

---

# Evaluación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Acuoso de las Semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, Chocho), en Animales de Experimentación.

---

Castañeda, C.B.\*; Manrique M.R.\*\*; Ibáñez V.L.\*\*\*; Gamarra, C.F.\*\*\*\*; Galan, L.D.\*\*\*\*; Quispe, H.P.\*\*\*\*

## RESUMEN

En la investigación realizada en la semilla de *Lupinus mutabilis* Sweet se ha podido identificar mediante un Screening Fitoquímico los principios activos presentes en el extracto acuoso, determinándose los alcaloides totales.

Se ha evaluado la toxicidad aguda (DL50) tanto del extracto acuoso como de los alcaloides totales obtenidos de la semilla.

En el extracto acuoso de las semillas se ha evidenciado la actividad antiinflamatoria (aguda y subcrónica) en modelos experimentales, administrándose el *Lupinus* por vía oral a una dosis de 2000 mg/Kg de peso. La inflamación fue evaluada por diferentes técnicas utilizando la técnica de Granuloma de Pouche con trementina en ratas (Inflamación sub-crónica) y edema plantar con formol al 1 % y ovoalbúmina al 50% en S.S.I.(Inflamación aguda) en ratones, siguiendo las técnicas estándar del CYTED, obteniéndose el efecto máximo de inhibición de la inflamación a los 80 minutos en comparación con los 60 minutos correspondientes al diclofenaco (30 mg/Kg) mostrando un porcentaje de inhibición de 66% frente al 100% del fármaco estándar. La DL50 del extracto acuoso por vía oral fue de 3500 mg/Kg de peso y de los alcaloides totales administrados por vía oral fue de 600 mg/Kg.

Los alcaloides han sido identificados por TLC (Cromatografía en capa fina) y HPLC comparándolo con estándar de esparteína.

**Palabras Claves:** Antiinflamatorio, *Lupinus mutabilis* Sweet, Tarwi, Chocho, Diclofenaco, Ovoalbúmina, Toxicidad, Alcaloide, HPLC.

## ABSTRACT

In the investigation carried out in the seed of *Lupinus mutabilis* Sweet it has been possible to identify by means of a Screening Phitochemistry the present biologically active principles in the watery extract in boiled, being determined the total alkaloids.

The acute toxicity has been evaluated (LD50) so much of the watery extract as of the obtained total alkaloids of the seed.

In the watery extract of the seeds the activity antiinflammatory has been evidenced (acute and subchronicle) in experimental models, being administered the *Lupinus* for oral route to a dose of 2000 mg/Kg of weight. The inflammation was evaluated by different techniques using the technique of Granuloma of Pouche with trementin in rats (Inflammation sub-chronicle) and inflammatory to plant with formol to 1 % and ovoalbúmina to 50% in S.S.I. in mice, following the standard techniques of the CYTED, being obtained the maximum effect of inhibition from the inflammation to the 80 minutes in comparison with the 60 minutes corresponding to the diclofenac (30 mg/Kg) showing a percentage of inhibition of 66% in front of 100% of the standard drug. The LD50 of the watery extract in boiled for oral route it was of 3500 mg/Kg of weight and of the complete alkaloids administered for oral route it was of 600 mg/Kg.

(\*) Doctor en Medicina. UNMSM.

(\*\*) Instituto de Investigación Facultad de Medicina Humana USMP.

(\*\*\*) Docente Investigador del IMTA

(\*\*\*\*) Alumnos del 5º Año de la Facultad de Medicina Humana de la USMP.

The alkaloids have been identified by TLC (Thin layer chromatography) and HPLC comparing it with standard of Spartein.

**Key Words:** Antiinflammatory, *Lupinus mutabilis* Sweet., Tarwi, Chocho, Diclofenac, Ovoalbúmin, Toxicity, Alkaloid, HPLC.

## INTRODUCCION

La Medicina Alternativa constituye una valiosa contribución en la solución de problemas en la Salud Pública, los cuales son tan críticos como la falta de medicamentos, además de los altos precios de estos, en el mercado nacional e internacional que los hace inalcanzables para aquellas personas de menores recursos económicos, así como la gran diversidad de manifestaciones adversas y el incremento de interacciones medicamentosas.

Actualmente se están realizando estudios para evaluar los efectos de las diferentes plantas medicinales de acuerdo al uso popular que se les atribuye, e investigando los principios activos responsables de una determinada acción farmacológica y los metabolitos secundarios que presentan. Sin embargo, la falta de conocimientos tecnológicos, el desconocimiento o la inexistencia de métodos y procesos de control de calidad y estandarización, así como la falta de investigación y desarrollo en agrotecnología, tecnología farmacéutica y validación, como también la dificultad para obtener plantas medicinales de buena calidad y en cantidades suficientes, se señalan como causas para la baja calidad de los productos latinoamericanos.

En la actualidad proliferan cápsulas, tabletas, extractos, etc, preparados a partir de especies vegetales que se utilizan en la Medicina Tradicional. En muchos casos la colecta, identificación taxonómica de la especie, técnicas de extracción, estandarización y homogenización de los productos y pruebas farmacológicas y clínicas, son manejadas a libre albedrío.

Para obtener credibilidad en la Medicina Tradicional, la identidad de la especie vegetal es un factor importante, pues la fuerte demanda coadyuva a la adulteración de las plantas medicinales. Para ello se hace necesario desarrollar procedimientos de identificación rápidos y seguros que en algunos casos consisten en la obtención de espectros ultravioleta-UV de extractos hidroalcohólicos obtenidos de especies vegetales clasificadas e identificadas fehacientemente. Dichos espectros sirven como patrones de referencia, de tal manera que al analizar una muestra (una planta o un preparado de la misma) su espectro UV se compara con dichos patrones, logrando una identificación rápida y segura (5,28,42). Estos espectros también permiten realizar estimaciones cuantitativas a fin de evaluar diferentes técnicas de extracción y cuyos resultados serán de suma utilidad para la industrialización de dichas especies, así como para la estandarización de los productos comparándolos con sustancias patrón o estándar a fin de determinar cualitativa y cuantitativamente la cantidad de principios activos presentes en un determinado extracto con actividad farmacológica.

El *Lupinus mutabilis* Sweet 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 como planta medicinal. Crece sobre los 3,850 msnm, se puede hallar desde Venezuela hasta Chile. Utilizando HPLC desarrollamos una técnica que nos permitió realizar la determinación cualitativa del alcaloide Esparteína.

