



Extracción de alcaloides presentes en las semillas de *Lupinus mutabilis* y su actividad antibacteriana

**Kelly Alejandra Martínez Correa
Roberth Yair Acosta Quiñonez**

**Directoras
Kriss Dayana Pantoja Pulido, PhD.
Lizbeth Lorena López Parra, PhD.**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química
Cali, Colombia
2020**





Extracción de alcaloides presentes en las semillas de *Lupinus mutabilis* y su actividad antibacteriana

**Kelly Alejandra Martínez Correa
Roberth Yair Acosta Quiñonez**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Químico.**

**Directoras
Kriss Dayana Pantoja Pulido, PhD.
Lizbeth Lorena López Parra, PhD.**

**Línea de Investigación:
Alimentos y Fármacos
Grupo de Investigación:
Electroquímica y Medio Ambiente (GIEMA)**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química
Cali, Colombia
2020**



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por darme la oportunidad de formarme como profesional y darme ánimos cuando lo necesité, por sus consejos y su amor, que me permitieron no rendirme. A la universidad Santiago de Cali, al programa de Química y profesores por su compromiso y apoyo para desarrollar este proyecto, y ser parte de mi formación académica, crecimiento profesional y personal. Un agradecimiento especial al profesor Jaime Martin Franco, la profesora Kriss Dayana Pantoja, a Lizbeth Lorena López y Andrés Felipe Vargas por compartir sus conocimientos y dedicación.

Kelly Alejandra Martínez Correa

Agradezco a los profesores que aceptaron ser parte de este trabajo y nos abrieron las puertas a sus conocimientos científicos, ayudando a resolver dudas y tener toda la paciencia del mundo para ser una guía durante todo el desarrollo de este proyecto.

Roberth Yair Acosta Quiñonez

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Inhibidores de plagas y microorganismos provenientes de los extractos alcaloides de las semillas <i>Lupinus mutabilis</i> .	Agricultores, campesinos, industria farmacéutica
Social	Producto destinado al control de plagas y microorganismos, permitiendo la optimización de los cultivos de la localidad.	Agricultores y campesinos con necesidades para el control de plagas y enfermedades en sus cultivos
Cultural	Actividades dedicadas a la tecnificación y optimización de los métodos de siembra y cuidado de cultivos utilizando las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> .	Agricultores y campesinos con la necesidad de optimizar sus métodos de siembra y cuidado de cultivos.
Responsabilidad social	Actividades de divulgación de información dirigida a investigadores, agricultores y campesinos, resaltando el aporte nutricional de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> y los beneficios de los alcaloides presentes en esta planta, los cuales son utilizados para control de plagas y microorganismos.	Comunidad científica de productos naturales, Agricultores y campesinos con necesidades para el control de plagas.
Científico	Artículo científico enfocado en las áreas e investigaciones relacionadas a la Agricultura y la industria farmacéutica.	<ul style="list-style-type: none"> • Universidad: mejoramiento de su plataforma investigativa. • Docente: cumplimiento con plan de trabajo investigativo. • Estudiantes: ampliación de capacidades investigativas para la formación profesional.
Indicadores de Gestión	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje de alcaloides presente en semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> • Aactividad antibacteriana de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> 	Grupo de Investigación: medición de los métodos, resultados y metas resultantes de la presente Investigación.
Ambiental	Obtención de productos de origen natural enfocados al control de plagas y microrganismos.	Comunidad local donde se aplique la investigación

EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES PRESENTES EN LAS SEMILLAS DE *Lupinus mutabilis* Y SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Universidad Santiago de Cali, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Química, Grupo de Investigación de Electroquímica y Medio Ambiente, Santiago de Cali, Colombia.

Kelly Alejandra Martínez¹, Roberth Yair Acosta², Kriss Dayana Pantoja³, Lizbeth Lorena Lopez⁴
kalejandramc@gmail.com¹, roberthacosta9062@gmail.com², kriss.pantoja00@usc.edu.co³,
lizbeth.lopez00@usc.edu.co⁴

RESUMEN

Lupinus mutabilis es una planta con elevadas propiedades nutricionales y alto potencial agronómico derivado del contenido en proteínas de sus semillas y condiciones de crecimiento en los suelos. Esta planta biosintetiza diferentes metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes y antibacterianos, haciéndola potencial para el desarrollo de productos antibacterianos. Debido a lo anterior, esta investigación tiene como objetivo la extracción de alcaloides presentes en semillas de *Lupinus mutabilis* cultivadas en el Valle del Cauca, para evaluar su actividad antibacteriana y compararlas con semillas del mismo tipo cultivadas en el Ecuador. Para esto, se realizó la extracción ácida líquido-líquido de las semillas y se determinó mediante tamizaje fitoquímico, la presencia de flavonoides, esteroides, saponinas y alcaloides. Como principal resultado se evidenció a la lupanina como el alcaloide más abundante, seguido por esparteína y 3β-hidroxilupanina. Además, se encontró que el extracto crudo de alcaloides de semillas cultivadas en el Valle del Cauca, presenta más contenido alcaloidal 95.8% en comparación con el 50.0% de las semillas cultivadas en Ecuador.

Palabras clave: *Lupinus mutabilis*, metabolitos secundarios, *Staphylococcus aureus*, actividad antibacteriana, alcaloides.

EXTRACTION OF ALCALOIDS PRESENT IN THE SEEDS OF *Lupinus mutabilis* AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

ABSTRACT

Lupinus mutabilis is a plant with high nutritional properties and high agronomic potential derived from the protein content of its seeds and growing conditions in the soil. This plant biosynthesizes different secondary metabolites with antioxidant and antibacterial properties, making it potential for the development of antibacterial products. Due to the above, this research aims to extract alkaloids present in *Lupinus mutabilis* seeds grown in Valle del Cauca, to evaluate their antibacterial activity and compare them with seeds of the same type grown in Ecuador. For this, the Liquid-liquid acid extraction of the seeds was carried out and the presence of flavonoids, steroids, saponins and alkaloids was determined by phytochemical screening. As the main result, lupanin was evidenced as the most abundant alkaloid, followed by sparteine and 3β-hydroxylupanine. In addition, it was found that the crude alkaloid extract of seeds grown in Valle del Cauca, presents more alkaloid content 95.8% compared to 50.0% of seeds grown in Ecuador.

Keywords: *Lupinus mutabilis*, secondary metabolites, *Staphylococcus aureus*, Antibacterial activity, alkaloids.

1. INTRODUCCIÓN

Lupinus mutabilis es una planta leguminosa de origen andino presente en países como Ecuador, Perú, Colombia y Venezuela. Esta se encuentra principalmente en los ecosistemas de alta montaña y páramos, entre 2000-4500 m.s.n.m. El género *Lupinus*, perteneciente a la familia *Leguminosae*, comprende plantas anuales o perennes, de raíces profundas, hojas digitadas con numerosos folíolos, inflorescencias terminales muy visibles

y vainas comprimidas de forma oval o cuadrangular, las cuales presentan un bajo contenido de semillas. [1] El género reúne alrededor de 300 especies de hierbas arbustos y unos pocos árboles con un gran potencial agronómico, derivado del alto contenido de proteico de sus semillas y el efecto positivo sobre la fertilidad de los suelos. Esta ha sido estudiada por su valor nutricional (semillas con un alto valor proteico comprendido entre el 24.8% y el 49.8%); sin embargo, presenta compuestos anti nutricionales como los alcaloides, los cuales pueden ser tóxicos para el consumo [2]. Algunas especies del genero *Lupinus* como la *Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus* y *L. mutabilis*, se han cultivado en diferentes lugares alrededor del mundo, esto gracias a que su follaje y especialmente sus semillas presentan una importante concentración de proteínas (valores varían de 30 a 40% en base seca según la especie, variedad y condiciones ambientales). [3]

Aunque no hay antecedentes sobre la utilización de esta planta como forraje, pobladores de regiones como estado de Jalisco, indican que este género es utilizado para el consumo ocasional del ganado. Si bien esta especie se caracteriza por la presencia de alcaloides como la lupanina, el cual dota a la planta de un sabor amargo y de ser potencialmente toxico, múltiples estudios permiten determinar que su consumo puede realizar según etapas de crecimiento en donde la concentración de alcaloides como la lupanina no representa un riesgo de toxicidad [3]. Autores como declaran que la semilla se comprende comestible una vez se ha desamargado y removido los alcaloides que aún conserva; es utilizada por los pobladores de Bolivia y los Andes del Perú en su alimentación, en donde se constata el consumo en niños por parte de estos gobiernos, [4]. Otros autores como Zamora han demostrado que si bien el contenido de alcaloides totales promedio en las hojas y flores se encuentra entre 1.12 y 1.06%, la reducción de alcaloides en hojas y tallos de *L. albus* y *L. Mutabilis* en sus últimas etapas del crecimiento, se debe a que los alcaloides almacenados en los órganos que están por alcanzar la senescencia, son transferidos a los frutos y semillas, por ser compuestos metabólicamente activos, [5]. De igual forma se resalta que en los frutos del *L. exaltus* la lupanina se encuentra la mayor concentración de lupanina relativa (52,82%) mientras que las hojas y flores el alcaloide de mayor presencia corresponde a la epiafilina (26.56 y 37.7% respectivamente), [3].

Respecto a la *L. mutabilis*, su comportamiento en suelos muestra características de alta importancia como la resistencia a enfermedades, plagas y condiciones climáticas adversas [6]. A continuación, se muestra la Descripción taxonómica de *L. mutabilis*:

Tabla 1. Descripción taxonómica de *L. mutabilis*

Nombre científico	<i>Lupinus mutabilis</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	Plantas vasculares (<i>traeochofhyta</i>)
División	Plantas con flores (<i>filo magnoliohyta</i>)
Clase	Magnolias, margaritas y parientes
Dicotiledóneas	<i>Magnoliosida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabaleas</i>
Género	<i>Lupinus</i>
Especie	<i>Lupinus mutabilis</i>
Nombres comunes	Chocho, alverjilla (Colombia, ecuador), altramuz (España), tarwi (perú), lupino.

En Colombia se encuentran presentes en las localidades de Pasto, Tunja, Bogotá y el macizo colombiano. [7] El cultivo de *Lupinus* en la producción agrícola colombiana es de poca importancia, sin embargo, este puede llegar a considerarse como una alternativa agrícola y agroindustrial por sus diferentes propiedades, teniendo en cuenta las condiciones climáticas en donde crece y se desarrolla.

La especie *L. mutabilis* presenta un contenido de proteína cruda de 43.07% (b.s), siendo la proteína de mayor presencia a comparación de la *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus* que tienen 36.7, 31.1 y 41.8% respectivamente, [8]. Por otra parte respecto a los antecedentes fitoquímicos del género *lupinus* se tiene la

presencia de taninos y oligosacáridos, así como una reducida concentración de lecitinas, fitatos y saponinas [9]. Igualmente numerosos estudios han demostrado la presencia de luteona y alto nivel de flavonoides del tipo isoflavona, destacándose la genisteína, 2'-hidroxigenisteína y wighteona [9]. Estos compuestos son producidos tanto en tallos, raíces, flores y vainas inmaduras de la *L. albus*, y en tallos y raíces de *L. angustifolius* y *L. mutabilis*, [9].

1.1 Descripción Botánica

Lupinus mutabilis o Tarwi, es una especie generalmente anual, de crecimiento erecto, alcanzando alturas entre los 0.8 m hasta más de 2 m. El tallo presenta forma cilíndrica o ligeramente aplanado y con una alta variación en su estructura: un tallo principal prominente o no, así como un tallo con escasa ramificación a uno con pocas ramas secundarias y mucha ramificación. Las hojas tienen forma de láminas de tipo digitado con un número variable de folíolos (entre 5 a 12 oblongos [10]). La inflorescencia es mayor en longitud en el eje principal y disminuye progresivamente en los laterales; se pueden contar más de 60 flores, aunque no todas llegan a formar frutos [11]. La flor mide alrededor de 1.2 cm de longitud con la forma típica de las papilionáceas: corola con cinco pétalos [10], conformada por un estandarte, dos quillas y dos alas. La pigmentación de la corola puede variar entre blanco, crema, amarillo, púrpura y/o azul-púrpura, debido a las antocianinas y flavonas de la planta [11]. La quilla envuelve al pistilo junto con los diez estambres monadelfos, las anteras advierten dos tamaños dispuestos alternamente con un estilo encorvado y el cáliz presenta un borde dentado pubescente.

El fruto se encuentra constituido por una vaina dehiscente de 5 a 12 cm de largo y de acuerdo a la cantidad de semilla que pueda albergar (Ilustración 1 a). La vaina es alargada y contiene un promedio de 2 a 3 semillas, llegando en ocasiones a albergar 9 semillas, las cuales se acomodan en hilera con un tamaño entre 4 a 15 mm. Su forma es de característica elipsoidal y lenticular, observándose algunas redondeadas y/o bordes definidos y semicuada (Ilustración 1b) [11].

