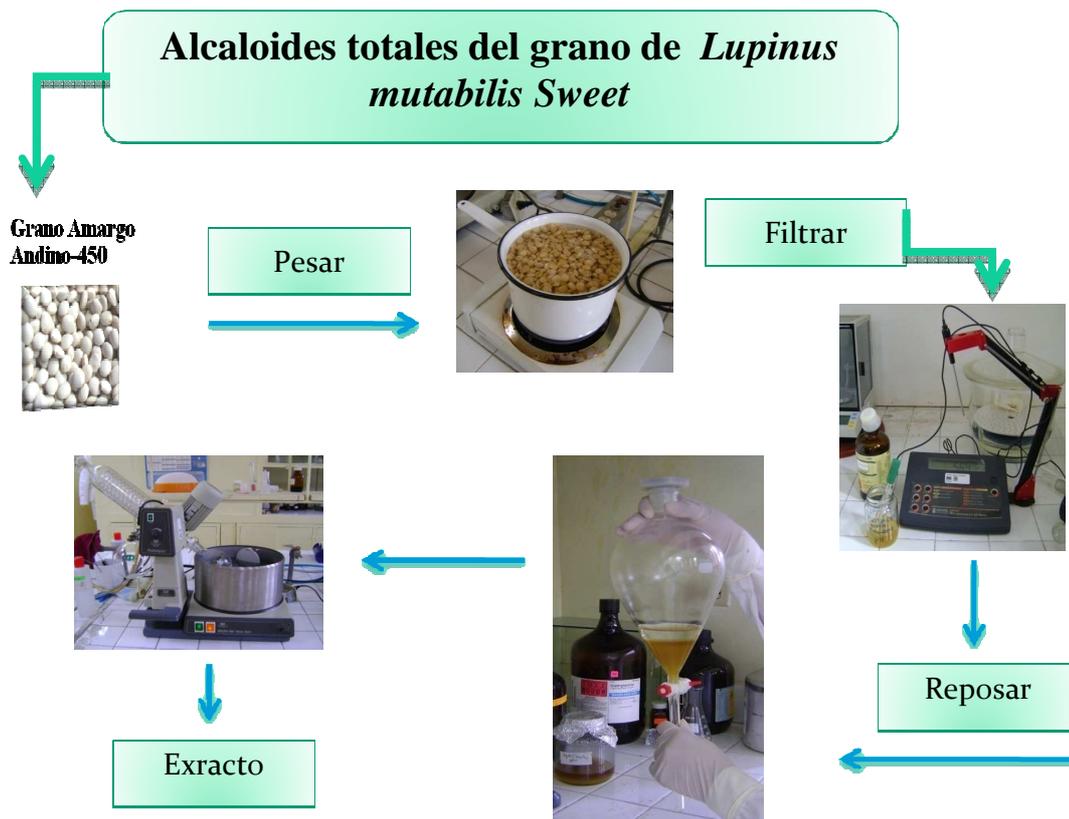
CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO 1. PLATOS TÍPICOS PREPARADOS CON CHOCHO