Si bien es cierto que *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho) ha sido muy estudiado desde el punto de vista nutricional, bromatológico (29,42) e incluso los alcaloides han sido identificados por cromatografía gaseosa por diferentes investigadores, sin embargo esta especie que planteamos en el proyecto es una variedad traída desde Huancayo de la estación experimental "El Mantaro" U.N.C.P. (19) la cual podría o no tener los mismos alcaloides u otros; teniendo en cuenta que la mayoría de cultivos varían en su desarrollo vegetativo, reaccionando a plagas y enfermedades y por 10 tanto el rendimiento y composición química varían según la época de siembra debido a que, estas también cambian las condiciones ambientales que influyen tanto en el metabolismo de la planta como en la densidad de las poblaciones de insectos y el ataque de hongos.

Además, se consideran factores intrínsecos (Quimiotaxonomía, variabilidad química), extrínsecos (agronomía, cultivo), procedencia (diferencia entre los lotes), tecnología (diferencia en el procesamiento), estabilidad (condiciones de almacenamiento) que influyen en la composición química de los productos fitoterapéuticos.

El Lupinus ha sido tradicionalmente considerado de gran valor nutritivo (21) por su alto contenido de proteínas (38.9%), grasa (17.1 %), calorías (411 cal/100g), y alcaloides (3.5%-4.2%) que no permiten su consumo directo, debiendo previamente eliminarse estos.

El producto líquido del desamargado (6,8,11) es utilizado por pequeños agricultores para combatir a las garrapatas en el ganado ovino y en camélidos sudamericanos, asimismo se utiliza como regulador del crecimiento o fertilizante en los cultivos de maíz, trigo, soya y papa.

Cross y cól. (20) mediante un Proyecto de la Cooperación Alemana GTZ y el INS trataron de industrializar el Lupinus para el consumo humano, objetivo que no fue concluido, ya que no encontraron una técnica adecuada para el desamargado de la semilla.

Inicialmente se realizaron en Sudán-África estudios experimentales preliminares en los cuales demostraron que el extracto alcohólico de las semillas del Lupinus termis tenía una actividad antieczematosa. En Perú en la Fac. de Farmacia y Bioquímica de Trujillo (4), se realizó un estudio del extracto alcohólico de la semilla de LmS para evaluar, en conejos, si poseía efecto antiinflamatorio similar al que posee la especie africana Lupinus termis. En el estudio fitoquímico del extracto alcohólico de las semillas del LmS determinaron cualitativamente sus componentes más característicos: Alcaloides, Esteroides, Saponinas y Taninos, teniendo como premisa el trabajo de investigación de la planta Euphorbia hipercifolia "Lecherita" y al notar similitud de sus principios activos, estos investigadores asumieron que el efecto antiinflamatorio era debido, probablemente, a los Esteroides, Saponinas y Taninos del LmS y para demostrar dicho efecto, prepararon una pomada a concentraciones 10% Y 20%, a partir del extracto alcohólico, que fue aplicada a un grupo de conejos con inflamación producida por Trementina. Así demostraron que la pomada al 20% tenía mayor efecto antiinflamatorio a las 24 horas en comparación con la pomada al 10%.

En otros estudios mediante procesos químicos analíticos se ha podido definir claramente que la semilla del Lupinus tiene una gran cantidad de Alcaloides Quinolizidínicos (Q) (39), que varía de 0,02 a 4,45% y dichos alcaloides reportados son la Lupanina, Esparteína, 13-0H- Lupanina, 4-0H- Lupanina, Isolupanina, entre otros componentes secundarios como Esteroides, Saponinas.

La Esparteína y la Lupanina son algunos de los alcaloides Quinolizidínicos de LmS, que dan lugar a efectos farmacológicos.

Mediante estos estudios se logró comprobar que la Lupanina es más activa y su acción farmacológica es inmediata en comparación con la Esparteína, debido a que la Lupanina se difunde más rápidamente a través de las membranas biológicas, y la duración de su actividad es más corta que la Esparteína. Esto demuestra que dichos Alcaloides puros o en forma de sales (Clorhidratos y Sulfatos) administrados en dosis altas actúan como tóxicos, pero cuando se administran en dosis moderadas actúan como medicamento.

Las saponinas, glicósidos esteroideos, que se encuentran en varias familias de la clase monocotiledóneas, Lupinus, Liliaceae, tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar una espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas.

Teniendo en cuenta la necesidad actual del aprovechamiento de los recursos que nos brinda la naturaleza para el beneficio del hombre y que deben usarse en forma racional segura y efectiva, se ha realizado el estudio pre-clínico de las semillas en cocimiento de Lupinus mutabilis Sweet con el objetivo de determinar primeramente la dosis letal 50 y posteriormente evaluar la actividad antiinflamatoria de esta planta y de sus alcaloides presentes.

### **Generalidades: Composición química de Lupinus mutabilis sweet**

Características y propiedades de los alcaloides de Lupinus:

Lupanina.-  $C_{10}H_{10}NO$ . Octahidroquinolizina-1-metanol, fué aislada en los granos del lupino amarillo en 1835 por Cassola y obtenida por primera vez por Zinert (1865). Según Leonard (1953) la fórmula molecular correcta fue asignada en 1962 por Willstater; siguiendo los trabajos realizados anteriormente se comprobó que los grupos funcionales en la molécula solamente fueron un átomo de hidrogeno terciario y un carbonil, la presencia del grupo hidroxilo fue firmemente establecida por la formación de derivados de benzil y un feniluretano y por deshidratación de la Lupanina anhidra

C10H17N, por medio del ácido sulfúrico y la posible biosíntesis de la Lupinina del aldehído aminoalérgico (de la lisina) ha sido mencionada por Schop (1931-34).

La Lupinina se caracteriza por tener la forma de prismas ortorómbicos, es soluble en agua, éter, alcohol o cloroformo, es una base fuerte. La forma racémica de la Lupanina fue sintetizada por Becheleide en 1951.

Laigon, estableció que la Lupanina, al igual que la Esparteína y Trilupanina, tiene acción estimulante sobre el músculo uterino de conejo.

Alfa Isolupanina C15H24N2O, es un isómero cis de la Lupanina, Mariot et. al. citados por Leonard (1953) establecieron 10 cíclico de este isómero de la Lupanina y además por espectrometría (absorción infrarroja), determinaron la posición del enlace con el oxígeno.

La D alfa isolupanina es entonces un diastereoisómero de la Lupanina.

