

Trabajos de Investigación

FLAVONOIDES Y ALCALOIDES DE *LUPINUS BALLIANUS* C.P. SMITH CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFUNGICA

César M. Fuertes Ruitón*, Mirtha Roque Alcarraz** y Maribel Tristan Vidalón

* Instituto de Química Orgánica Aplicada a la Farmacia. U.N.M.S.M. Facultad de Farmacia y Bioquímica

** Instituto de Microbiología. U.N.M.S.M. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Fax (511) 328-4741.

RESUMEN

Las hojas de *Lupinus ballianus* C.P., Smith, procedente de las zonas altas del Departamento de Lima, contiene entre otros metabolitos, 5 flavonoides y 5 alcaloides.

El flavonoide genisteina fue determinado utilizando la espectroscopia UV-Visible, observando desplazamientos batocrómicos o hipsocrómicos de los espectros con los reactivos metóxido de sodio, cloruro de aluminio, ácido bórico y acetato de sodio.

El espectro IR revela la presencia del alcaloide lupinina o hidroxilupanina.

El flavonoide y el alcaloide tienen marcada acción antibacteriana y el último muestra además una actividad antifúngica.

ABSTRACT

The leaves of *Lupinus C.P. Smith* were collected from the highlands in Lima, it contains among other 5 flavonoids and 5 alkaloids.

The flavonoid genistein was characterized by means of visible-UV spectroscopy, observing the bathochromic and hypsochromic movements of the spectra with sodium methoxide, aluminum chloride, boric acid and sodium acetate reagents.

The IR spectrum reveals the presence of the alkaloid lupenin or hydroxylupenin.

Both the flavonoid and the alkaloid show a strong antibacterial activity and the alkaloid shows in addition of this property an antifungic activity.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo tiene por finalidad determinar los principios activos que tiene la especie *Lupinus Ballianus* C.P. Smith comúnmente conocido con el nombre de "Jera", y determinar la actividad antimicrobiana de los principios activos, principalmente flavonoides y alcaloides.

Las especies del género *Lupinus* pertenecen a la familia Fabaceae, que comprende más de 12,000 especies. El habitat predominante de estas especies son lugares templados y fríos, a medida que aumenta la altitud y la latitud disminuyen no solo el número de especies sino también el tamaño de cada una de ellas (1,2).

Se conocen cerca de 300 especies del género *Lupinus*, que se caracterizan porque sus granos son amargos. Los *Lupinus* se cultivaron y utilizaron desde épocas preincas, ya sea para la alimentación o para tratar diversas afecciones (3,4,5,6).

En el nuevo mundo el género *Lupinus* está distribuido principalmente en California y los Andes Peruanos. En el Perú se encuentran en la costa, sierra y selva principalmente en La Libertad, Cajamarca, Amazonas, Ancash, Huánuco, Puno, Cusco y Arequipa (2,7,8).

Desde el punto de vista de su uso para el tratamiento de enfermedades cabe destacar que *L. mutabilis* tiene propiedades sobre la fertilidad; asimismo, a *L. albus* y *L. sativus* se les atribuyen propiedades afrodisiacas, vermífuga y antisorriásica, también son utilizadas en los casos de abscesos, eczemas y ulceraciones de la piel (10). Otros estudios relacionados, también son importantes en cuanto a la actividad biológica (11,12,13,14).

PARTE EXPERIMENTAL

Lupinus ballianus, C. P. Smith, para los efectos de nuestro trabajo ha sido recolectada en febrero de 1997 en la localidad de Bellavista (Huarochiri) del departamento de Lima a 3800 m.s.n.m. La especie ha sido clasificada en el Museo de Historia Natural UNMSM.

Para el estudio se utilizó las hojas que fueron desecadas y estabilizadas a bajas temperaturas.

Fase estacionaria para cromatografía

- Papel Whatman N° 1
- Silicagel GF254

Sistema de solventes para cromatografía

- I. n-Butanol - Acido acético saturado con agua 50: 7 v/v
- II. Cloroformo - metanol - amoníaco 10:1:1 v/v

Reveladores cromatográficos

- a. Lámpara de Luz UV
- b. Vapores de amoníaco
- c. Reactivo de Dragendorff

- Se utilizaron los equipos

Espectrofotómetro IR Nikolet
Espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU UV 2100

Screening Fitoquímico

El screening fitoquímico se llevó a cabo sobre el extracto etanólico de las hojas, las que previamente fueron sometidas a maceración.