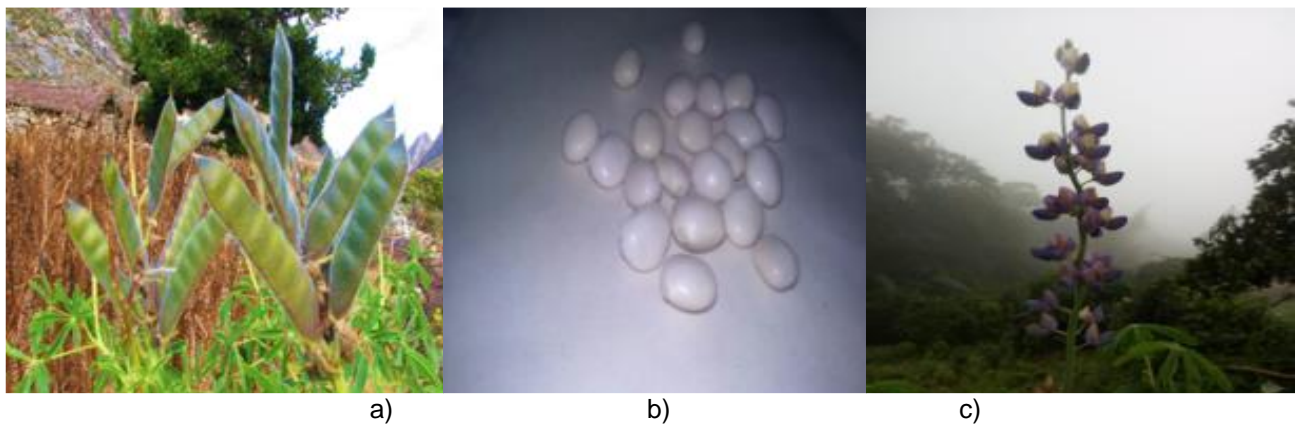


Ilustración 1. Morfología de *Lupinus mutabilis*: a) vainas b) semillas c) hojas y flores. [12] [13]

La planta lupinus presenta una forma típica de Ficoideas, donde la corola alcanza de 1 a 2 cm (0.39–0.79 in) con cinco pétalos (Ilustración 1c); *L. mutabilis* tiene una raíz principal fuerte que se caracteriza por ser de grosor amplio y pivotante, alcanzando los 3 m de longitud. Esta desempeña un rol de sostén y conducción de savia desde el suelo hasta los demás órganos. Adicionalmente, esta planta al igual que todas las raíces secundarias de Leguminosae y forma nódulos que contienen bacterias para la fijación de nitrógeno [14].

1.2 Biosíntesis de Esparteína y Lupanina

Las plantas de la especie *Lupinus* congregan hasta un 6% de alcaloides en sus hojas, tallos y semillas, los cuales son utilizados como defensa frente a plagas y herbívoros [15]. Todas las plantas de *Lupinus* poseen alcaloides procedentes de aminoácidos alifáticos del tipo Bis-quinolizidinicos tetraciclicos, que han sido hallados en anfibios, plantas acuáticas y hongos terrestres [16].

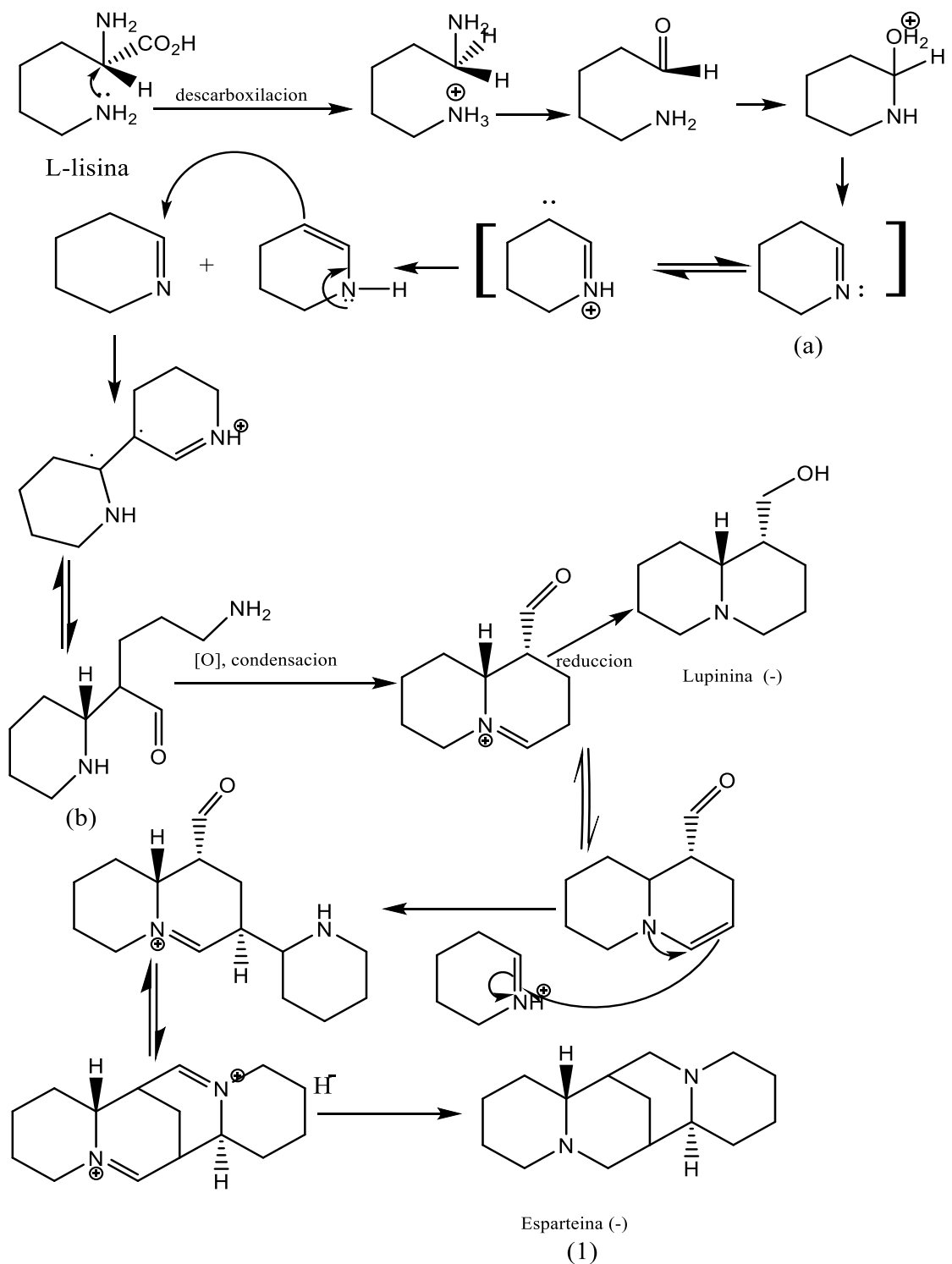


Ilustración 2. Biosíntesis de *lupanina* y *esparteína*[12]

La biosíntesis de las quinolizidinas es análoga a la de las necinas; inicia con el aminoácido alifático L-lisina, el cual sufre una descarboxilación enzimática generando la cadaverina, el cual es un precursor intermediario

entre la lisina y los alcaloides quinolizidínicos. La cadaverina sufre una transaminación y posterior adición electrofílica intramolecular formando una base de shiff, posteriormente, debido a un equilibrio ácido-base, se produce una autocondensación entre iminas formando el intermedio **(a)**. Finalmente, **(b)** sufre condensación seguido de reducción del carbonilo proporcionando la lupinina.

Otros alcaloides quinolizidínicos como esparteína se forman gracias a condensaciones entre lupinina y otra molécula de cadaverina.

Para *L. albus* se han reportado 13 alcaloides [13], sin embargo, los alcaloides más importantes son la lupanina, esparteína e hidroxilupanina pues se encuentran presentes en la fracción más abundante en las semillas de *L. mutabilis*. Como se observó en la ilustración 2 de la biosíntesis los alcaloides quinolizidínicos como Lupanina y Esparteína se sintetizan a partir del aminoácido lisina [14] y [15]:

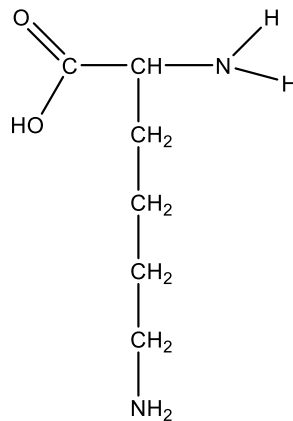


Ilustración 3. Estructura química de Lisina.

1.3 Alcaloides quinolizidínicos (AQ) de semilla de Lupino (*L. mutabilis*).

Los alcaloides quinolizidínicos (AQ) son metabolitos secundarios tóxicos que se encuentran dentro del género *Lupinus*, algunas de las plantas de este género son cultivos de leguminosas de grano comercialmente importantes, como por ejemplo, la *L. angustifolius* o Lupino de hoja estrecha (NLL), la *L. luteus* (lupino amarillo), el *L. albus* (blanco lupino) y la *L. mutabilis* (lupino perlado). A continuación, en la tabla 2 se muestra el contenido de AQ en semillas de lupino procedentes de los Andes Colombianos:

Tabla 2. Contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) de las semillas de Lupino (*L. mutabilis*). Provenientes de los Andes de Colombia. Fuente: [17]

Sustancias	RT	%Area	AQ (g/100 g semilla)
NI	8.899	1.339	0.0170
Esparteína	14.907	21.061	0.2673
NI	18.482	0.133	0.0017
NI	19.960	0.375	0.0048
4-Hidroxilupanina	25.132	2.213	0.0281
Hidroxiesparteína	26.282	0.616	0.0078
Amondendrina	27.373	0.363	0.0046
Lupanina	30.073	57.555	0.7305
1,3-hidroxilupanina	33.590	11.595	0.1472
NI	39.531	1.370	0.0174
Otros	-----	3.38	0.0429
Valores totales	-----	100	1.27

NI: no identificado

Los AQ son utilizados para la protección de las plantas contra plagas de insectos, pero la acumulación en los niveles AQ en el grano de *lupino*, hace que su consumo se vea afectado. Se debe mencionar que actualmente se desconocen los factores incidentes en la obtención de niveles de AQ que sobrepasen este umbral. Pese a esto, gran parte del trabajo inicial sobre su biosíntesis precede de la década de 1970-1980 [17], en donde se generaron estructuras químicas de AQ caracterizadas, cultivos de células de lupino y ensayos enzimáticos, empleados para identificar algunas enzimas biosintéticas e intermedios de vías.

Recientemente, se han distinguido dos genes asociados con estas enzimas, sin embargo, la vía biosintética de AQ solo permanece parcialmente aclarada: durante las últimas dos décadas se ha identificado un gran número de genes involucrados en la biosíntesis de alcaloides de estas especies, incluyendo los genes biosintéticos, factores de transcripción y transportadores junto con la identificación de enzimas e intermedios de vías, a través del desarrollo de datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabólicos.[18-19] En el caso de los AQ, se han caracterizado e identificado químicamente más de 170 estructuras, la vía biosintética de estos solo se ha dilucidado parcialmente y la información relacionada a las enzimas y genes implicados en la biosíntesis, es aun limitada.

Los alcaloides del género *Lupinus* son derivados de la quinolizidina de variable complejidad, donde la mayoría son bicíclicos o tetracíclicos. Estos se encuentran como bases terciarias y N-óxidos en concentraciones que varían desde niveles indetectables en variedades dulces genéticamente obtenidas, hasta 3.8% en algunas especies amargas de *Lupinus albus* y *Lupinus mutabilis* [17]. Algunos de los alcaloides encontrados son: lupanina, lupinina, angustifolina, esparteína, y cistisina La lupanina es uno de los alcaloides que se ha encontrado como mayoritario en la especie *L. mutabilis* y en sus diferentes ecotipos. [20]:

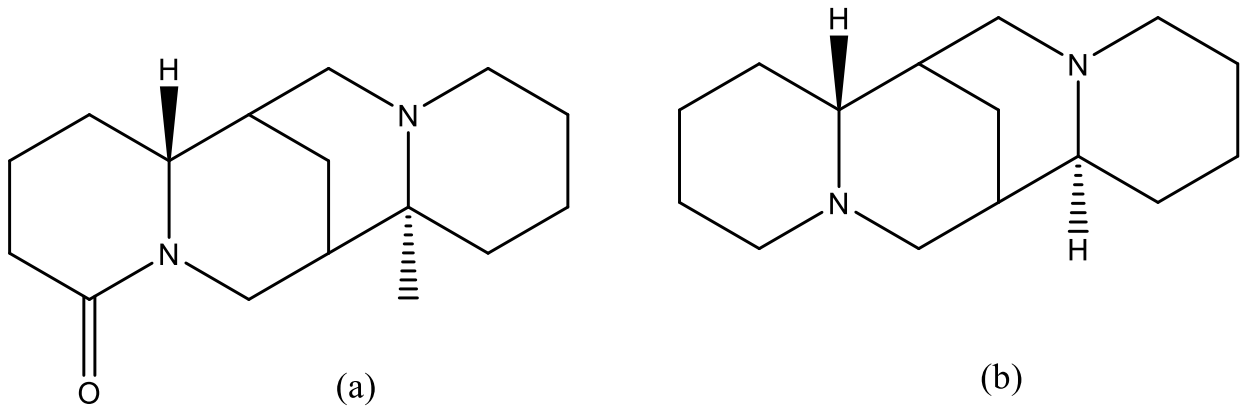


Ilustración 5. Estructuras químicas de la *Lupanina* (a) y *Esparteína* (b).