En la determinación de alcaloides en una muestra de Lupinus con un promedio de 12 determinaciones por Cromatografía de Gases (5), realizado en el año 1981 por el Instituto Nacional de Salud informe N°7 de Noviembre de 1981 por el Dr Rainer Gross Graff y el Dr Luis Tuesta Vargas se tiene los siguientes datos:

**Tabla 1:** Contenido de alcaloides en semillas y en el contenido total del LmS.

Alcaloides	Contenido de Alcaloides g/100 g. de muestra g/100	Contenido de Alcaloides g.alcaloides totales
Sp (Esparteína)	0.180-0.524	5.6-14.4
N-me-		
Angustifolina	0.028-0.139	1.2- 4.9
a-i-La	0.005-0.018	Trs- 1.1
La	1.440-2.659	51.1-70.9
4-OH-La	0.143-0.463	2.7-15.9
13-OH-La	0.227-0.567	7.1-20.0
4,13 -OH-La	0-0.044	0- 1.6
13-Ang-o-La	0.018-0.073	0.6-2.4
G6	0.005-0.026	0- 0.9
13-Bz-O-La13-		
Ci-O-La	0-0.0040.010-0.043	0- 0.2 0- 1.5

ALCALOIDES TOTALES 2.46 -3.87%

**Tabla 2:** Alcaloides por Espectrometría de Masas

ALCALOIDE	M+	Iones más abundantes				
Esparteína	234	137	98	193	234	110
N- metil-						
Angustifolina	248	207	58	112	193	248
L-isolup.	248	136	149	248	97	110
Lupanina	248	136	149	248	97	110
H-hidroxilup.	264	136	150	264	98	247
13-hidroxilup.	264	152	264	165	247	55
13-ang.oxilup.	346	246	134	112	55	346

Para la determinación de alcaloides existen muchos métodos, entre ellos tenemos:

### **Metodos polarográficos**

La polarografía en la estimación cuantitativa de los compuestos alcaloidales, tienen una aplicación limitada, principalmente porque un gran número de factores ambientales tiene marcadas influencias en los análisis.

### **Métodos cromatográficos**

La cromatografía en capa fina es una técnica importante para la determinación de alcaloides ya que permite proporcionar informaciones sobre la homogeneidad de los componentes químicos del producto y así garantizar que las sustancias responsables de la actividad farmacológica estén presentes en los niveles adecuados y también para, de esta manera, lograr la identificación de la planta (marcadores). Los marcadores constituyen químicos definidos que están presentes en la materia prima vegetal, de preferencia son los propios principios activos, los cuales son destinados al control de calidad de la materia prima vegetal, de las preparaciones fitoterapéuticas intermedias y de los productos fitoterapéuticos. No siempre se conoce la constitución química de la planta, cuando esto sucede es indispensable realizar su perfil cromatográfico; por ello el extracto, en condiciones definidas de análisis formará un diseño característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes, llamado huella digital de la planta.

### **HPLC**

El sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica cromatográfica que permite trabajar con diferentes modalidades de cromatografía: adsorción, reparto, intercambio iónico y filtración molecular, para esto sólo es necesario cambiar el tipo de fase estacionaria y la utilización de diluyentes adecuados. El gran avance de la cromatografía líquida de alta eficiencia consiste en la posibilidad de utilizar micropartículas, con lo cual se aumenta considerablemente la eficiencia de la separación.

Las principales ventajas que presenta la técnica de HPLC son:

- capacidad de separación bastante elevada.
- separaciones a temperatura ambiente.
- no está limitada a la volatilidad o a la estabilidad térmica de las sustancias.
- rapidez y reproducibilidad de los análisis.
- Las muestras no son destruidas por el detector y pueden ser recogidas y utilizadas puras (separaciones en escala preparativa).

La instrumentación básica consiste en: recipiente para la fase móvil-bomba-inyector-columna-detector-registrador.

Hoy prácticamente todos los laboratorios que efectúan análisis de constituyentes de plantas poseen un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, pues permite realizar con ventajas todas las separaciones que se llevan a cabo por cromatografía en capa fina, poder realizar los análisis cuantitativos de forma mucho más eficaz y segura, el perfeccionamiento de los detectores específicos para determinadas clases de sustancias permite un análisis selectivo de ellas, incluso cuando se encuentran en mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de alta eficiencia para el análisis de los constituyentes de las plantas ha aumentado en la misma proporción que el desarrollo de los nuevos detectores y de nuevas fases estacionarias.

Por ello se puede definir un producto fitoterapéutico como un fitocomplejo por el hecho de poseer una mezcla compleja de sustancias, razón por la cual para analizar los productos fitoterapéuticos sin poner en riesgo la eficiencia de la columna cromatográfica será necesario realizar una purificación previa a través de agentes clarificantes (carbón activado, alúmina, tierra de diatomeas, etc.).

Esta purificación puede comprender también una extracción selectiva de la sustancia que va a ser analizada (p.ej. una extracción ácido base) y/o la utilización de otras técnicas cromatográficas. El uso de precolumnas colocadas estratégicamente entre el inyector y la

columna, permiten la inyección directa de los fitocomplejos. Las sustancias que causan daño en las columnas son retenidas en la pre-columna, protegiendo de esta manera la columna cromatográfica.

La precolumna debe cambiarse después de un determinado número de análisis. Como la precolumna tiene un precio más bajo que el de una columna, esta técnica permite la realización de análisis mucho más confiables, aumentando paralelamente la vida media de la columna cromatográfica.

### **Análisis cuantitativo en cromatografía líquida de alta eficiencia.**

El análisis cuantitativo se realiza normalmente a través de la técnica de calibración con patrón externo. Se preparan como mínimo tres soluciones de un patrón de la sustancia que va a ser analizada, con una concentración conocida y cada una de ellas se inyecta por triplicado en el cromatógrafo. Se elabora una curva de calibración con los valores medios de tres determinaciones del área o altura del pico versus concentración. Una vez construida esta curva la o las sustancias se pueden cuantificar a través de su inyección en el sistema y la lectura del área de la señal correspondiente. Interpolando el valor en la curva de calibración se obtiene la cuantificación de la sustancia en el fitocomplejo con alto grado de exactitud y reproducibilidad.

Las separaciones por cromatografía líquida de alta eficiencia son realizadas normalmente a temperatura ambiente. Incluso sustancias termolábiles van a pasar por el sistema cromatográfico sin que ocurra degradación, por lo cual es bastante recomendable para el uso en productos fitoterapéuticos. El proceso puede ser automatizado, lo que permite una mejor reproducibilidad de los resultados y aún más, que los análisis puedan ser realizados en las horas de la noche, tiempo durante el cual el equipo está desocupado.