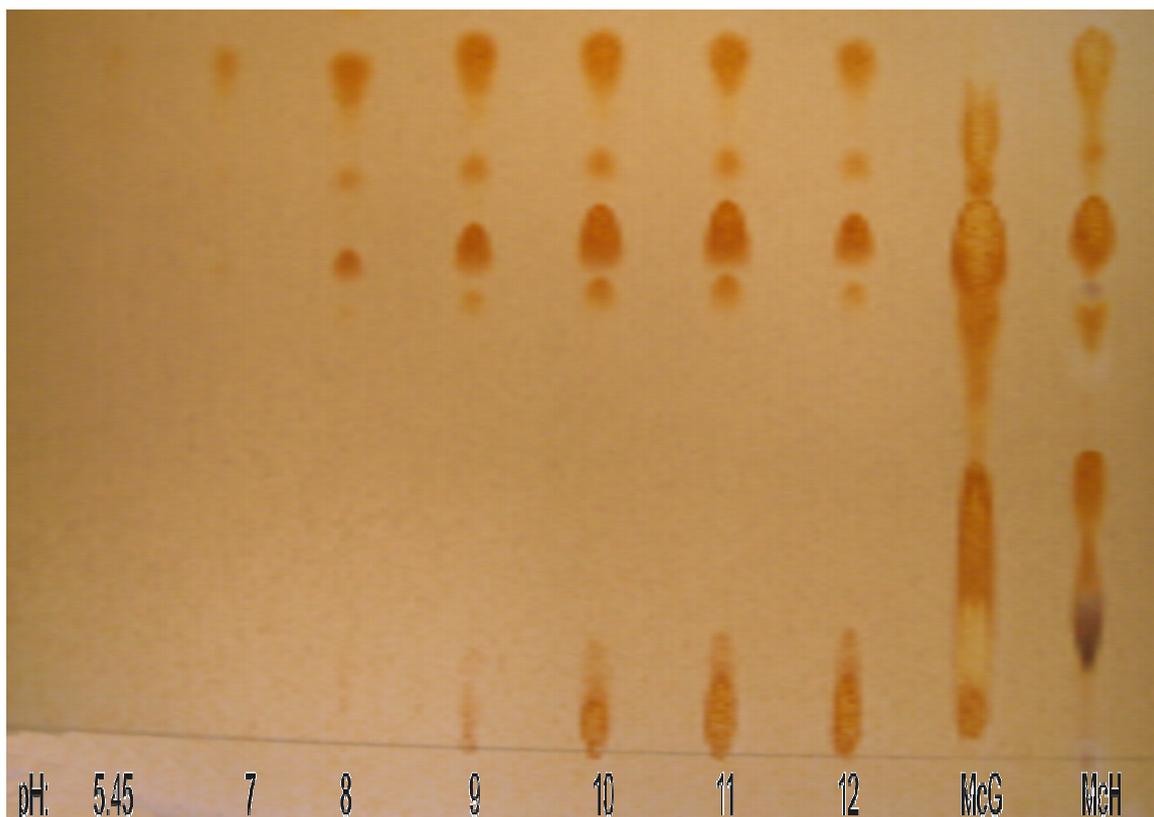
ANEXO 2. DIAGRAMA PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETereo CRUDO DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis Sweet*, A NIVEL DE LABORATORIO



ANEXO 3. DIAGRAMA PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO CRUDO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis* Sweet.

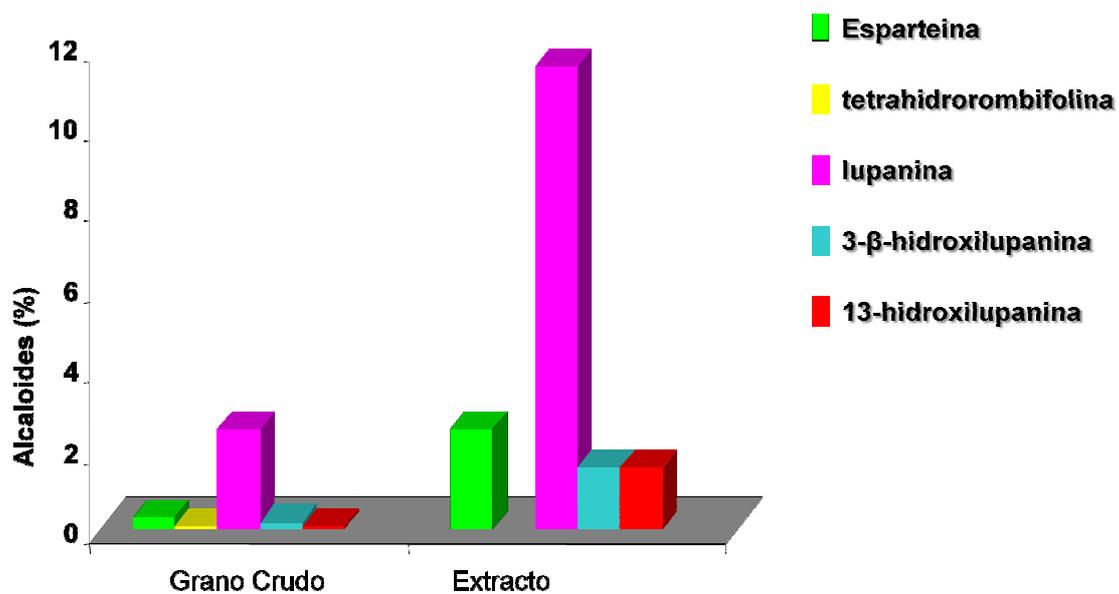


ANEXO 4. CROMATOGRAFÍA EN SÍLICA GEL DEL AGUA DE COCCIÓN, DEL EXTRACTO ETEREO A DIFERENTES RANGOS DE pH; DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis Sweet*.