1.4 Actividad biológica de metabolitos secundarios en género *Lupinus*.

Los metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides y fenilpropanoides actúan como defensa activa para el control de plagas e insectos, matando al microorganismo patógeno o inhibiendo su reproducción: estos compuestos son los responsables de sintetizar enzimas que degradan la pared celular de los microorganismos, brindándoles la capacidad de inactivar toxinas de origen microbiano. Otros metabolitos secundarios como los flavonoides, contribuyen a destruir especies de reactivos de oxígeno, los cuales son tóxicos para células vegetales (de carácter antioxidante) [21]. A continuación, se presenta la actividad biológica relacionada de metabolitos secundarios de *L. mutabilis*, así como los metabolitos secundarios reportados en otras especies de *Lupinus*:

Tabla 3. Actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en el género *Lupinus*.

Metabolito secundario	Generalidades e importancia	Ref.
Flavonoides	Compuestos polifenólicos que comprenden quince átomos de carbono con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal: presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cascara de las frutas. Estos compuestos juegan un papel importante como metabolitos secundarios Presentando actividad antibacteriana en Bacterias gram positivas como <i>S.aureus</i> .	[22]
Saponinas y esteroides	Entre los metabolitos que han demostrado influir en la producción de metano se encuentra: saponinas, taninos, compuestos organosulfurados, aceites esenciales, ligninas, alcaloides, antioxidantes etc. Actualmente, se reportan más de 200.000 estructuras definidas de compuestos secundarios, demostrando así, la necesidad de ampliar los conocimientos e investigaciones de este gran escenario. Las saponinas y glicósidos esteroides que se encuentran en el género <i>Lupinus</i> tiene la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar una espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas.	[23] [24]
Taninos	Su actividad antimetanogénica se atribuye principalmente a los Taninos condensados los cuales disminuyen la producción de metano a través de una reducción digestiva de la fibra.	[25]
Alcaloides	Son sustancias nitrogenadas que se encuentran presentes en ciertos vegetales y constituye un estimulante natural pueden ser venenosos y en algunos casos de uso terapéutico. Los alcaloides presentes en <i>Lupinus mexicanus</i> se evaluaron como control de plagas y enfermedades comprobando que la lupanina unos de los alcaloides principales logro inhibir al 100% el crecimiento micelial de <i>r solani</i> . Otros alcaloides presentes en el género <i>lupinus</i> como la lupinina y esparteína han presentado efecto hipoglucemiante.	[26] [27]

Tabla 4. Metabolitos secundarios reportados en diferente especies de *Lupinus*.

LUPINUS (ESPECIE)-METABOLITO AISLADO	ACTIVIDAD RELACIONADA	Ref.
<i>Lupinus mutabilis</i> -taninos y triterpenos	Biotoxicidad de extractos etanólicos en larvas	[28]
<i>Lupinus ballianus</i> Cp-flavonoides	La actividad antimicrobiana del flavonoide dio positiva frente a las gram positivas (<i>Staphylococcus. Aureus</i> , <i>bacillus cereus</i> y <i>micrococcus luteus</i> .) y gram negativas.	[29]
<i>L. scericeus</i> -7-hidroxi- β -hidroxilupanina <i>L. nutalli</i> –Nutallina	Las estructuras se determinaron por métodos espectroscópicos y químicos, confirmándose por medio de cristalográficas por rayos x del mono perclorato.	[30]
<i>L. exaltatus</i> -lupanina, epiafilina, afilina, cisolupanina, Dehidro-oxoesparteina, 3 α -hidroxilupanina	Se obtuvo el perfil de alcaloides de semilla de <i>lupinus exaltatus</i> y se evaluó la actividad antifúngica del extracto alcaloideo y de la lupanina contra fitopatógenos	[31]
<i>L. luteus</i> y <i>L. Albus</i> -esparteína	Se determinó el efecto bactericida de los alcaloides de lupino contra <i>Pseudomonas syringae</i> P.V. phaseolicola; <i>Pseudomonas</i>	[32]

1.5 Resistencia bacteriana

En la actualidad, se han incrementado las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos, convirtiéndose en una problemática mundial, debido a que los tratamientos se encuentran limitados [33]: las bacterias presentan una plasticidad genética que les permite responder a una amplia gama de amenazas ambientales, incluida la presencia de moléculas de antibióticos que pueden poner en peligro su existencia; las bacterias que comparten el mismo nicho ecológico con los organismos productores de antimicrobianos, han desarrollado mecanismos antiguos para resistir el efecto de la molécula antibiótica dañina. Uno de estos mecanismos es la mutación en el gen que afectan la actividad del fármaco, en donde una vez que emerge el mutante resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y predomina las bacterias resistentes. Otro mecanismo identificado corresponde a la transferencia horizontal de genes, es decir, la adquisición de material de ADN extraño a través de HTG, el cual es uno de los impulsores más importantes de la evolución bacteriana y con frecuencia, el responsable del desarrollo de resistencia de la bacteria. [34]

Los mecanismos enzimáticos de inactivación son la principal causa de resistencia en antibióticos como los betalactámicos, glicopeptidos, aminoglucosidos. Por ejemplo, la resistencia a los betalactámicos es causada por la destrucción enzimática de los antibióticos, la modificación de sus sitios de acción o por la disminución de la capacitación intracelular del fármaco, convirtiéndolos en derivados inactivos. Todas las estrategias de resistencia bacteriana son codificadas por uno o más genes, los cuales son compartidos con facilidad entre cepas de las mismas especies, especies de géneros diferentes e incluso entre bacterias emparentadas de manera más lejana [35]. La resistencia bacteriana a los antibióticos corresponde a una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. La velocidad con la que surge y se extiende en poblaciones microbianas, esta con frecuencia determinada por la cantidad de antibióticos concretos en un ambiente dado [46].

Los microorganismos enteropatógenos como *Escherichia coli* (multiresistente), *Staphylococcus aureus* (resistente a metilina), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* (resistentes a la vancomicina), son los principales responsables de infecciones intrahospitalarias, en donde gracias al uso indiscriminado de fármacos, se producen mutaciones en estas bacterias, haciéndolas resistentes a antibióticos capaces de generar consecuencias como discapacidad transitoria y permanente y/o mortalidad evitable. Los pacientes con este tipo de infecciones presentan desenlaces negativos y considerables en su salud y de igual forma demandan el consumo de una mayor cantidad de recursos sanitarios para su tratamiento [37], haciendo que estas bacterias paulatinamente sean más difíciles de controlar y combatir.

Múltiples investigaciones han demostrado que la *Lupinus mutabilis* presenta una amplia diversidad genética y adaptación a suelos, precipitación, temperatura, altitud y periodo vegetativo, lo que a su vez ocasiona que sus valores proteicos y actividad antibacteriana pueda variar de acuerdo a las condiciones de cultivo y suelos en los que la *Lupinus mutabilis* sea cultivada. Así mismo, varía en precocidad, contenido en proteínas, aceites, alcaloides, rendimiento y tolerancia a plagas y enfermedades [38]. Los alcaloides del género *Lupinus* han presentado actividad antimicrobiana, según estudios previos [39], en donde dependiendo de las condiciones climáticas (como en zonas ecuatoriales), es posible evidenciar el incremento en su contenido de alcaloides.

Debido a lo anterior, este proyecto de investigación tratara de dar solución a cuestionamientos como ¿los extractos de alcaloides extraídos de las semillas de *Lupinus mutabilis* cultivadas en la Paz y en Túlcan presentarán una actividad antibacteriana diferente? Buscando refutar o verificar los cuestionamientos presentados anteriormente; de igual forma se tratara de identificar ¿cuáles son los alcaloides mayoritarios en las semillas de *Lupinus mutabilis* cultivadas en la Paz?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Extraer e identificar los alcaloides presentes en semillas de *Lupinus mutabilis* provenientes del corregimiento de la Paz, Valle del Cauca y evaluar su actividad antibacteriana.

2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la composición proximal de las semillas de *L. mutabilis* (cenizas, humedad, lípidos, proteínas y fibra cruda).
- Elucidar por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), la estructura de los alcaloides extraídos.
- Determinar la actividad antibacteriana de extractos alcaloidales contra bacterias Gram positivas y negativas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Reactivos

Los reactivos comerciales se adquirieron de Sigma- Aldrich Chemical Co. y Alfa Aesar y se utilizaron en su forma comercial sin purificación (Ácido tricloroacético , sulfato de Potasio, Óxido de mercurio, ácido Sulfúrico, diclorometano, nitrato de Bismuto pentahidratado, yoduro de potasio, cloruro de hierro, hidróxido de sodio, ácido Clorhídrico GR (Merck). Los solventes utilizados para la extracción y la separación cromatográfica (TLC y CC), hexano, acetato de etilo, acetona, metanol, diclorometano, cloroformo grado HPLC (Merck).

3.2 Metodología

3.3 Obtención y adecuación del material vegetal

Las semillas de *Lupinus mutabilis* utilizadas en este proyecto se obtuvieron de cultivos establecidos en la ciudad de Tulcán (Ecuador) y se cultivaron en el corregimiento de la Paz, Valle del Cauca (Colombia), se determinó la identidad de la especie utilizando el herbario Jardín Botánico José Celestino Mutis, código de barras :JBB15706., Número de catálogo 167114 recolectando 1 kg de cada muestra. Las semillas fueron llevadas a un secado previo a 65°C durante 12 horas para luego ser molidas y secadas a 103 °C durante 6 horas. Al finalizar, la harina tornó un color café opaco con olor característico, fue almacenada en frascos ámbar para evitar la presencia de humedad y descomposición.

3.4 Análisis Proximal

3.4.1 Humedad

En la determinación de la humedad se realizó un secado previo de las semillas. El procedimiento se realizó por duplicado, inicialmente, se separó 10 g de semillas y se almacenó en lugar seco y caliente durante toda la noche. Luego se molió y secó a 130 °C durante 1 h, luego se llevó a desecador por 45 minutos, tomando un peso inicial. De esta muestra, se depositó en un crisol 5.0 g y se calentó en horno a 103 °C durante 12 horas, se lleva a temperatura ambiente en desecador, tomando el peso final.

3.4.2 Cenizas

El procedimiento para la determinación de cenizas consistió en Pesar en un crisol 5 g de muestra, luego se deshidrato en el horno a 105°C durante 8 h, posteriormente fue llevado el crisol a temperatura ambiente en el desecador. Finalmente se calcinó en mufla a 500 - 550°C, hasta obtener cenizas blancas o grises. Llevando el crisol a temperatura ambiente en el desecador y se pesó.

3.4.3 Lípidos

La determinación de lípidos consistió en llevar la unidad de extracción Soxhlet al horno a 103 °C, enfriarla en el desecador por 45 minutos. Enseguida, se pesaron 5 g de muestra seca en un dedal de extracción (usando pinzas), depositándolo en la unidad de extracción Soxhlet y adicionando éter de petróleo hasta 2/3 del volumen total. Se Conectó el sistema y se llevó a ebullición. Luego se ajustó el calentamiento a 10 reflujos / h por 4 horas. Se rotoevaporó el éter de petróleo, se vertió en un matraz seco y pesado, secando en horno durante 1.5 horas para eliminar totalmente el éter. Finalmente se llevó el matraz a un desecador y luego fue pesado.

3.4.4 Fibra cruda

En la determinación de la fibra cruda se tomó de 2 a 3 mg de muestra desengrasada y seca, se transfirió a un matraz y se vertió 200 mL de ácido sulfúrico 0.255 N en ebullición, agitando suavemente. Posteriormente se Colocó el condensador y se llevó a ebullición en un minuto; se adiciono antiespumante. Luego se dejó hervir exactamente por 30 min, manteniendo constante el volumen con agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes. Se Instaló el embudo Buchner con el papel filtro y se precalentó con agua hirviendo. Simultáneamente y al término del tiempo de ebullición, se retiró el matraz, dejando reposar por un minuto y se filtró cuidadosamente usando succión; la filtración se realizó en menos de 10 min. Se Lavó el papel filtro con agua hirviendo. Se transfirió el residuo al matraz con ayuda de un frasco lavador conteniendo 200 mL de solución de NaOH en ebullición y se dejó hervir por 30 min como se indicó anteriormente. Posteriormente se precalentó el crisol de filtración con agua hirviendo y filtrando cuidadosamente después de dejar reposar el hidrolizado por 1 min. Se Lavó el residuo con agua hirviendo, con la solución de HCl y nuevamente con agua hirviendo, para terminar con tres lavados con éter de petróleo. se Colocó el crisol en el horno a 105 °C por 12 horas y se enfrió en el desecador. Finalmente se pesó rápidamente los crisoles con el residuo (sin manipular) y se llevó a la mufla a 550 °C por 3 horas, deajo enfriar en un desecador y se pesó nuevamente.