Para el análisis de productos fitoterapéuticos, la selección del detector varía de acuerdo con las características de las estructuras que están siendo analizadas. El detector más utilizado es sin duda el que mide la absorción en la región UV-Visible, puesto que gran parte de las sustancias a ser analizadas absorben en esta región. Los detectores han evolucionado en estos últimos años, con el objetivo de disminuir la presencia de ruidos y aumentar la sensibilidad. Los detectores UV-visibles por ejemplo, fueron utilizados inicialmente en onda fija, lo cual limitaba su versatilidad. Hoy en día es posible el empleo de detectores de longitud de onda variable o de arreglo de diodos, pudiéndose obtener además el espectro de absorción molecular de la sustancia. La comparación de estos espectros con los espectros que se encuentran en un banco de datos, suministra valiosas informaciones sobre la clase química de las sustancias presentes en el extracto. El espectro de masas de las sustancias separadas por un cromatógrafo líquido de alta eficiencia también puede ser obtenido a través de detectores de espectroscopía de masas. Para tal fin es necesario una interfase capaz de remover el eluyente del sistema a inyectar la muestra volatilizada en el espectrómetro de masas. Varios procesos de ionización pueden ser usados como: impacto de electrones, ionización química. Los detectores ultravioleta con arreglo de diodos pueden estar acoplados en serie con detectores de masa, suministrando durante el proceso de análisis, los espectros ultravioleta y de masas de las sustancias aisladas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Material Biológico:**

Lupinus mutabilis Sweet, Ratones Mus musculus cepa Balb C53 de ambos sexos de dos meses de edad de 20 a 25 g de peso corporal promedio (30), Ratas albinas consanguíneas cepa Ho1tman de ambos sexos, de 4 meses de edad con 250g de peso corporal promedio (45).

### **2. Material químico-farmacológico:**

Metanol, HCl al 1%, CHC13, NH3, Magnesio metálico, NaOH, Na2S04, Etanol, Albúmina al 50%, Diclofenaco Sódico, Suero fisiológico, Alcohol etílico 96°, Agua destilada, Acetato de Etilo, Diclorometano, Cloroformo, Tolueno, Reactivo de Cloruro Férrico, Reactivo de gelatina, Reactivo de Dragendorff, Reactivo de Ninhidrina, Reactivo de Shinoda, Metanol HPLC, Acetonitrilo HPLC, Agua HPLC, Reactivo Ácido clorhídrico Q,P, Acido sulfúrico Q.P, Acido acetico glacial Q.P, Acido ortofosforico.

## PROCEDIMIENTOS

Recolección, identificación taxonómica. La especie vegetal utilizada fue el *Lupinus mutabilis* Sweet. "Chocho", "Tarwi", fue recolectada en la estación experimental "El Mantaro" UN.C.P-Huancayo, la cual fue identificada por el Museo de Historia Natural de la UNMSM. La muestra fue estabilizada.

Para el estudio fitoquímico preliminar se tomaron grs. de lupinus, se agregaron disolventes de diferente polaridad, luego se sometió a reflujo por 10 minutos en baño maría, se enfrió, se filtró y se hicieron los ensayos correspondientes para cada extracto, así mismo se realizó tal análisis fitoquímico del extracto metanólico que presentó la actividad farmacológica según la Fig 1.

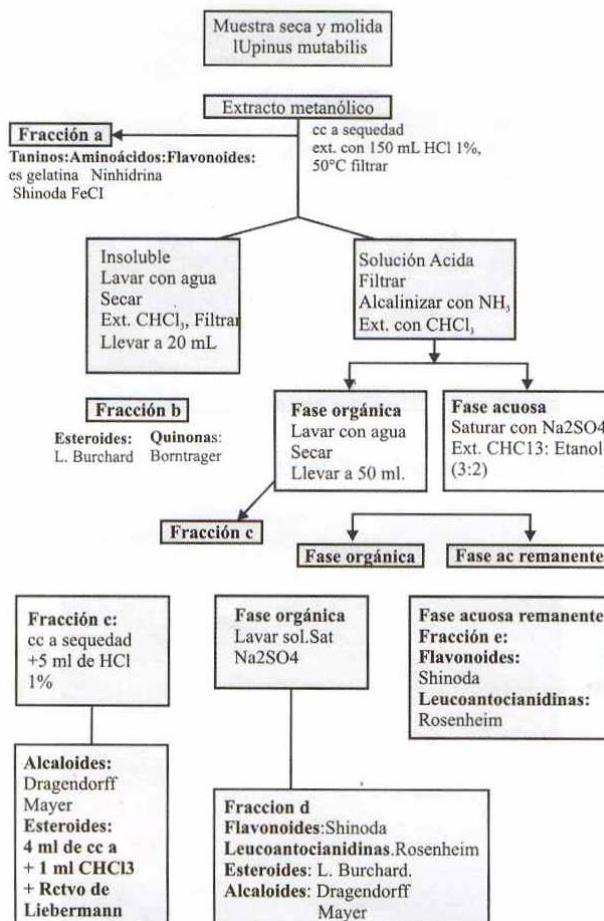
La determinación de alcaloides totales se realizó por el siguiente método:

Se tomó una determinada cantidad de *Lupinus* pulverizada y se trató con diclorometano.

Luego se filtró al vacío, al líquido filtrado se le trató con amoníaco o hidróxido de amonio hasta reacción alcalina (pH=10). Luego se adicionó diclorometano, decantándose posteriormente la solución y se evaporó con la ayuda de un rotavapor hasta sequedad. Mediante Cromatografía en columna se procedió al aislamiento de los alcaloides, determinándose la presencia de cinco fracciones de alcaloides quino-zilidínicos.

Para la extracción de alcaloides puros se pesó 150g de semilla pulverizada, se sometió a acidificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2%, luego se alcalinizó con hidróxido de amonio a un pH 11. Y se filtró con la ayuda de una bomba de vacío, posteriormente se realizó la extracción en las peras de decantación utilizando diclorometano como solvente.

Fig 1.- Análisis Fitoquímico del Extracto Meta-nológico del *Lupinus mutabilis*, con actividad farmacológica



El residuo se disolvió con agua acidulada y se identificaron los alcaloides con gotas de Reactivos generales de precipitación:

- a. S.R Bouchardart o Wagner.
- b. S.R de Dragendorff.
- c. S.R de Popoff o ácido pícrico.
- d. S.R de Sonnenschein o Fosfomolibdico.

El residuo alcaloidal, se pesó y se conservó en desecador para realizar los estudios. Se valoró la cantidad de alcaloides totales, disolviendo el residuo en un exceso de ácido de normalidad conocida (HCL04), determinando luego el exceso por valoración contra una solución alcalina conocida.

Para realizar el perfil cromatográfico de alcaloides se trabajó con el crudo de alcaloides disuelto en *cloroformo*, aplicándose sobre el cromatofolio 10 uL de la solución de ensayo a 10 cm del borde inferior, luego se corrió 15 cm a partir de la línea de aplicación utilizando como fase móvil el sistema de solventes acetato de etilo y cloroformo en la proporción 1:1 v/v.

Una vez recorrido el cromatofolio, se reveló atomizando con el reactivo de Dragendorff y se midieron los Rf de las manchas positivas frente al revelador, se compararon los valores de Rf hallados y el color de las manchas con reveladores de luz UV a 254 y 366 nm.

Para la identificación de esparteína se utilizó tintura de *yodo* la cual precipita en rojo pardo al sulfato de esparteína disuelto en el agua.