El proceso se hizo siguiendo el diagrama de flujo correspondiente.

Aislamiento de flavonoides

La presencia de flavonoides fue detectada en el screening fitoquímico y en

cromatograma de papel Whatman N° 1, se observó 5 fracciones de flavonoides revelados con lámpara de luz UV y vapores de amoníaco.

Las 5 fracciones fueron aisladas mediante cromatografía en escala preparativa utilizando papel Whatman N° 1 27 x 11 cm y en forma descendente, como sistema de solventes el sistema I.

Los eluatos separados correspondientes a cada producto fueron purificados y desecados.

La estructura de la fracción F4 que respondió preliminarmente al ensayo antimicrobiano, fue determinada mediante reacciones químicas, análisis cromatográfico de los productos hidrolizados y mediante espectroscopía UV-IR.

Aislamiento de alcaloides

La extracción de los alcaloides, desde las hojas, se realizó macerando las hojas secas y en polvo (50 gramos) en alcohol etílico de 96° (500 ml). El solvente fue separado por evaporación a presión reducida en el evaporador rotatorio. Desde el extracto seco se obtuvo con éter los alcaloides totales.

El análisis cromatográfico en cromatofolio de aluminio de silicagel GF254 y con el sistema de solventes II, dio 5 alcaloides.

Los alcaloides fueron separados en cromatografía preparativa. Cada uno de los alcaloides fueron ensayados preliminarmente contra bacterias y hongos seleccionados; la fracción A2 respondió positivamente, fue elucidado estructuralmente, haciendo uso de reacciones químicas y espectroscopía IR.

Actividad antimicrobiana de flavonoides y alcaloides

Método de excavación placa-cultivo

Inoculación de las muestras

Previamente se repicó los microorganismos de ensayo sobre el agar incubado (TSA) a 37°C. Después del periodo de incubación se prepararon las suspensiones de cultivo en agua bidestilada estéril, ajustando el inóculo hasta una concentración de microorganismos equivalente a 0.5 en la escala de Mac Farland. Para la preparación de las placas del medio TSA, previamente fue fundido y enfriado a 45°C, posteriormente se añadió 1 ml de la suspensión de inóculo por cada 100 ml de medio de cultivo, se homogenizó con movimientos de rotación. Luego de verter 25 ml sobre cada placa petri, se dejó solidificar a temperatura ambiente y se rotuló con el nombre del microorganismo testigo. Luego se hizo las excavaciones mediante el excavador de acero de 9 mm de diámetro procurando que su distribución en cada placa sea equivalente.

Determinación antimicrobiana de flavonoides y alcaloides

Método	:	excavación placa-cultivo
Medio de cultivo	:	TSA
Muestra	:	Flavonoides (F4) 200 mg/ml Alcaloides (A2) 200 mg/ml

Microorganismos de prueba:

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Bacillus cereus

Micrococcus luteus ATCC 9341

Klebsiella pneumoniae

Standar : Penicilina G sódica (10 mcg/ml)

Ampicilina (10 mcg/ml)

Determinación mínima inhibitoria

Se trabajó con el extracto etanólico, con el flavonoide y el alcaloide, realizando las diluciones necesarias.

Método : Excavación placa-cultivo

Medio de cultivo : TSA

Microorganismos de ensayos: *S. aureus*

M. luteus

Diluciones de trabajo: 200 mg/ml 100 /ml 40 mmg/ml 20 mg/ml 2mg/ml

Determinación de la actividad antifúngica

Método : excavación placa-cultivo

Medio de cultivo : Agar Saboround

Muestra : flavonoides (200 mg/ml)

Alcaloides (200 mg/ml)