3.4.5 Proteína

En la determinación de proteínas se procedió pesando 1 g de harina y se depositó en el matraz Kjeldahl; se agregó 10 g de sulfato de potasio, 0.7 g de óxido de mercurio y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se colocó el matraz en el digestor en un ángulo inclinado y se calentó a ebullición hasta que la solución se vio clara, se continuó calentando por media hora más. Se adiciono un poco de parafina. Luego se deja enfriar; durante el enfriamiento se adiciono poco a poco alrededor de 90 mL de agua destilada y desionizada. Ya frío se agregó 25 mL de solución de sulfato de sodio y se mezcló. Seguido de esto se agregó una perla de ebullición y 80 mL de la solución de hidróxido de sodio al 40% manteniendo inclinado el matraz. Formando dos capas, se conectó rápidamente el matraz a la unidad de destilación, se calentó y se recogió 50 mL del destilado conteniendo el amonio en 50 mL de solución indicadora. Al terminar de destilar, se removió el matraz receptor, se realizó un lavado a la punta del condensador y se tituló con la solución estándar de ácido clorhídrico.[40]

3.5 Tamizaje Fitoquímico

En la extracción se obtuvieron dos fases (orgánica y acuosa), en la fase orgánica se llevó a cabo la prueba para alcaloides y esteroides, para la segunda fase se realizó la prueba de flavonoides (ensayo shinoda) adicionando magnesio seguido de ácido clorhídrico concentrado, posterior a esto la prueba para taninos(cloruro férrico) en la cual se adiciono una disolución al 1% de cloruro de hierro (III) y se neutralizo con hidróxido de sodio hasta obtener un precipitado de FeO (OH); esta sustancia se disolvió en agua y se añadió una

disolución neutra de cloruro, hasta formar un complejo coloreado transitorio o permanente. También se hizo el uso de la prueba para saponinas (ensayo de espuma) en donde se verificó la presencia de espuma al agitar la solución acuosa, con esto se dejó en evidencia la reacción de selivoflo y la prueba para triterpenos (lieberman-bouchard)[42], en donde fue necesario la disolución de cristales de colesterol en cloroformo seco; la adición de anhídrido acético y de ácido sulfúrico los cuales fueron mezclados para producir una reacción y permitir la medición de la concentración de colesterol mediante espectrofotometría.

3.6 Cromatografía Preparativa

El análisis por placa de capa preparativa (PLC) se realizó aplicando una alícuota de 2 µg de extracto crudo, en 5 mL de cloroformo en una placa de vidrio (20 x 20 cm) con una fase estacionaria de sílica gel 60. Para la fase móvil cloroformo, se utilizó metanol en una proporción 1:1, el cual fue revelado con el reactivo de Dragendorff. Cada posible alcaloide fue recolectado y transferido a cada fracción a un beaker, al cual se le agregó cloroformo para realizar su extracción. Seguidamente, la **muestra** fue llevada a ultrasonido para separar la sílica, luego se filtró y evaporó el solvente a sequedad y así se obtuvo los extractos deseados. Se debe mencionar que por CCD se compararon las fracciones frente a la muestra madre (M) con una fase móvil de cloroformo metanol 1:1 para confirmar el aislamiento de los compuestos.

3.7 Cromatografía en columna (CC)

Antes de realizar CC del extracto crudo alcaloidal, esta muestra fue tratada con cartucho RP-18 para eliminar posibles azúcares. Seguidamente, se llevó a roto evaporador para eliminar el cloroformo, se liofilizó la muestra. Así mismo, para la realización de la CC, se usó una columna de vidrio (diámetro interno de 6 cm y altura de 16 cm), empaquetada con sílica gel en fase normal. Para iniciar la Cromatografía, la muestra se eluyó inicialmente con 100% metanol, recolectando en tubos de ensayo la primera fracción de 1 a 11 (**fracción a**); a continuación, se siguió aumentando la polaridad de la fase móvil en un gradiente de metanol-cloroformo en proporción 1:1, y recolectando los tubos 12 al 35 (**fracción b**). Inicialmente, se eluyó con cloroformo al 100%, recogiendo los tubos 36 al 60 (**fracción c**). Estas fracciones fueron monitoreadas por cromatografía de capa delgada, escogiendo los tubos con números pares (del 2 al 36) y determinando así los posibles alcaloides con un RF similar, para luego ser recolectado en un balón. Se eliminó el solvente con un rotaevaporador, se liofilizó y se rotuló la muestra obtenida como JML5 y fue enviada a cromatografía de gases acoplado a masas.



Ilustración 6. Cromatografía en columna realizada para extracto alcaloidal.

3.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases se realizó en una columna rtx-5MS de uso general (30 m de largo, diámetro 0,25 mm, 0.25 μ m de recubrimiento), la cual fue instalada en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa marca SHIMADZU, modelo QP2010, operado con el software GC-MS solution y la biblioteca de espectros willey v8,0 y la NIST 11, con 490000 espectros aproximadamente. [43]

Tabla 5. condiciones de estudio para el análisis por GC- masas

Fracción	Temperatura Inyección °C	Modo de inyección	Temperatura Método	Flujo mL/min	Detector (kV)	Tiempo	Velocidad scan	Intervalo m/z	Gas de arrastre
Extracto	220	Split	I(1min) =45 F(14min) =280	0.99	1.36- 0.16	4.5 a 58.7	16666	35-800	Nitrógeno

3.9 Actividad Antibacteriana: Método de Difusión en Disco (Bauer-Kirby).

La actividad antibacteriana se realizó en placas Petri con agar Muller-Hilton, en donde se sembraron cepas diluidas en 5 mL de caldo nutritivo. Posteriormente, se transfirió 1 μ L realizando sembrado por extensión en la respectiva caja Petri. Al finalizar, sobre el agar se ubicaron cuatro discos de papel filtro estériles (whatman) impregnados con 1 mL de los extractos obtenidos, en el centro de la caja se ubico el antibiótico Cefotaxima a modo de prueba de control. las placas se incubaron a 37°C por 24 horas para generar el crecimiento de las bacterias. Estas pruebas se efectuaron por triplicado y posteriormente, se midió el halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos [44].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis proximal

En las semillas de *Lupinus mutabilis* se encontró un alto contenido de proteínas (45.50%) y un considerable contenido de lípidos (16.38%) y fibra cruda (10.35%), dejando en evidencia su alto valor nutricional. Adicionalmente, se encontró un porcentaje de humedad del 8.31% y cenizas correspondientes al 4.05%, porcentaje correspondiente a residuos de materia inorgánica presentes en el alimento una vez esta es calcinada (Ver tabla 6), estos valores al ser comparados con la literatura, se evidenció un valor proteico de las semillas de *L. mutabilis* equivalente al 44.86%. [18] El porcentaje de lípidos hallado difiere del análisis proximal de las semillas de otros estudios realizados, encontrándose valores de 13.91%, valor ocasionado por factores como la variedad de lupinus analizada y/o las condiciones de cultivo de la planta (clima, suelo, estrés, etc.).

Tabla 6. Análisis proximal (composición química de semillas).

ANÁLISIS	SEMILLA <i>Lupinus mutabilis</i> g/100g
Semilla	100
Humedad	8.31
Ceniza	4.05
Lípidos	16.38

Fibra Cruda	10.35
Proteína	45.50

Con estos resultados se pudo evidenciar que las semillas de *L. mutabilis* y sus componentes presentan un porcentaje proteico y de lípidos los cuales los hacen apto el consumo de esta semillas pese a lo expuesto por autores como Zamora y E. Ortega [6]. Con lo anterior, el uso de *L. mutabilis* puede considerarse como una alternativa nutricional, haciendo que esta pueda tener aplicaciones que traspasen el uso antibacterial, insecticida y control de plagas.

4.2 Monitoreo y separación por cromatografía

Se determinó la presencia de alcaloides en la semilla de *L. mutabilis* por medio de una cromatografía de capa delgada (CCD), esto se confirmó al generar un color naranja en la muestra, indicador positivo con el revelador de Dragendorff, específico para alcaloides. Para ello, el extracto alcaloidal (0.5g) se dividió en dos partes, una parte se utilizó en CCD y se reveló con Dragendorff. Como fase móvil se utilizaron solventes con polaridades diferentes (cloroformo, metanol, acetona, éter, acetato de etilo), en proporciones diferentes, con el fin de encontrar la fase móvil que mostrara la mejor separación de los compuestos.

La CCD obtenida con la fase móvil Cloroformo:metanol 1:1 (ver Ilustración 7) fue escogida como fase móvil para realizar cromatografía en columna y aislar los alcaloides mayoritarios

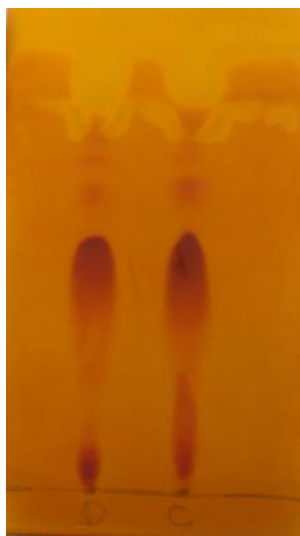


Ilustración 7. CCD Color de extracto alcaloidal. Fase estacionaria Silica gel, fase móvil cloroformo:metanol 1:1. Reactivo revelador: Dragendorff.

A continuación, se muestra la reacción del reactivo de Dragendorff con alcaloides:

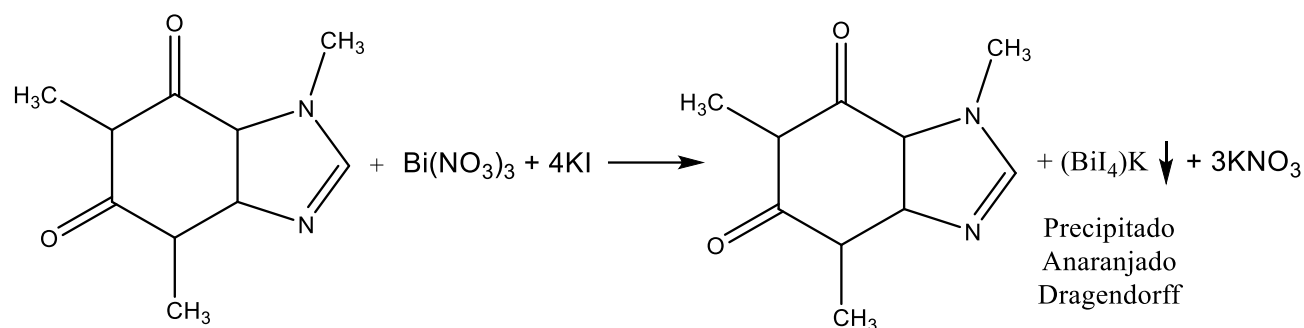


Ilustración 8. Reacción del reactivo Dragendorff con alcaloides.

4.3 Tamizaje fitoquímico

La característica química y afinidad que poseen los solventes con los diferentes grupos (metabolitos secundarios), permitieron determinar su presencia o ausencia en la muestra a través de un análisis a las dos fases del extracto: en la fase orgánica se realizó la prueba con los reactivos Dragendorff y Wagner para determinar la presencia de alcaloides [19]; esta prueba arrojó un resultado positivo al obtenerse un color anaranjado con el reactivo de Dragendorff ver reacción en la ilustración 8. En la prueba de Wagner se observó un color marrón indicando nuevamente un resultado positivo, mientras que para el extracto orgánico se realizó la prueba Salkowski, obteniendo una coloración roja: positivo para esteroides.

En la fase acuosa se realizó la prueba Shinoda para flavonoides, obteniendo un color verde indicando como positiva la prueba. Posteriormente, con el extracto acuoso, se realizó la prueba de espuma para saponinas, generándose una espuma estable y abundante, indicadora de positivo para saponinas. En la prueba de Liebermann-Bouchard para triterpenos y la prueba para taninos condensados, no se presentó reacción, traduciéndose como resultados negativos para ambas pruebas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7:

Tabla 7. Tamizaje fitoquímico de semillas de *L. mutabilis*.

Metabolito	Prueba Presuntiva	Resultado
Alcaloides	Dragendorff, Wagner	+++
Flavonoides	Shinoda	+
Esteroides	Salkowski	++
Triterpenos	Bouchard	---
Taninos	Taninos Condensados	---
Saponinas	Prueba de la Espuma	+++

* (+) Presencia débil, (++) presencia moderada, (+++) presencia intensa, (---) ausencia.