Fase móvil: Act. etilo: hexano: dietilamina: 77,5: 17,5: 5
Revelador: Wagner

**ANEXO 5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES
TOTALES DE *Lupinus mutabilis Sweet*.**

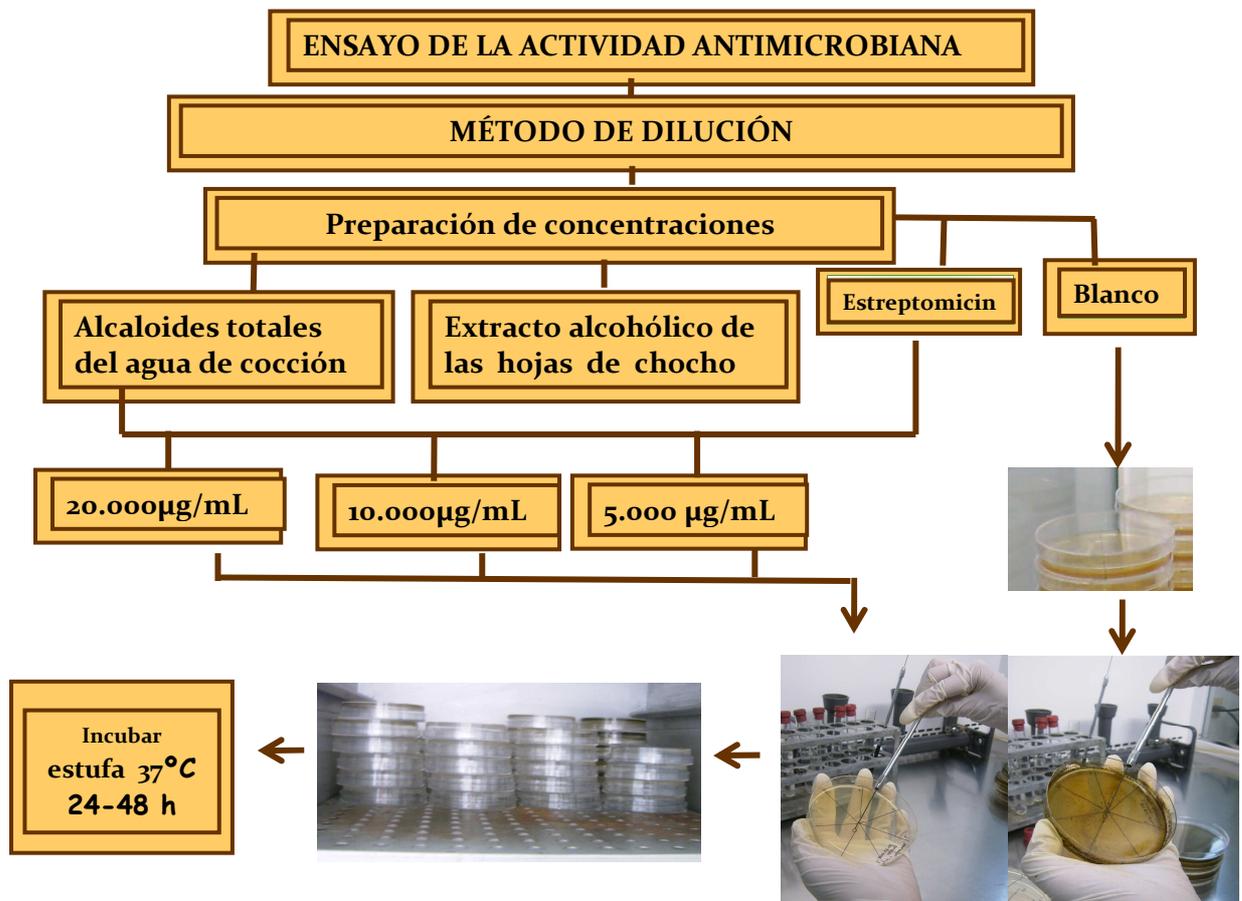


Laboratory of Food Chemistry and Mass Spectrometry
University of Milan, Italia

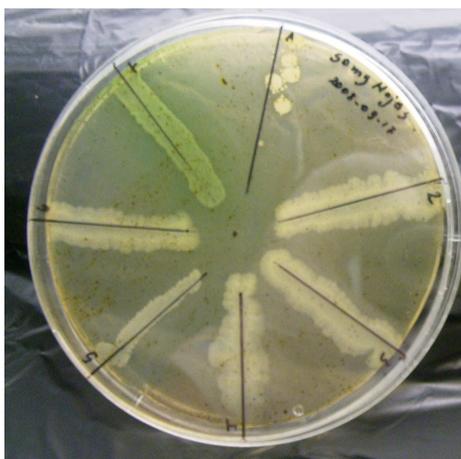
ANEXO 6. ACTIVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN



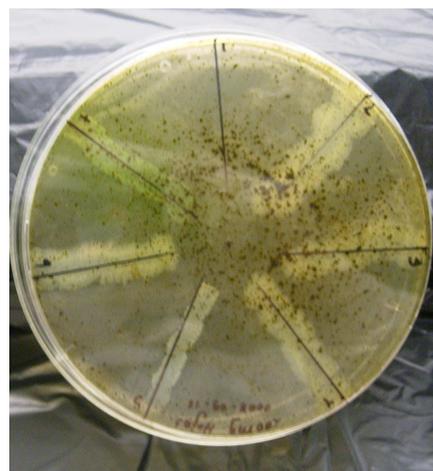
ANEXO 7. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A NIVEL DE LABORATORIO, A DOSIS DE DESAFÍO