Microorganismos de ensayo: *Aspergillus niger*

Candida albicans ATCC 10231

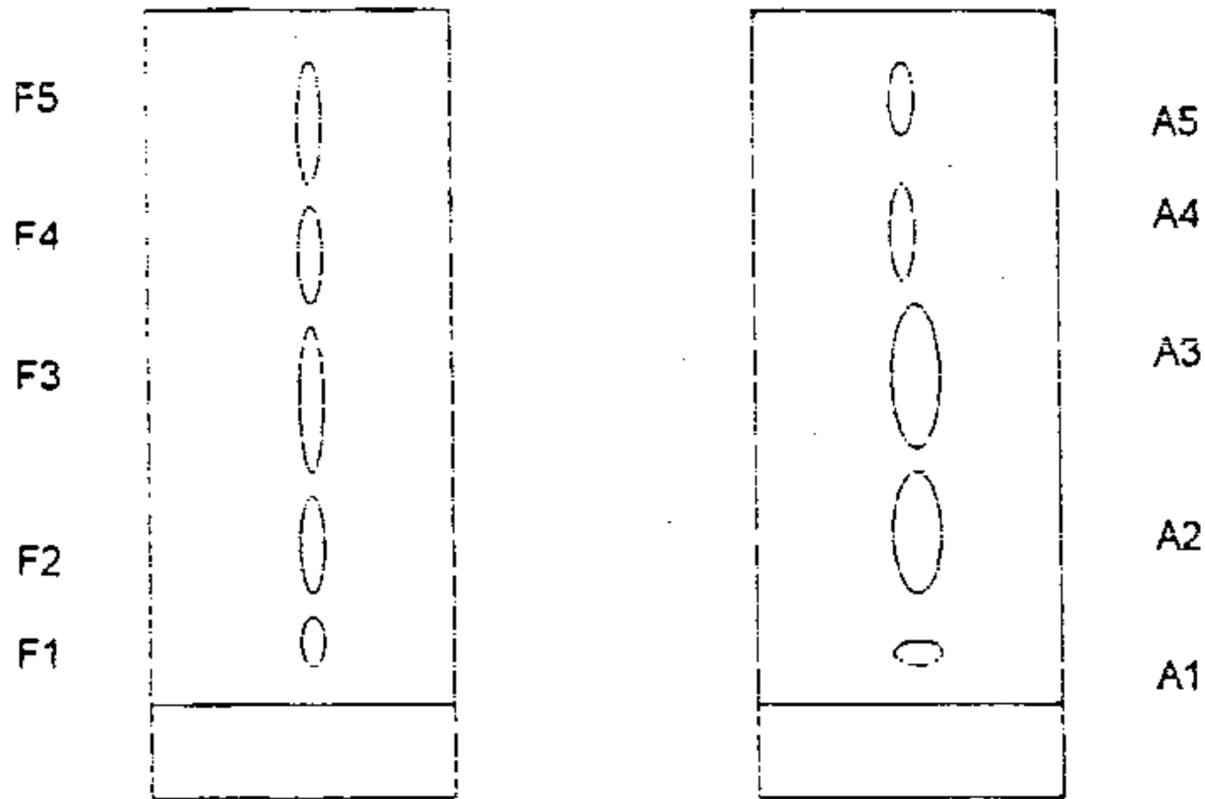
RESULTADOS

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El análisis fotoquímico del extracto acuoso de las hojas se expresa en el siguiente cuadro:

METABOLITOS	RESULTADOS
Compuestos fenólicos	+
Taninos	+
Saponinas	-
Flavonoides	+++
Aminoácidos libres	-
Alcaloides	+++
Antraquinonas	-
Esteroides	-

Para elucidar la estructura del flavonoide F4 se empleó la cromatografía en papel y el comportamiento de la solución metanólica con metóxido de sodio, cloruro de aluminio, ácido clorhídrico, acetato de sodio, ácido bórico; determinado en el espectro UV-visible.