4.4 Fraccionamiento de extracto alcaloidal por cromatografía

Se realizó la extracción de los alcaloides presentes en las semillas de *L. mutabilis* según la metodología MUZQUIZ, utilizando dos solventes: diclorometano y cloroformo, para determinar cuál era más eficiente en la extracción. Como resultado final se determinaron los porcentajes de rendimiento según el solvente utilizado.

Tabla 8. Rendimiento de extracto en diferente solvente

Extracción	Con cloroformo	Con diclorometano
Peso balón limpio	58.36 g	58.36 g
Peso balón + extracto	58.39 g	58.38 g
Peso de extracto	0.029 g	0.024 g
Peso muestra	2.0 g	2.0 g
% Rendimiento	1.5%	1.2%

Se determinó el porcentaje de rendimiento de los dos métodos, siendo más eficiente la extracción con cloroformo como solvente ya que este tiene mayor afinidad polar para extraer los alcaloides.

El análisis por cromatografía de capa delgada preparativa se realizó aplicando alícuota de 2 µg de extracto crudo en 5 mL de cloroformo en una placa de vidrio 20 x 20 cm con Silica gel 60, y fase móvil cloroformo:metanol 1:1, y se reveló una parte con Reactivo Dragendorff (ver ilustración 9 a) con el fin de monitorear la separación. Luego, las fracciones fueron recolectadas con ayuda de una espátula y diluidas con cloroformo. Cada fracción por separado fue llevada a ultrasonido para garantizar la extracción total, posteriormente, se filtró y se evaporó el solvente a sequedad, de esta manera se obtuvieron las fracciones.

Las fracciones obtenidas se revelaron en una CCD frente a la muestra madre, observando cuatro (4) posibles alcaloides, de los cuales se eligió el número 2 como posible fracción alcaloidal más pura y de mayor abundancia para realizar la CC (ver ilustración 9 b).

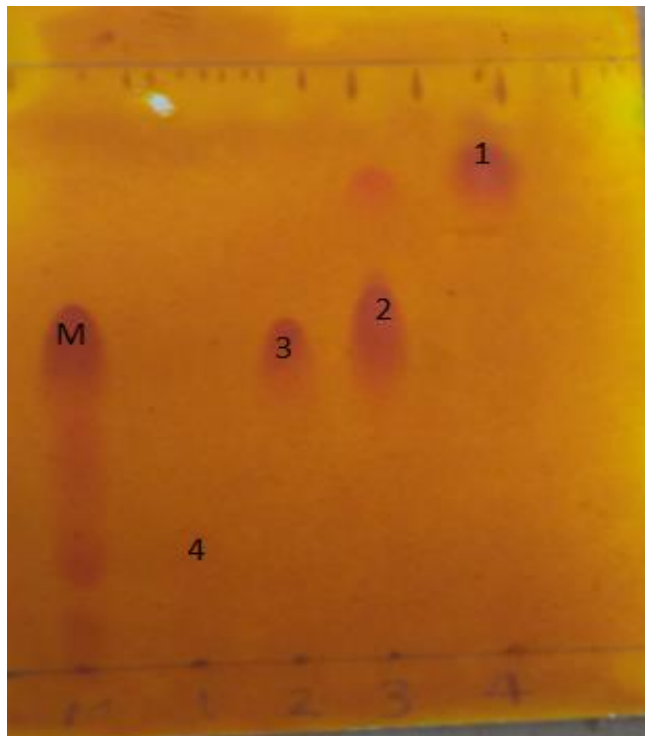


Ilustración 9. CCD de fracciones obtenidas por CCD para posterior fraccionamiento.

4.5 Cromatografía en Columna

La fracción 2 elegida anteriormente (sección 4.4) fue tratada a través de cartuchos RP-18 con el objetivo de eliminar la presencia de azúcares. La extracción en fase sólida se realizó usando metanol y acetona como eluyentes, después de eliminar el agua y los azúcares de la muestra, finalmente, la muestra fue concentrada y liofilizada obteniendo 4.608 g de muestra seca. Seguidamente, la masa resultante fue adicionada a una columna de vidrio (diámetro interno: 6 cm, altura: 16 cm) empaquetada con Silica gel.

La CC se eluyó inicialmente con 100% cloroformo fracción A (1 a 11) y aumentado la polaridad se eluyó con metanol: cloroformo 1:1 (fracción B 12 a 35) finalmente se eluyó la última fracción con metanol 100% (fracción C 36 a 60), cada uno de los tubos que se recolectaron fueron monitoreados por CCD, escogiendo los tubos con números pares (2 a 36), determinando así los posibles alcaloides con un Rf similar, posterior a esto se recolectó los tubos con mayor similitud en un balón y se secaron con rotaevaporación y liofilización.

En el monitoreo de las fracciones obtenidas de la muestra 2 (2p) por CCD (Ilustración 10), se observó una separación regular debido a que las corridas fueron muy anchas y no permitieron diferenciar los Rf entre los compuestos presentes. Debido a lo anterior, se precedió a realizar una segunda columna (Ilustración 11), en donde la separación obtenida fue mucho mejor comparada a la anterior, determinando así, la recolección a partir del tubo 5 con extracto de igual RF para eliminar el solvente (cloroformo).

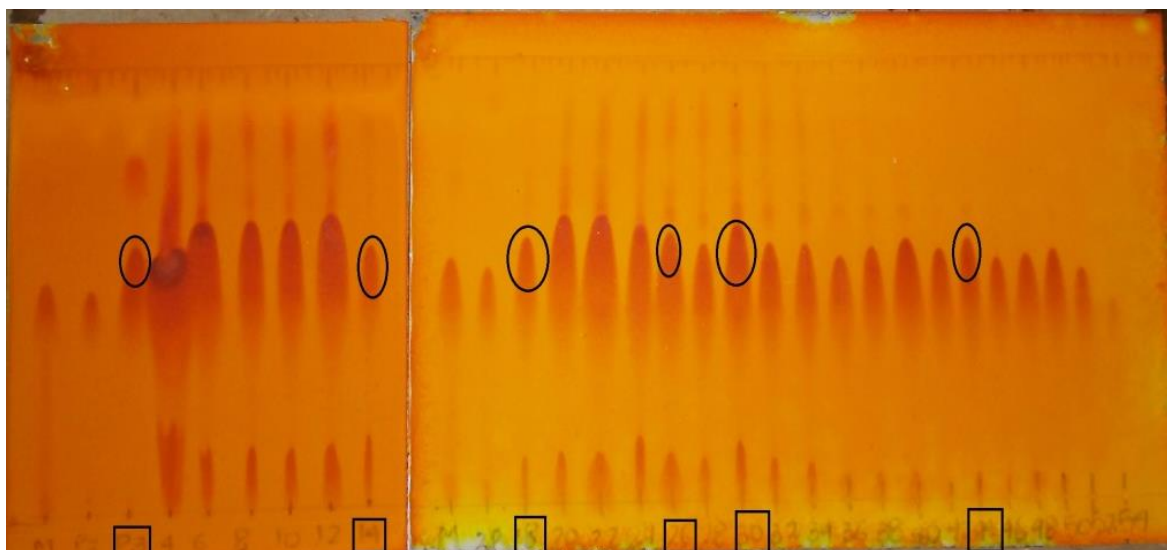


Ilustración 10. CCD de fracciones obtenidas por CCD de fracción 2.

Debido a que el fraccionamiento por CC no mostró una buena separación por la complejidad de la muestra, se analizó el extracto alcaloidal por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

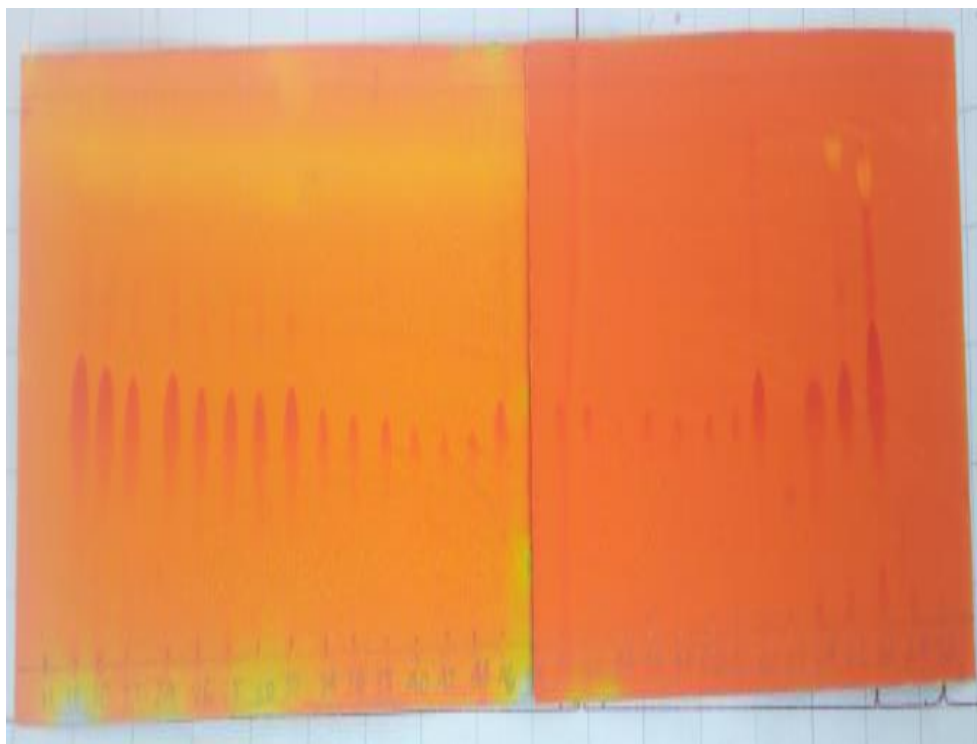


Ilustración 11. CCD de fracciones obtenidas por columna 2

Tabla 9. RF de las fracciones con mayor similitud

Fase móvil	Fracción A RF	Fracción B RF	Fracción c RF
Cloroformo 100%	0,48	0,42	0,48
metanol 100%	0,51	0,36	0,54
Cloroformo- metanol 50-50%	0,54	0,38	0,50

4.6 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Los resultados por CG-MS mostraron el perfil de alcaloides presentes en *L. mutabilis*, observándose tres (3) alcaloides quinolizidinicos con una notable abundancia:

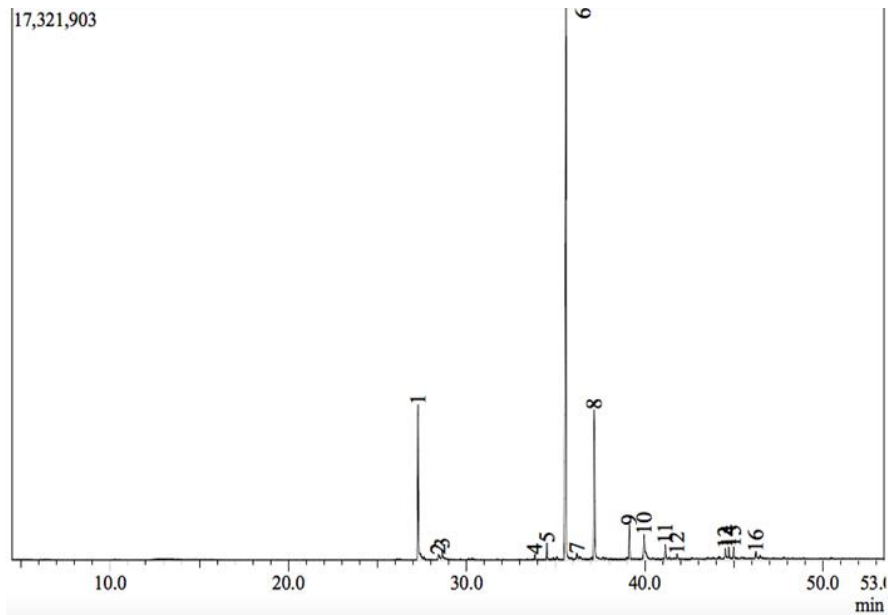


Ilustración 12. Perfil cromatográfico de alcaloides quinolizidinicos en semillas *Lupinus mutabilis*. Picos mas abundantes 1, 6 y 8.