Los alcaloides del *Lupinus* al ser revelados presentaron las siguientes coloraciones:

Azul intenso----- ALFA ISOLUPANINA  
Púrpura-----LUPANINA Y ANGUSTIFOLINA  
Azul-----HIDROXILUP ANINA.

## Evaluación por HPLC

Para la lectura al HPLC de los alcaloides de *Lupinus mutabilis Sweet*, la muestra seca y pulverizada se suspendió en metanol recibiendo un tratamiento previo para la obtención y purificación de alcaloides, luego se extrajeron 200 mg de material con 7 ml de metanol durante 20 minutos, a temperatura ambiente y con agitación continua, procediendo luego a filtrar la solución recibéndola en una fiola de 25 ml directamente, se repitieron estos pasos dos veces mas reuniendo todos los filtrados y se llevó a un volumen determinado con metanol!. El análisis se realizó bajo las siguientes condiciones:

**Columna:** RP- 18, 250-4.5 um,

**Tipo de Bomba:** L-7100

**Fase móvil:**

A: 0,05% Acido ortofosfórico

B: Metanol.

C: Acetonitrilo

D: Agua

**Programa de Gradiente:**

Tiempo /min	%A	%B	%C	%D
00	100	0	0	0
05	95	0	5	0
10	70	0	30	0
12	60	40	0	0

**Temperatura:** ambiente

**Flujo:** 1ml/min

**Volumen de inyección:** 80ul

**Longitud de Onda:** UV254 nm

**Tiempo de retención de esparteína:** 0.86 Minutos



Tabla 3.- Análisis Fitoquímico de semillas (LmS)

METABOLITO		REACCIONES PRUEBAS
ALCALOIDES	+++	Dragendorff, Mayer, Wagner, Popoff
ESTEROIDES	+++	Liebermann
FENOLES	+++	Cloruro Férrico
FLAVONOID	----	Shinoda.
SAPONINAS	++	Agua destilada
TANINOS	++	Gelatina, Acetato de plomo, Bicromato de potasio
AZÚCARES REDUCTORES	+++	Fehling, Tollens
AMINOÁCIDOS LIBRES	+++	Ninhidrina

Leyenda: (+) Presencia leve, ++ moderada, +++ intensa,

Fig 2.- Cultivo de *Lupinus mutabilis* S. (Muestra)

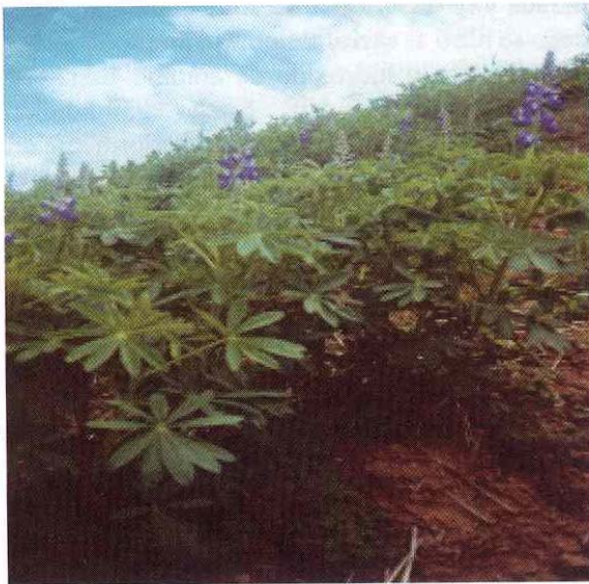


Fig 3.- Separación de principios activos por Cromatografía en columna.

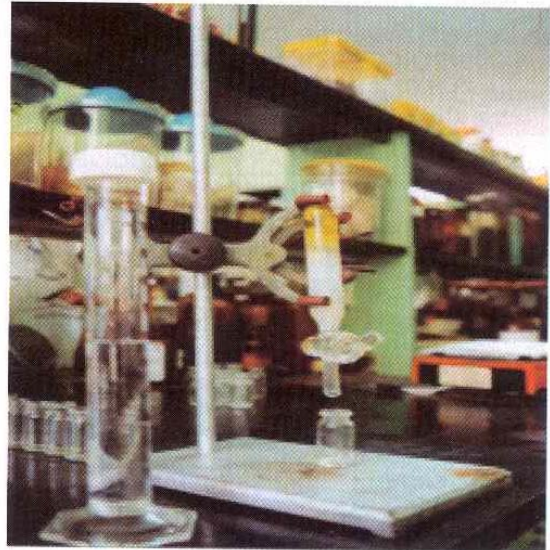
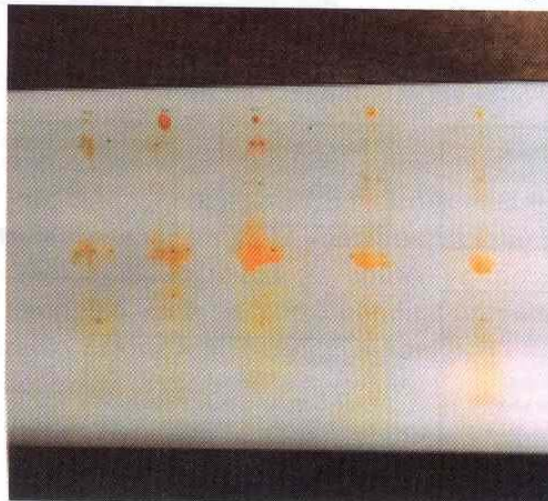


Fig 4.- Alcaloides de L.m.S frente al reactivo de Dragendorff



## Evaluación Toxicológica

Se realizó el ensayo de toxicidad aguda determinándose la DL50 (mg/Kg), de acuerdo al Modelo de Lichfield JT et al (25)., para 10 cual se formaron grupos de seis ratones cada uno, distribuidos al azar entre hembras y machos, administrándose el extracto acuoso en cocimiento por vía peroral con la ayuda de sondas metálicas orales en dosis crecientes teniendo en cuenta un nivel de dosis para un solo grupo de animales en estudio, asimismo se tuvo un grupo control al que se le administró agua destilada. Los animales fueron observados durante 24 horas para registrar las condiciones de morbilidad o supervivencia u otros parámetros de actividad motora como convulsiones y dificultades de movimiento y a los sobrevivientes se les observó durante 7 días, evaluándose los resultados mediante los Probits Log (dosis-respuesta)(13)

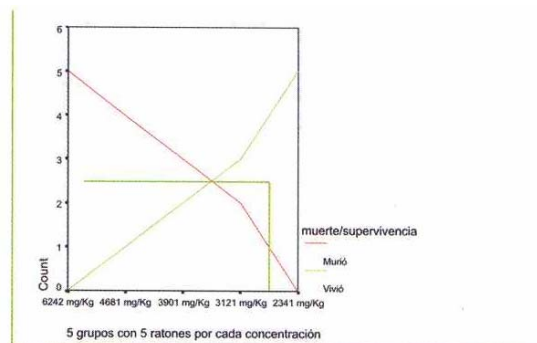
**Tabla 4.-** DL50 del cocimiento de semillas de LmS. Ensayo preliminar (25 ratones)