CROMATOGRAMA DE FLAVONOIDES

Soporte : Papel Whatman N°1
 Sistema de Solventes :
 n-Butanol:Ácido acético:Saturado con agua (50:7 v/v)
 Revelador : Luz UV - Amoniaco

CROMATOGRAMA DE ALCALOIDES

Soporte : Silicagel GG 254
 Sistema de Solventes :
 Cloroformo:Metanol:Amoniaco (10:1:1 w/v)
 Revelador : Reactivo de Dragendorff

PICOS DE ABSORCIÓN DE LA FRACCIÓN F4 DE FLAVNOIDES CON LOS DIFERENTES REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTD

REACTIVOS	BANDA II		BANDA I	
	nm	Abs	nm	Abs
MeOH	276.5	0.893	332.5	0.597
MeOHNa	283.5	0.164	403.5	0.801
AlCl ₃	276.5	0.988	353.5	0.401
HCl	274.5	1.047	350.5	0.453
AcONa	281.5	1.017	365.5	0.487
AcONa/H ₃ BO ₃	274.5	1.057	318.5	0.030

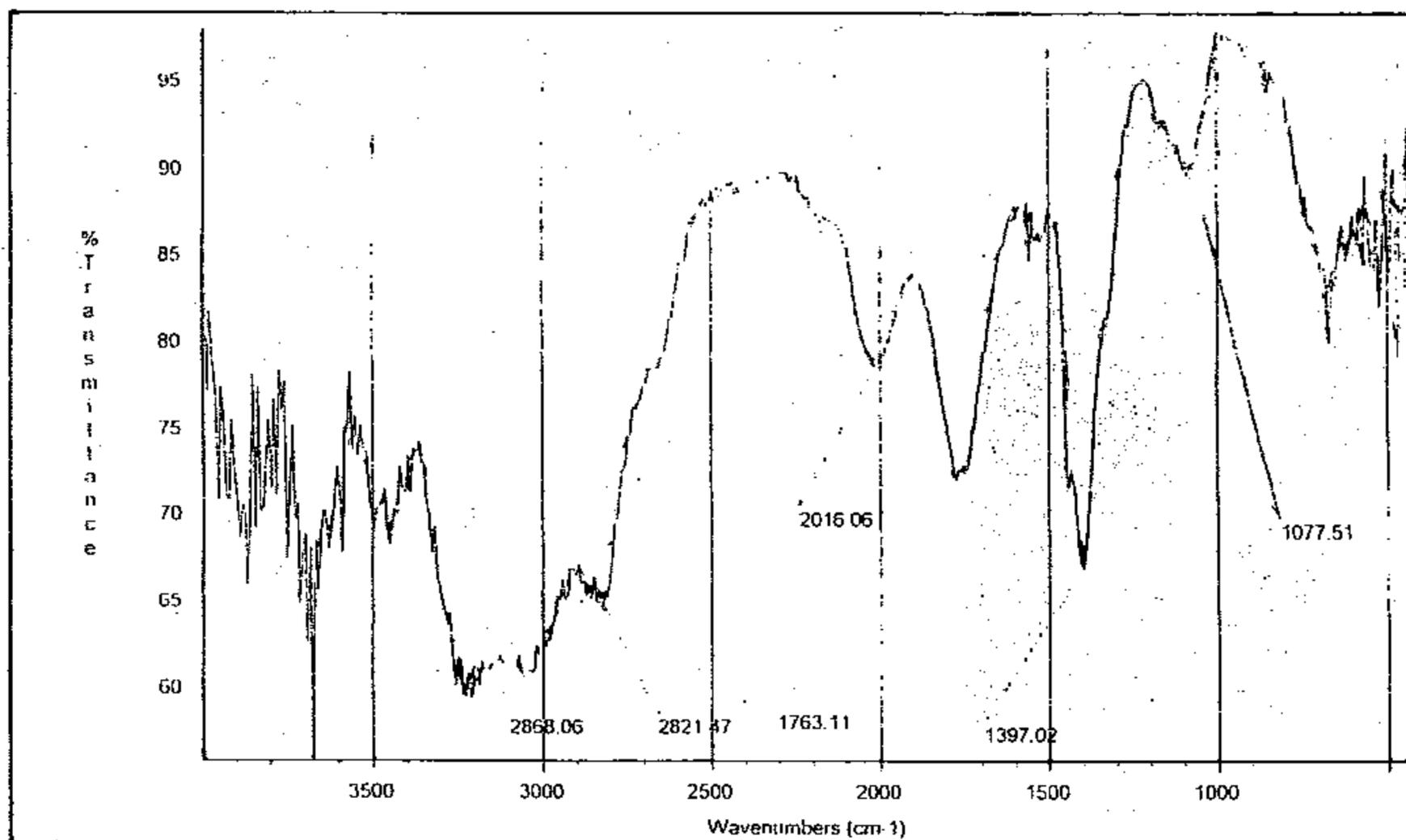


FIGURA N° 16: ESPECTRO INFRARROJO DEL ALCALOIDE A2 DE *Lupinus ballianus* CP Smith

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS FLAVONOIDES Y ALCALOIDES DE *Lupinus ballianus*

En el siguiente cuadro se observa la medida del diámetro de los halos de inhibición.