El espectro de masas de cada pico fue comparado con los espectros obtenidos de la biblioteca NIST y Wiley. Usando los picos de ion molecular, el patrón de fragmentación y el porcentaje de similitud se identificó la esparteína como el pico 1 y Lupanina como el pico 6, donde se presenta mayor abundancia. Adicionalmente, se destaca la presencia de 3β-hidroxilupanina en el pico 8. con picos de retención de 27.27, 35.57 y 37.17 min

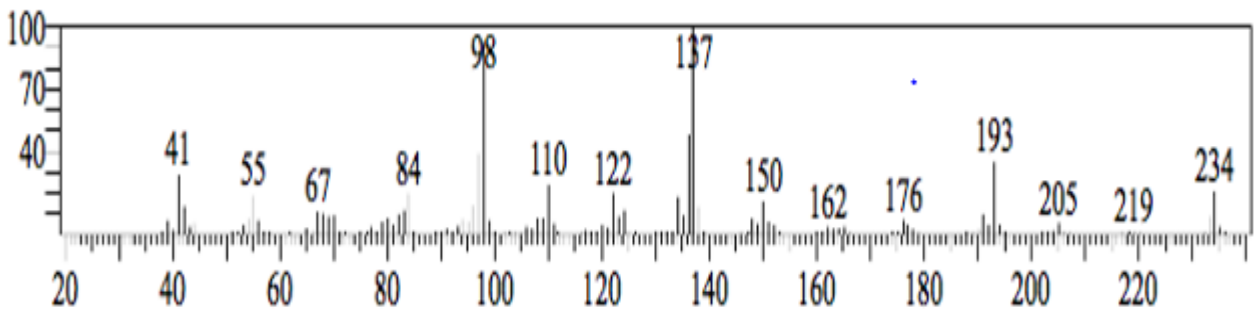


Ilustración13. Espectro de masas de pico 1, *Esparteína*.

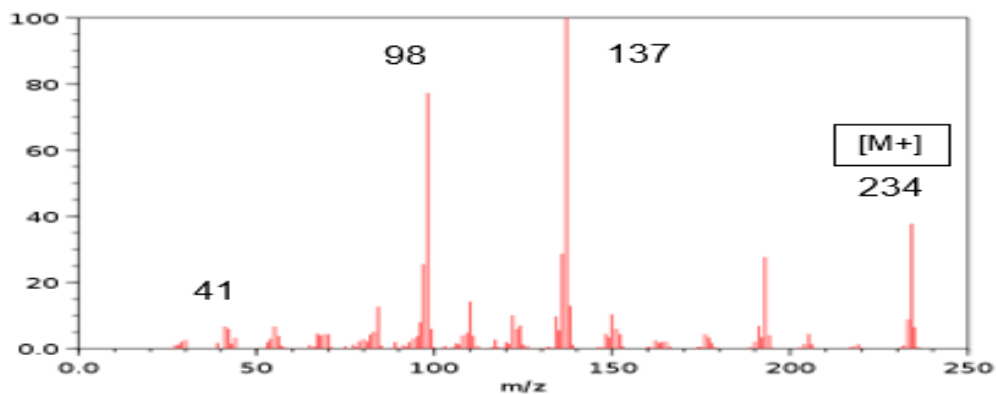


Ilustración 14. Espectro de masa obtenida de la biblioteca NIST de la *esparteína*.

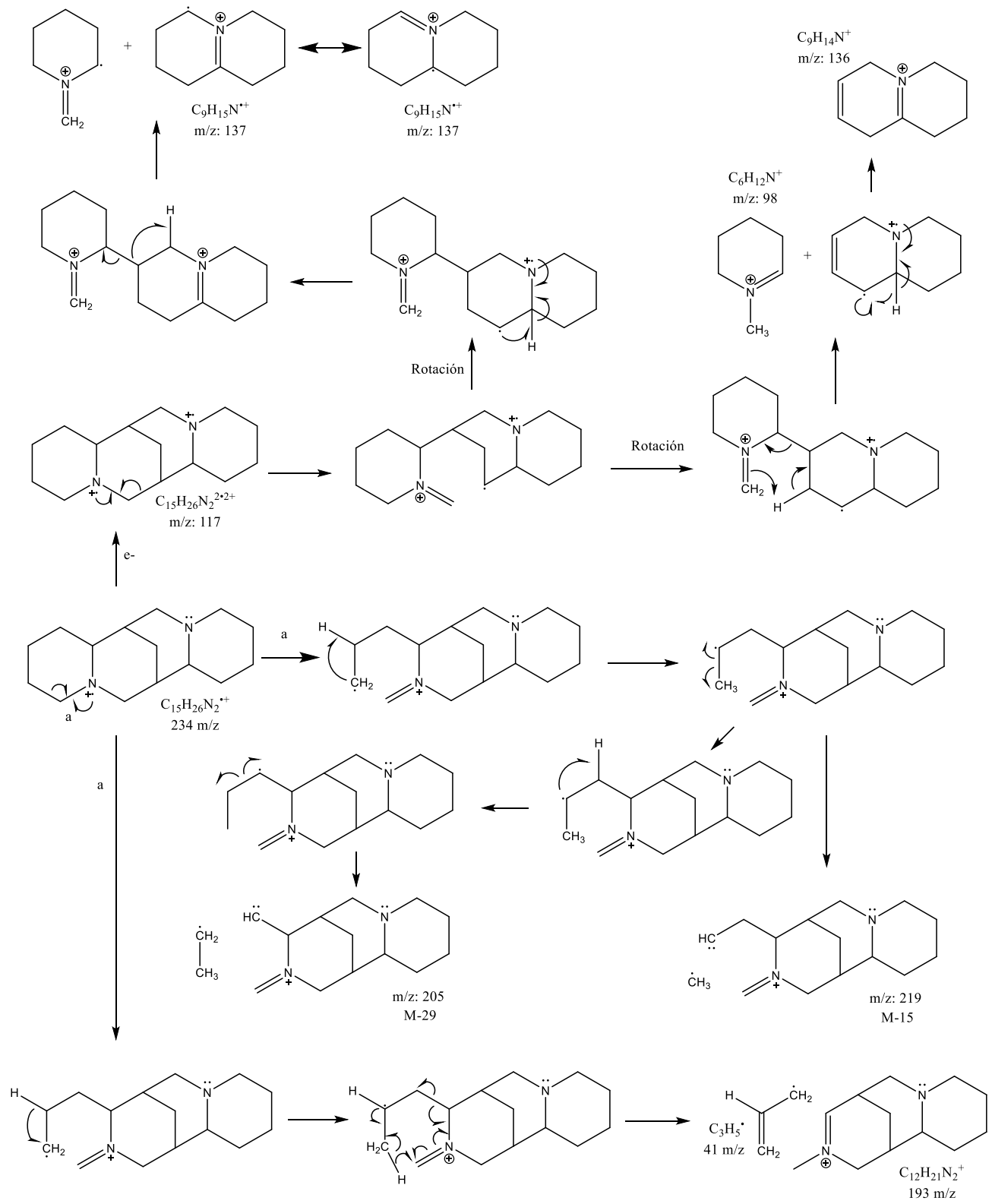


Ilustración 15. Fragmentación de la *sparteína*. Fuente: Elaboración propia

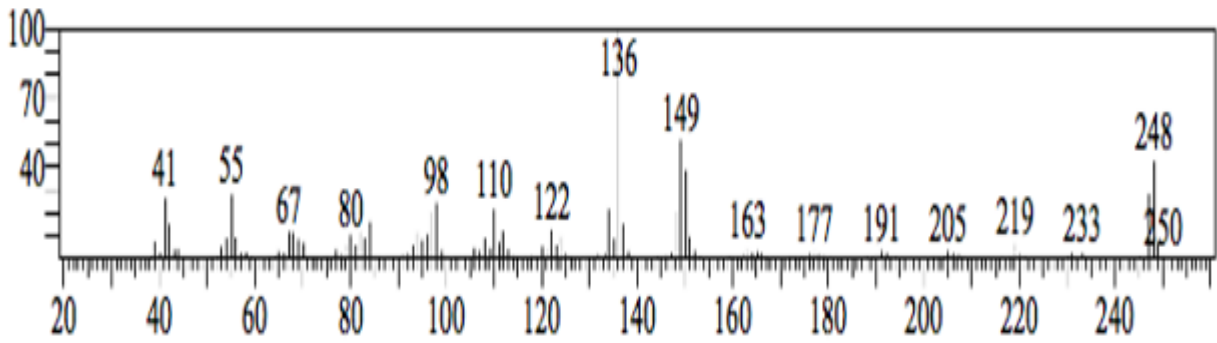


Ilustración 16. Espectro de masas de pico 6, *Lupanina*.

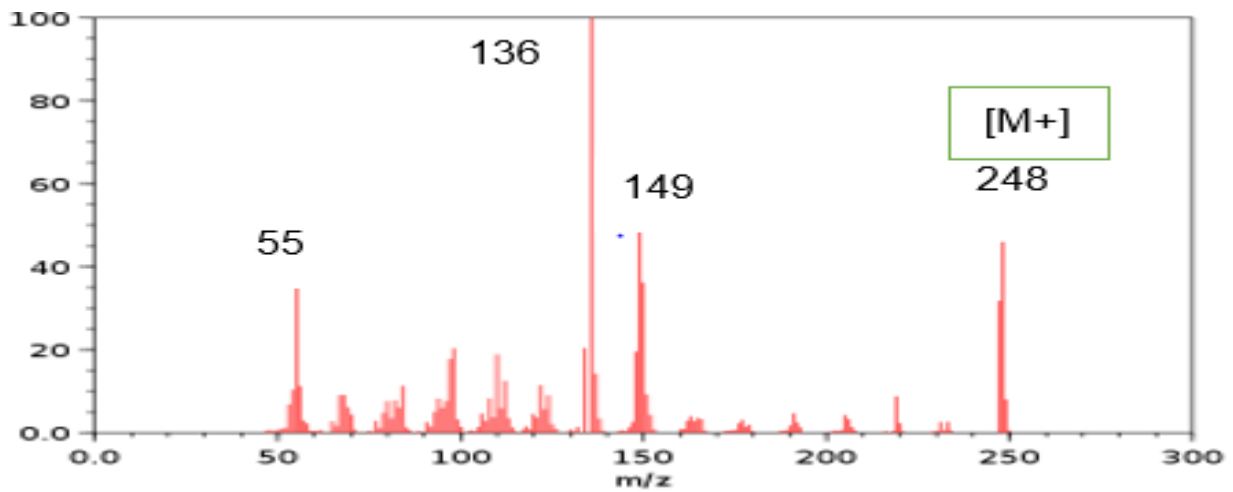


Ilustración 17. Espectros de masas obtenido de la biblioteca NIST de *Lupanina*.

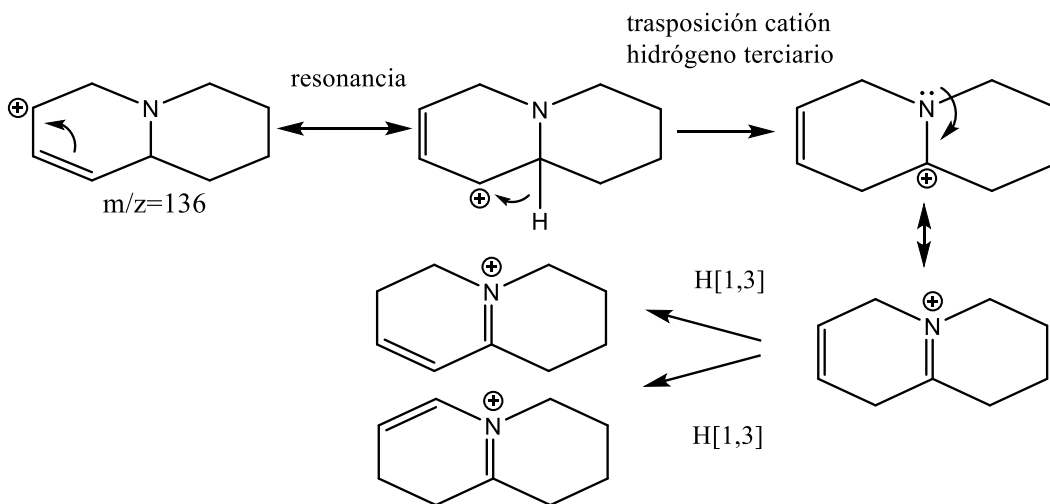


Ilustración 18. Resonancia del pico base de los alcaloides quinolizidinicos del *Lupinus*. Fuente: Elaboración propia.