GRUPO	DOSIS	N° de animales muertos
I	6000 mg/Kg	5/5
II	4500 mg/kg	4/5
III	3500mg/Kg	3/5
IV	3000mg/Kg	2/5
V	2000mg/Kg	0/5

**Tabla 5.-** DL50 del cocimiento de semillas de LmS. Ensayo final (36 ratones)

GRUPO	DOSIS	N° de animales muertos
I	6000 mg/Kg	6/6
II	4000 mg/kg	4/6
III	3500mg/Kg	3/6
IV	2000mg/Kg	0/6
V	1000mg/Kg	0/6
VI	0mg/Kg	Control 0/6

**Fig 5.-** Gráfica de la DL50 (dosis respuesta) en ratones albinos del extracto acuoso de las semillas del lupinus mutabilis Sweet (Chocho) Instituto de Medicina Tradicional Andina- FMH USMP



**DL50 Del extracto acuoso : 3,500 mg/Kg**

**Tabla 6.-** DL50 de los alcaloides totales de semillas de LmS. Ensayo final (36 ratones)

GRUPO	DOSIS	N° de animales muertos
I	414 mg/Kg	0/6
II	512 mg/kg	2/6
III	1056mg/Kg	5/6
IV	1104mg/Kg	5/6

## DL50 de alcaloides totales: 600 mg/Kg

### Evaluación farmacológica:

La evaluación de la actividad antiinflamatoria, se realizó por el Método del edema subplantar utilizando ovoalbúmina al 50% en S.S.!, para lo cual se utilizaron ratones albinos Swiss obtenidos en condiciones normales del Bioterio del Ministerio de Salud (INS-Chorrillos) con peso corporal de 21-33g, los cuales fueron adaptados a las condiciones de laboratorio por 48 horas y distribuidos al azar en 3 grupos considerando un control positivo que recibió diclofenaco por vía oral.

El Método del edema subplantar consiste en la administración subcutánea de albúmina en suero fisiológico al 50% a nivel de la aponeurosis plantar del ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por liberación de diversos autacoides (histamina, serotonina, bradiquinina, prostaglandinas fundamentalmente PGE1, PGE2, PGF2alfa, etc), la extravasación de proteínas, tiene lugar durante toda la respuesta.

El extracto de semillas de lupinus en cocimiento se administró por vía oral. El volumen de la pata inyectada fue medida antes y después de la inyección de albúmina al 50% en suero fisiológico en el pletismómetro y luego comparándolo con el grupo control.

El Grupo I (Control) con agua bidestilada, sirvió como patrón.

En el Grupo II (chocho) el porcentaje de inhibición máxima fue de 66% y se presentó a los 80 min a la dosis de 2000 mg/Kg.

En el grupo III (Diclofenaco R) el efecto máximo fue de 100% y se presentó a los 60 minutos a la dosis de 30mg/Kg.

Los resultados se expresan como el promedio del incremento del volumen plantar, la media del error estándar y el porcentaje de inhibición de la inflamación.

Fig. 7.- Respuesta Antiinflamatoria de los grupos Diclofenaco y Lupinus mutabilis Sweet (Chocho) Instituto de Medicina Tradicional Andina- FMH USMP

Tabla 7.- Evaluación antiinflamatoria

Grupo de Investigación	% DE INHIB.INF. 40 MIN.	% DE INHIB.INF. 60 MIN.	% DE INHIB.INF. 80 MIN.
Control	0	0	0
Diclofenaco	90	100	
Lupinus mutabilis	63	64	66