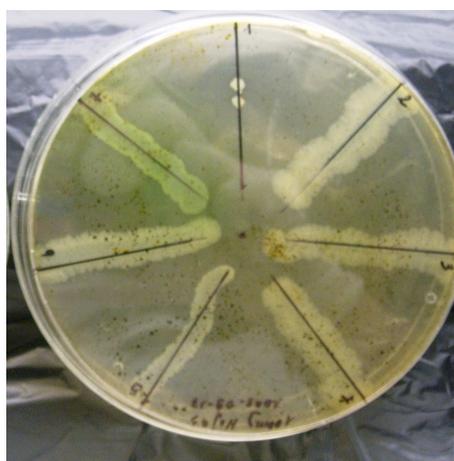
ANEXO 8. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Lupinus mutabilis Sweet*



5000 µg/ mL



20000 µg/ mL

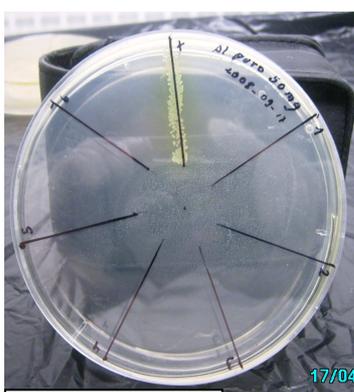


10000 µg/ mL

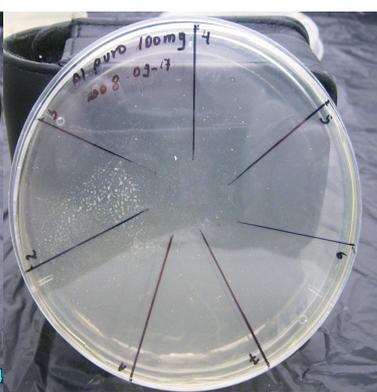
ANEXO 9. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETÉREO CRUDO DEL GRANO DE *Lupinus mutabilis Sweet*



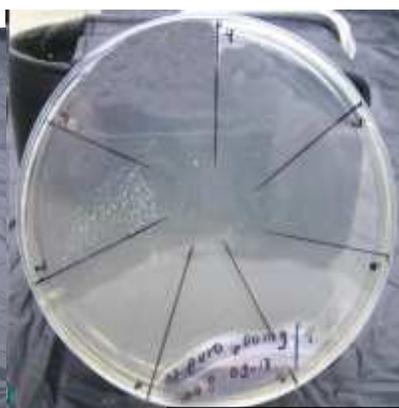
BLANCO



5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$



10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$



20000 $\mu\text{g}/\text{mL}$