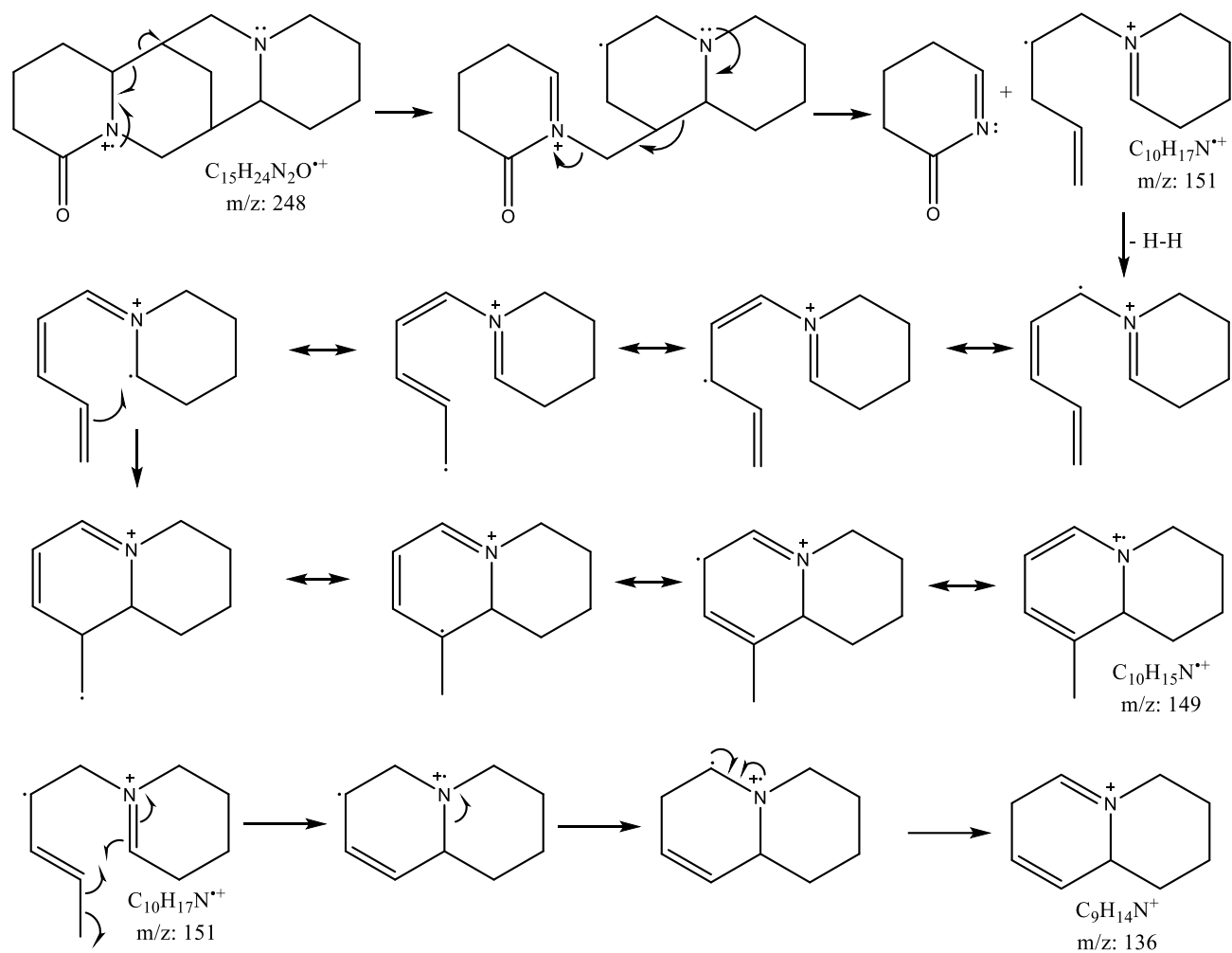


Ilustración 19. Fragmentación de *lupanina*. Fuente: Elaboración propia

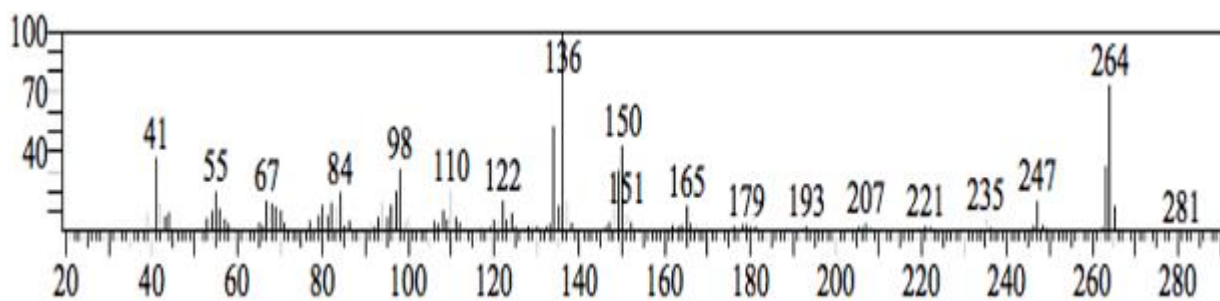


Ilustración 20. Espectro de masas pico 8, 3β -hidroxilupanina:

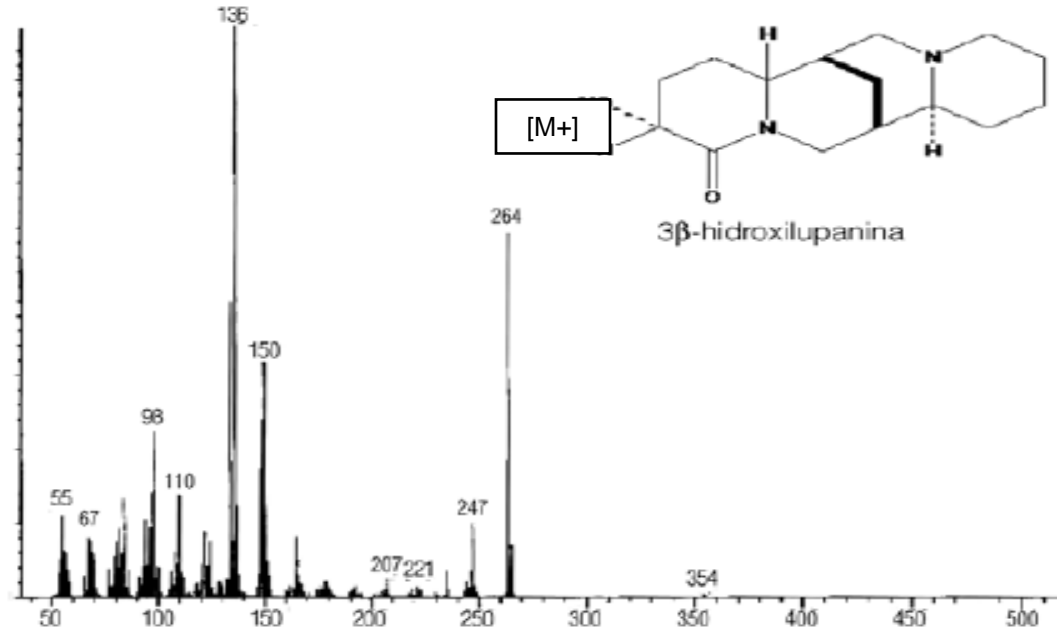


Ilustración 21. Espectro de masas obtenido del artículo F. Zamora.,P:Garcia.,2007 concentración de alcaloides de *Lupinus exaltatus* para la 3β-hidroxilupanina. [31]

En el perfil de los alcaloides obtenidos por cromatografía de gases de los extractos, se verificó el ión molecular ($[M^+]$) el cual presenta la misma masa de la molécula en interés, donde se obtuvieron tres alcaloides mayoritarios los cuales fueron: 234 m/z para la esparteína, 248 m/z lupanina y 264 m/z 3β-hidroxilupanina. Se identificaron los picos más importantes de cada cromatograma: 193, 137, 110 y 98 m/z para la esparteína, 149,136 m/z para la lupanina y 150,136 m/z en 3β-hidroxilupanina: cada uno de estos picos corresponden a pesos moleculares, en donde las moléculas se han fragmentado y son detectados por el instrumento.

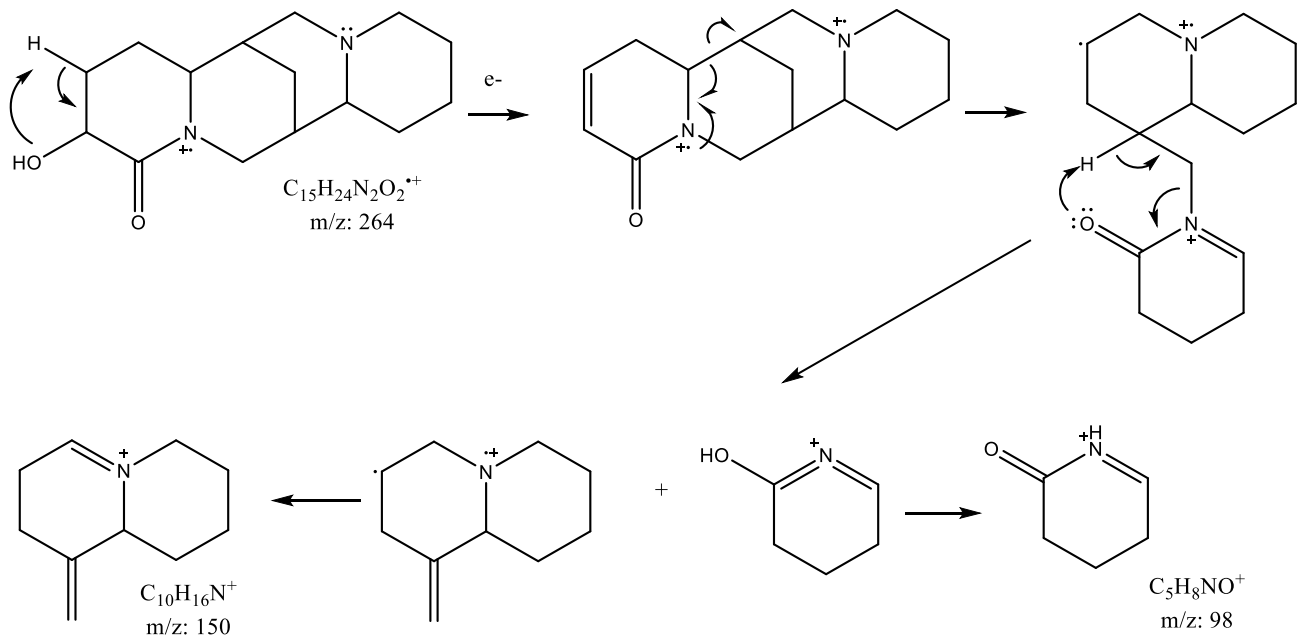


Ilustración 22 desfragmentación de la 3β-hidroxilupanina. Fuente: Elaboración propia

Para esto fue necesario elucidar cada una de las moléculas arrojadas por cada pico e iniciar el desfragmentado de cada una de las moléculas completas (esparteína, lupanina y 3 β -hidroxilupanina); estas fueron identificadas mediante desfragmentación homolítica, dando como resultado las moléculas que se muestran en las ilustraciones 13, 16 y 20. Gracias a esto se determinaron los picos base donde se encuentra la molécula más estable debido a su resonancia en donde hay moléculas que presentan un hidrogeno terciario dando el efecto trasposición catión siendo la más estable.

Según estudios previos, los alcaloides quinolizidinicos del genero *lupinus* como (esparteína, lupanina y 3 β -hidroxilupanina) presentan actividad antibacteriana. Así como el contenido de estos alcaloides incrementa por las condiciones climáticas en que se encuentre, ya que estos cumplen la función de defender la planta de amenazas como plagas, animales y microorganismos patógenos. [31-32].

4.7 Actividad antibacteriana

Según los reportes [31-32], las semillas presentan mayor contenido de alcaloides dependiendo de las condiciones climáticas. Se obtuvieron dos extractos alcaloidales, el extracto A con semillas cultivadas en Tulcán y el extracto B con semillas cultivadas en la Paz, de esta manera se evaluó la actividad antibacteriana frente a diferentes bacterias gram positivas y gram negativas. Se usaron cepas certificadas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pertenecientes al cepario de microorganismo del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad ICESI. Todas las cepas fueron reconstituidas en el medio que fue suministrado con la cepa y luego se sembraron en agar muller-hilton incubándose a 37°C por 24 horas, se usó la técnica Kirby-Bauer o también conocida como difusión en disco, que permitió determinar de forma cualitativa la actividad de los alcaloides presente en los extractos.

Tabla 10. Resultados obtenidos de actividad antibacteriana por el metodo de difusión.

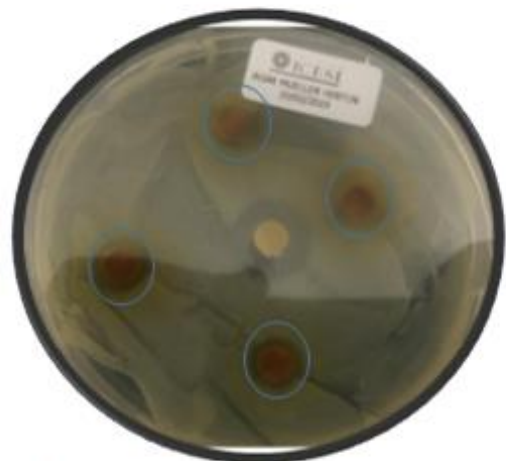
Microorganismo	Extracto	INHIBICIÓN		Antibiótico Control
		(+)/(-)	Tamaño del halo promedio	
<i>Pseudomonas auroginosa</i> ATCC 27853	Extracto A	(-)		Cefotaxima 1.2 cm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		(-)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		(+)	2.3 cm	
<i>Pseudomonas auroginosa</i> ATCC 27853	Extracto B	(-)		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		(-)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		(+)	1.2 cm	

Extracto A: extracto de semillas cultivadas en Valle del Cauca; Extracto B: extracto de semillas cultivadas en Ecuador.
Fuente: Elaboración Propia.