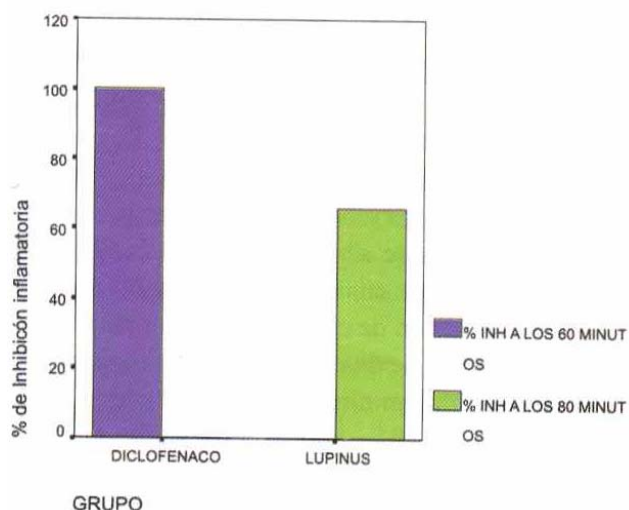


Fig 8.- Análisis por HPLC del extracto con actividad farmacológica

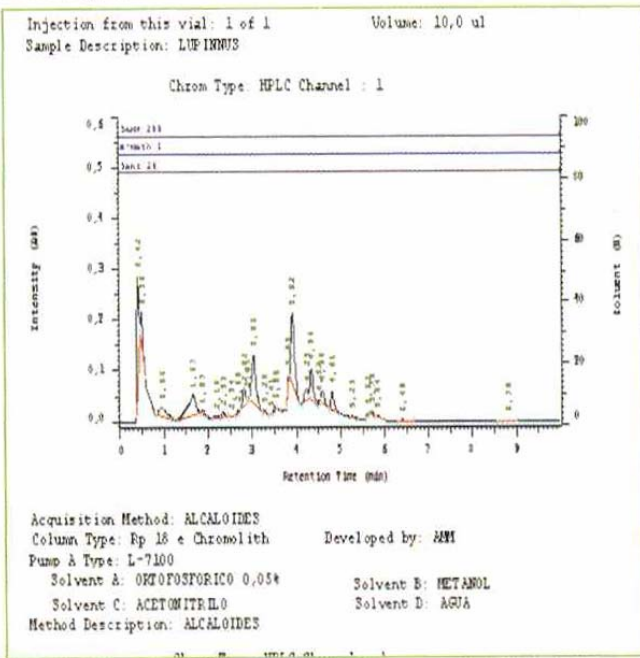


Fig 9.- Análisis de esparteína estándar por HPLC

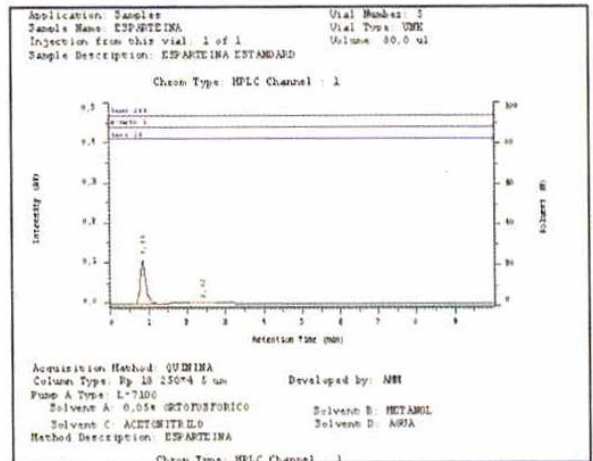
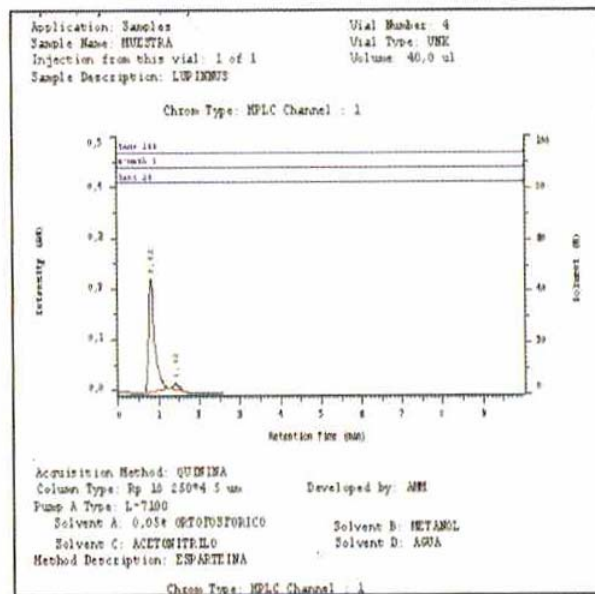


Fig 10.- Análisis de esparteína en la muestra de Lupinus Mutabilis Sweet.



## RESULTADOS

En las semillas secas y pulverizadas de L.m.S se ha podido evaluar la presencia de una serie de principios activos entre ellos: alcaloides, taninos, saponinas, esteroides, compuestos fenólicos, aminoácidos libres y azúcares. Encontrándose un 4.28% de alcaloides totales.

En el extracto con actividad farmacológica se ha podido constatar por HPLC la presencia del alcaloide Esparteína en la muestra de Lupinus frente a un Estándar.

La DL50 para el extracto acuoso en cocimiento fué de 3,500 mg/Kg de peso y para los alcaloides totales de 600 mg/Kg de peso, asimismo podemos mencionar que la toxicidad del Lupinus se mani-

fiesta por convulsiones tónico-clónicas intensas que llevaron a la muerte a los animales de experimentación y asumimos que posiblemente esta toxicidad pueda estar dada por los alcaloides presentes en el *Lupinus*, sin embargo a dosis menores no se evidenció la muerte de ningún ratón hasta los 7 días. De acuerdo a la Clasificación de Williams (DL50=3,500 mg/Kg) esta especie se ubica dentro de plantas ligeramente tóxicas y la causa de muerte podría deberse a la depresión respiratoria por agotamiento, como sucede con los neuroestimulantes en general.

El Extracto acuoso del *lupinus mutabilis* Sweet (chocho) posee efecto antiinflamatorio menor que el efecto producido por el diclofenaco. Sin embargo podría constituir una medicina alternativa para este tipo de afecciones.

## DISCUSION Y COMENTARIOS

Al realizar la presente investigación se observó la eficacia antiinflamatoria de esta especie a la dosis de 2000 mg/Kg de peso en ratones 10 cual coincide con resultados obtenidos con la pomada aplicada a conejos a una concentración del 20% del extracto de semillas de *lupinus* realizado en la Universidad Nacional de Trujillo(14) aplicado por vía externa, los cuales atribuyeron el efecto a los esteroides, taninos y saponinas que presenta esta especie procedente de Otuzco, sin embargo en la marcha fitoquímica nosotros encontramos gran cantidad de alcaloides en la semilla al igual que esteroides, compuestos fenólicos y saponinas por 10 que asumimos que estos alcaloides podrían ser los principales responsables del efecto antiinflamatorio muy similar al que presenta el diclofenaco, sin presentar daño gástrico, hasta el momento, para lo cual estaremos realizando investigaciones futuras a fin de probar el efecto antiinflamatorio de los alcaloides puros ya obtenidos en un mayor número de animales de experimentación acompañado con estudios anatomopatológicos.

La presencia de alcaloides justificaría la acción antiinflamatoria, así como la ligera toxicidad que presenta.

En el análisis por HPLC se pudo observar que el extracto con actividad farmacológica presentó un número mayor de alcaloides encontrados hasta el momento para esta especie los cuales aún no han podido ser identificados y serán motivo de posteriores investigaciones.

## CONCLUSIONES

- El extracto acuoso en cocimiento presenta alcaloides, saponinas, esteroides, taninos, compuestos fenólicos aminoácido libres, azúcares.
- El uso terapéutico tradicional de mayor aplicación es como antiinflamatorio.
- En esta especie se ha podido evidenciar la presencia del alcaloide Esparteína.
- Se comprobó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso en cocimiento de las semillas.
- La DL50 fue hallada a la dosis de 3,500 mg/Kg.
- Es necesario ampliar este estudio para evaluar la actividad antiulcerosa y anticancerígena que se le atribuye a nivel popular, así como realizar estudios de toxicidad subcrónica y crónica para obtener una mayor seguridad en su uso.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abad M.J.; P.Bermejo: Anti-inflammatory activity of two Flavonoids from *Tanacetum microphyllum*. *Journal of Natural Products*. 1993;56 (7):1164-1167.
2. Antoun M; Tama, O): Studies on Sudanese Medicinal Plants. Evaluation of an Extract of *L. termis* Seeds in Chronic Eczema. *Journal of Natural Products*. 1981;44(2): 179-183.
3. Antúnez de Mayolo Santiago: La Nutrición en el Antiguo Perú. Editorial del Banco de Reserva del Perú. 1985.
4. Arévalo R, Horna, C . "Estudio Fitoquímico y Ensayo Antiinflamatorio del extracto de raíz y Rizoma de la Especie *Euphorbia Hiperfolia* (Lecherita) en animales de Experimentación *Oryctolages Cuniculus*". Tes. Bach. Trujillo-Perú. UNT Fac. Farm. Y Bioq.198S.
5. Arias Lescano, María A." Análisis comparativo de dos métodos de aislamiento y determinación de alcaloides del tarwi (*Lupinus mutabilis*)". Tesis de Ing. de Industrias alimentarias UNA La Molina. 1985.
6. Avila Cazorla," Alcaloides del *Lupinus mutabilis* (desamargado del tarwi) sobre los ácaros de la sarna de las alpacas". Instituto de Investigaciones para el Desarrollo Social del Altiplano. Universidad Nacional Técnica del Altiplano. Puno-Perú .1982.