El extracto A (extracto de alcaloides) de la semilla *L. mutabilis* cultivadas en el corregimiento de la Paz, Valle del Cauca, presentó una respuesta positiva en la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (Ilustración 23), en donde se tomó como control el antibiótico Cefotaxima, generando un halo de inhibición de 2.3 cm, y un porcentaje de inhibición de 95.83%. El extracto B (extracto de alcaloides) con semillas cultivadas en Ecuador, presentó una respuesta positiva en la cepa *S. aureus* ATCC 25923, indicando un halo de inhibición igual a 1.2 cm y un porcentaje de inhibición de 50.0%, siendo este menor al obtenido en el extracto A, como se observa en la Ilustración 23. Respecto a las cepas Gram negativas, no se obtuvo respuesta con ninguno de los extractos, ya que las bacterias Gram negativas presentan mayor resistencia a los antibióticos, debido a que su membrana celular externa rodea la capa de peptidoglucano, contiene polisacárido y funciona como barrera frente a los antimicrobianos.



Actividad extracto A frente a *S aureus* ATCC 25923



Actividad extracto B frente a *S aureus* ATCC 25923

Ilustración 23. Actividad antibacteriana. Extracto A: extracto de semillas cultivadas en el corregimiento de la paz, Valle del Cauca frente a *S. aureus*; Extracto B: extracto de semillas cultivadas en Ecuador frente a *S. aureus*

5. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron diferentes rendimientos de extracción para los extractos secos de las semillas de *Lupinus mutabilis* usando dos disolventes halogenados, diclorometano y cloroformo (1.2 y 1.5% respectivamente), estos resultados indicaron mayor afinidad de los alcaloides con cloroformo.
- Al determinar la composición proximal de las semillas de *Lupinus mutabilis* (cenizas, humedad, lípidos, proteínas y fibra cruda), se encontró un porcentaje de proteínas 45.50% y lípidos 16.18%, desmostrando que el consumo de estas semillas pueden llegar a ser una alternativa nutricional.
- Se determinó la actividad antibacteriana de extractos alcaloidales de semillas de Lm contra bacterias Gram positivas y negativas, estos extractos presentan actividad antibacteriana únicamente en bacterias Gram positivas tales como la *S. aureus*.
- El extracto crudo de alcaloides de semillas cultivadas en la Paz, presentan mayor porcentaje de inhibición contra *S. aureus* equivalente a 95.8% en comparación con el 50.0% de inhibición obtenido con el extracto de las semillas cultivadas en Tulcán.

- El estudio del extracto de cloroformo de las semillas de *Lupinus mutabilis* por GC-MS, evidenció tres picos mayoritarios correspondientes a compuestos del grupo de los alcaloides, siendo la lupanina la más abundante, seguido de la esparteina y la 3 β -hidroxilupanina.
- Los compuestos identificados fueron comparados con estudios previos reportados (la lupanina como el alcaloide más abundante seguido de la esparteína y la 4-hidroxilupanina), encontrándose diferencia en la composición del extracto alcaloidal con la presencia de la 3 β -hidroxilupanina, siendo en este caso alcaloide más abundante.

6. RECOMENDACIONES

- Identificar y aislar cada uno de los alcaloides mayoritarios presentes en el extracto de cloroformo de las semillas de *L. mutabilis*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto alcaloidal y de cada metabolito secundario por separado sobre bacterias gram positivas, con el fin de atribuir la actividad antibacteriana a un solo compuesto o a efectos sinérgicos de la mezcla de compuestos presentes en el extracto.
- Determinar el contenido proximal de las semillas de *Lupinus mutabilis* después de la extracción de los alcaloides.
- Evaluar la toxicidad del extracto de cloroformo de semillas de *L. mutabilis* y de los alcaloides aislados con metodologías apropiadas para aportar en investigaciones de nutrición.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G. A. Guerrero, Cultivos herbáceos extensivos, (6ta edición ed.) ed., Madrid-España: Mundi-Prensa Libros S.A., 1990:Pág 643..
- [2] M. Tapia y E. Anpe, UNALM.UGC Estado del arte en el Perú sobre el chocho, tarwi o tauri.(*Lupinus mutabilis* sweet)., 2016:pág. 7..
- [3] F. ZAMORA-NATERA, «Scielo.org,» Septiembre 2009. [En línea]. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000900015. [Último acceso: 15 06 2020].
- [4] D. V. E. Barney, «Bibliotecal Digital UNAL,» 2011. [En línea]. Available: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4758/1/31260335.2011.pdf>. [Último acceso: 15 06 2020].
- [5] W. Williams y J. Harrison, «Alkaloid concentration during development in three *Lupinus* species and the expression of genes for alkaloid biosynthesis in seedling.,» *Phytochemistry*, vol. 22, pp. 85-90, 1983.
- [6] E. Ortega, A. Rodriguez, A. David y A. Zamora, Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los andes de colombia., 2010:Pág 112..
- [7] V. Barney D., Biodiversidad y ecografía del género *Lupinus* L., Pág. 58-59. ed., Colombia., 2011.
- [8] A. Gutiérrez, M. Infantes y L. Cruces, «DialNet,» 16 06 2016. [En línea]. Available: <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/1140>. [Último acceso: 16 06 2020].
- [9] A. S. P. Pabón y C. L. Y. González, «Semantics Scholar. Org,» 2016. [En línea]. Available: <https://pdfs.semanticscholar.org/ba34/a80916e7cf8bb20fa7fa2bbea356568b3bc6.pdf>. [Último acceso: 16 06 2020].
- [10] Frías, A., Agronomía de los cultivos andinos., T. o. L. Andino, Ed., 2007: Capítulo 4. Pág. 98-99..
- [11] Peralta, E., Caicedo, C., Rivera, M., Cultivo de Chocho. Capítulo I, cultivo de chocho, *Lupinus mutabilis* sweet, fitonutrición, enfermedades y plagas en ecuador., Quito-Ecuador: Fundacyt. , 2001:pág. 3..

- [12] Van den Brink, M., (, 2009. [En línea]. Available: <http://photos.v-d-brink.eu/Flora-and-Fauna/South-America/Peru-Northern-part/i-kCfxpVN>. [Último acceso: 2019].
- [13] Martínez, K., , Foto semillas y flores de *Lupinus mutabilis* sweet, Colombia, Valle del Cauca, 2017.
- [14] Rainer Gross, El cultivo y la utilización del tarwi: *Lupinus mutabilis* sweet., Rome: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. , 1882.
- [15] R. H. S. F. S. M. Z. O. Reinhard H., Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food., *Journal of Chromatography A*, 1112. , 2006:353–360p.
- [16] K. F. W. M. Ganzera A., Determination of quinolizidine alkaloids in different *Lupinus* species by NACE using UV and MS detection., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53. , 2010:1231–1235p.
- [17] Muzquiz et al., Determinación de factores antinutritivos termoresistentes en leguminosas. i: alcaloides (8 ed.), Madrid, 1993: Pág 352-354..
- [18] D. Ortega E., A. Rodríguez , D. Arturo y A. Zamora B. , 2015. [En línea]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122010000100014#Cuadro%204. [Último acceso: 3 9 2019].
- [19] Á. Betancourt, Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de la hojas de la especie *piperimperiali* (piperaceae) ., Bogotá, Colombia. : Universidad de ciencias aplicadas. , 2013.
- [20] M. Olvera, 1993. [En línea]. Available: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S03.htm> . [Último acceso: 2 5 2017].
- [21] Sharapin, N. , Fundamento de tecnología de productos fitoterapéuticos., editorial cooperación iberoamericana CYTED., pag 80, 2000.
- [22] Villanueva, B., Tamizaje fotoquímico preliminar de especie de plantas promisoras de la costa atlántica colombiana., Cuba: Revista cubana de plantas medicinales. pag. 624 , 2013.
- [23] B. Cano, Extracción, aislamiento, elucidación y actividad biológica de metabolitos secundarios *Psychotria longirostris* (rusby) estadi., Universidad del valle pag 31., 2016.
- [24] R. E. Dewey y J. Xie, Genética molecular de la biosíntesis de alcaloides en *Nicotiana tabacum*., *Fitoquímica* 94, 10–27. doi: 10.1016 / j.phytochem.2013.06.002, 2013.
- [25] J. Hagel y P. Facchini, Metabolismo del alcaloide de bencilisoquinolina: un siglo de descubrimiento y un mundo nuevo y valiente., *Plant Cell Physiol.* 54, 647–672. doi: 10.1093 / pcp / pct020, 2013.
- [26] G. A. Beaudoin y P. J. Facchini, Biosíntesis de alcaloides de bencilisoquinolina en la adormidera., *Pubmed, Ed., Planta* 240, 19–32. doi: 10.1007 / s00425-014-2056-8, 2014.
- [27] Q. Pan, N. R. Mustafa, K. Tang, Y. Choi y R. Verpoorte, Biosíntesis de alcaloides indol monoterpénicos y su regulación en *Catharanthus roseus*: una revisión de la literatura de genes a metabolitos., *C. F. T. | G. Scholar, Ed., Fitoquímica Rev.* 15, 221–250. doi: 10.1007, 2016.
- [28] Girbes T., Jiménez P. , Alcaloides. Fitoquímicos., Bolivia,: Universidad de Aquino, 2005:Pág. 11-21..
- [29] Honduras Silvestre, «7. Taxonomía de *Lupinus mutabilis* | Honduras Silvestre. (2017). Educación Helvética. Fecha de consulta 8 Abril 2017, de <http://www.hondurassilvestre.com/search/taxa/taxa.aspx?tsn=506313>,» 2017. [En línea]. Available: <http://www.hondurassilvestre.com/search/taxa/taxa.aspx?tsn=506313> . [Último acceso: 27 08 2019].
- [30] Planchuelo E. , Alkaloid composition of *Lupinus albescens* from south america., Universidad de Cordoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Notas científicas. , 1993:414-416 p.
- [31] P. J. H. D. A. C. Lee M., Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius*, L. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 5, 2006:pp. 935–946.
- [32] K. M. Frick, L. G. Kamphuis, K. Siddique , S. K. B. M y R. C. Foley, «Biosíntesis de alcaloides de quinolizidina en lupinos y perspectivas para la mejora de la calidad del grano,» 2017. [En línea]. Available: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00087>. [Último acceso: 7 9 2019].
- [33] Lourenco A., Máximo., Ferreira A., Pereira F., Indolizidine and quinolizidine alkaloids structure and bio activity. S, *Estudies in Natural Products Chemistry*, Vol. 2. , 2002:233-219p.

- [34] Jarrín H.,P., Tratamiento del agua de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. [Tesis de doctorado en Bioquímica y Farmacia], C. E. S. P. d. C. Riobamba, Ed., Quito: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, 2003.
- [35] Arango G. , Alcaloides y compuestos nitrogenados., Medellín: Universidad de Antioquia., 2002.
- [36] S. P. Angarita P. y L. Y. Castañeda G. , PERFILADO METABÓLICO DE EJEMPLARES, Bogotá: UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSE DE CALDAS, 2016.
- [37] M. M. M. F. H. W. A. Thakur, Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties., Botanics: Targets and Therapy 1 : 19–29., 2011.
- [38] A. C. M. A. H. Crozier, Plant Secondary Metabolites Occurrence Structure and Role in the Human Diet., Blackwell Publishing, Chennai, India, pp. 1–24., 2015.
- [39] A. S. A. B. K. Santra, Scope of rumen manipulation using medicinal plants to mitigate methane production., Journal of Pharmacognosy, Vol 3, Issue 2, pp.-115-120., 2012.
- [40] T. A. M. H. G. Tiemann, Tropical Forage-based Systems to Mitigate Greenhouse Gas Emissions., From Vision to Reality., pp 172-190 ed., Eco-Efficiency:, Ed., Chapter 11, , 2012.
- [41] L. Jensen, Livestock Foraging Behavior In Response To Sequence and Interactions Among Alkaloids, Tannins, and Saponins. Doctoral thesis., Utah: Utah State University, pp 1-43, 2012..
- [42] G. p. H. R. M. Jimenez, La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las patatas., Cuernavaca, morelos-México: Revista mexicana de fitopatología. Pág 355. , 2004.
- [43] Farmacorresistencia. (, «Farmacorresistencia. (2019) Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública. Organización Mundial de la Salud. Fecha de Consulta: junio 05 2019. Disponible en:https://www.who.int/drugresistance/infection_prevention/es/,» 2019. [En línea]. Available: https://www.who.int/drugresistance/infection_prevention/es/. [Último acceso: 12 06 2019].
- [44] J. Vicente, El cultivo de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el Estado Plurinacional de Bolivia, Bolivia. Pág 96.: Instituto Nacional de innovación Agropecuaria y Forestal, 2016.
- [45] E. S. A. T. K. N. M. M. M. & P. B. Lampart-Szczapa, Chemical composition and antibacterial activities of lupin seeds extracts., Food/Nahrung, 47(5), 286-290., 2003.