7. Bonilla Rivera, Pablo E." Investigación Fitoquímica y Farmacológica y de Toxicidad DL50 de Ephedra americana Pinco-Pinco." Revista de Ciencia e Investigación FFB-UNMSM. 1999:2(1);27-43.
8. Boza Troncoso,H,H "Alcaloides de Lupinus mutabilis Sweet en Control de ectoparásitos del ganado" Tesis de ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco.1981.
9. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. la Edición -Zaragoza: Editorial Acribia S.A 1991 pago 157-161.
10. Cabieses, Fernando. Apuntes de Medicina Tradicional TOMO II .A&B Editores ;Diselpesa . Lima-Perú. 1993.
11. Camacho Saavedra L; Uribe v.L.: Intoxicación por agua de Lupinus mutabilis "Chocho". Bol. Soco Peruana de Medicina Int. 1995; 8:35-37.
12. Castañeda C. Benjamin: Acción de la Esparteína Sobre el Utero aislado en Ratas. Revista Med. del Hospital Central del Empleado 1964:2; 492-495.
13. Chopra.S.C;Soni.R.K. A Computer Program for Determination of LD50 Using Dbase/FoxPro. Indian Journal of Pharmacology. 2000:32;390-391
14. Cortijo M.: Estudio Fitoquímico y ensayo Antiinflamatorio del extracto alcohólico de las semillas de Lupinus mutabilis. Tes. Bach. Farm . y Bioquímica UNT Trujillo, Perú 1987.
15. Cotillo Zegarra Pedro A. Métodos Farmacológicos en la Investigación de Productos Vegetales. Lima-Perú. 1990
16. CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo RED X.C. Red Iberoamericana de productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO) la REUNION DE COORDINACIÓN INTERNACIONAL, Antigua Guatemala, 28 de setiembre-01 de Octubre 1996.
17. Franz Freg,E .Yabar. Enfermedades y Plagas de Lupinus en el Perú. (Guía de Campo). Eschborn. 1983.Soc. Alemana de Cooperación Técnica (GTZ).
18. Fuertes Ruitón César; Flavonoides y Alcaloides de Lupinus ballianus C.P. Smith con actividad Antibacteriana y Antifúngica. Revista Ciencia & Investigación de la Fac. Farm. Y Bioq. UNMSM. 1998: 1(2);71-80.
19. Gamarra C.F, Aislamiento y purificación de los alcaloides de las semillas de Lupinus mutabilis Sweet Chocho. XIII Congreso Científico Nacional SOCIPEM. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo-Perú 1998
20. Gross. Eduardo. G. Introducción al estudio de Productos Naturales. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Wahington, DC-1985.
21. Hans Schoeneberger, O. Sam ,R.Gross. Investigación de Calidad proteica dellupinus mutabilis en ratas albinas. Pag 87-100. Informe #5 Proyecto Lupino. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú.1980
22. Harrison Jack: Farmacognosia I. Fac. Farmacia y Bioquímica. UNMSM Lima-Perú. 1985
23. Juri. H; Jose.A. Palma. Principios de Bioestadística. Rev. de la Fed. Arg. de Cardiología, 21(4):3813. 1992
24. Khullar Krishan y antonio Morales M. Leguminosae- Papilionaceae-Genistee (-) 13 Hidroxiafilina de Lupinus SP. Rev. Fac. Farmacia Univ. De los Andes, Mérida - Venezuela. 6;77-83. 1975
25. Litchfield, J. T. Y F Wilconxon. A simplified method of evaluating Dose-Effect experiments, J. Pharmacol.Exp Ther. 96:99-113. 1949.
26. Litter, Manuel .Farmacología Experimental y Clínica. Séptima Edición .1986.
27. Lock de Ugaz Olga. Investigación Fitoquímica. Metodología en el Estudio de Productos Naturales. PUCP.54-67. 1994.
28. Lozano Zegarra Oswaldo L, "Estudio Químico Bromatológico del Lupinus mutabilis Sweet". Tesis de Bachiller Fac. Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima Perú 1965.
29. Málaga Sanchez Isabel.Evaluación del Valor Nutritivo Relativo (VNR) y Metionina disponible en Lupinus mutabilis. Informe #7 Instituto de Nutrición-Proyecto Lupino. Pago 142-162 .Lima Perú. 1981
30. M. Beggs, M Viggiano, R.V Rondita, J.D Coussio y F.J.E Stéfano. Procedimientos para la determinación de la toxicidad de Baccharis coridifolia (Compositae). Revista de Investigaciones Agropecuarias. 19; 265-271. 1984.
31. Merck. Información Técnica sobre Cromatografía en capa fina. Volumen II y V
32. MINSA: Diseño de Interpretación de Pruebas Farmacológicas en Control de Calidad. 1996.
33. MINSA: Diseño de Interpretación de Prueba Farmacológicas en Control de Calidad. 1997
34. Oliveira Simoes, Claudia;Schenkel Eloir col. Farmacognosia da planta ao medicamento. Segunda Edición, da UFSC,2000.
35. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo CYTED: "Manual de técnicas de Investigación. 1995.
36. Publicación del Convenio Andres Bello (C AB) y el Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED). "Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos" Santa fé de Bogota ,nc., Pag 75-76 y 173-174. Colombia.2000
37. Rivera Romero R.: Cultivos andinos en el Perú. Investigaciones y perspectivas de su desarrollo. Departamento de Ciencias Humanas UNA La Molina -Lima-1995
38. Rodríguez P.B. Teresa. Aislado de Proteína de lupinus mutabilis. Instituto Nacional de Nutrición. Proyecto Lupinus. Informe # 5 Pag 121-134 Nov.Lima-Perú.1980.
39. Rojas Janne at col. Esparteína y Lupanina, dos Alcaloides Quinolizidínicos de las especies Lupinus Eremonomos y L. Meridanus M. Rev. De la Fac. de Farmacia de Venezuela. 35;21-27. 1989.
40. Schmeller T., M. Sauerwein, E Sporer, M. Wink: Binding of Quinolizidine Alkaloids to Nicotinic and Muscarinic Acetylcholine Receptors. Journal of Natural Products, 1994: 57; 1316-1319. 41.

Schultes, Richard Evans . El Bosque curativo, las plantas medicinales y tóxicas de la Amazonía del noreste. 1990

41. Torres Tello Félix. "Determinación del valor nutritivo de la semilla del *Lupinus mutabilis* Sweet". Tesis de bachiller Fac. Farmacia y Bioquímica. UNMSM 1975.
42. Valette.G. Manual de Farmacodinamia. Editorial Toray-Masson S.A Barcelona. 68-75.1992.
43. Xorge A. Domínguez S. Cromatografía en papel y en capa delgada. Departamento de Química. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, N.L México. 1982.