	Flavonoides (200 mg/ml)	Alcaloides (200 mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	17 mm	16 mm
<i>Bacillus cereus</i>	16 mm	15 mm
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	19 mm	16 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17 mm	14 mm

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS FRACCIONES DE FLAVONOIDES Y ALCALOIDES DE *Lupinus ballianus*

Microorganismos	Fracciones de flavonoides					Fracciones de alcaloides				
	F1	F2	F3	F4	F5	A1	A2	A3	A4	A5
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341		9 mm		16 mm	16 mm	11 mm	13 mm		9 mm	10 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		9 mm		10 mm	10 mm		8 mm		6 mm	7 mm

**DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE FLAVONOIDES EN COMPARACIÓN CON
ANTIMICROBIANO STANDAR**

Microorganismo	Flavonoide 200 mg/ml	Standar de la Penicilina G Na 1 UI		Standar de Ampicilina 10 mcg	
	zona de inhibición	IA	Zona de inhibición	IA	Zona de inhibición
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	17 mm	0,5	34 mm	0,53	32 mm
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	19 mm	0,6	32 mm	0,63	30 mm

1 UI = 0,6 mcg (Goodman)

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FLAVONOIDES DE
Lupinus ballianus FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE STANDAR PENICILINA G SÓDICA**

	CONCENTRACIÓN	ZONA DE INHIBICIÓN (<i>Staphylococcus aureus</i>)
Flavonoide	200 mg/ml	17 mm
Standar de penicilina G Sódica	0,1 UI/ml	12 mm
	0,5 UI/ml	21 mm
	1,0 UI/ml	33 mm

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA FRENTE A
Micrococcus luteus DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO, LOS FLAVONOIDES
Y LOS ALCALOIDES DE *Lupinus ballianus***

Concentración mg/ml	Extracto Alcohólico (reflujo)	Flavonoides Flavonoides F4	Alcaloides Alcaloides A2
200	15 mm	20 mm	17 mm
100	13 mm	14 mm	15 mm
40	7 mm	13 mm	15 mm
20	-	11 mm	12 mm
2	-	-	-

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LOS FLAVONOIDES Y LOS ALCALOIDES DE *Lupinus ballianus*

MICROORGANISMOS	FLAVONOIDES (200 mg/ml)	ALCALOIDES (200 mg/ml)
<i>Aspergillus niger</i>	-	20 mm
<i>Candida albicans</i>	-	-

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE ALCALOIDES DE *Lupinus ballianus*

Fracciones de Alcaloides	<i>Aspergillus niger</i>
A1	11 mm
A2	14 mm
A3	10 mm
A4	-
A5	-

DISCUSIÓN

Los análisis químicos que se han realizado en este estudio, han demostrado la presencia de taninos, saponinas, flavonoides y alcaloides. Los alcaloides y flavonoides se aislaron para nuestro objetivo a partir de un extracto etanólico, de las hojas de *L. ballianus*.

El fraccionamiento de los flavonoides se realizó por cromatografía en papel (descendente), se obtuvo 5 fracciones a las que denominamos F1, F2, F3, F4, F5. La fracción F4 fue luego analizada por espectroscopía UV-visible, por poseer esta fracción una mayor actividad antimicrobiana que las otras fracciones. En el espectro UV se observa los dos picos típicos de flavonoides denominados Banda II (276.5 nm) y Banda I (332.5 nm) en solución metanólica.

Con el metóxido de sodio tanto el pico de absorción de la Banda II (283.5 nm) y Banda I (403 nm) se desplazan batocromicamente debido a O-hidroxilos presentes en 3' y 4'.

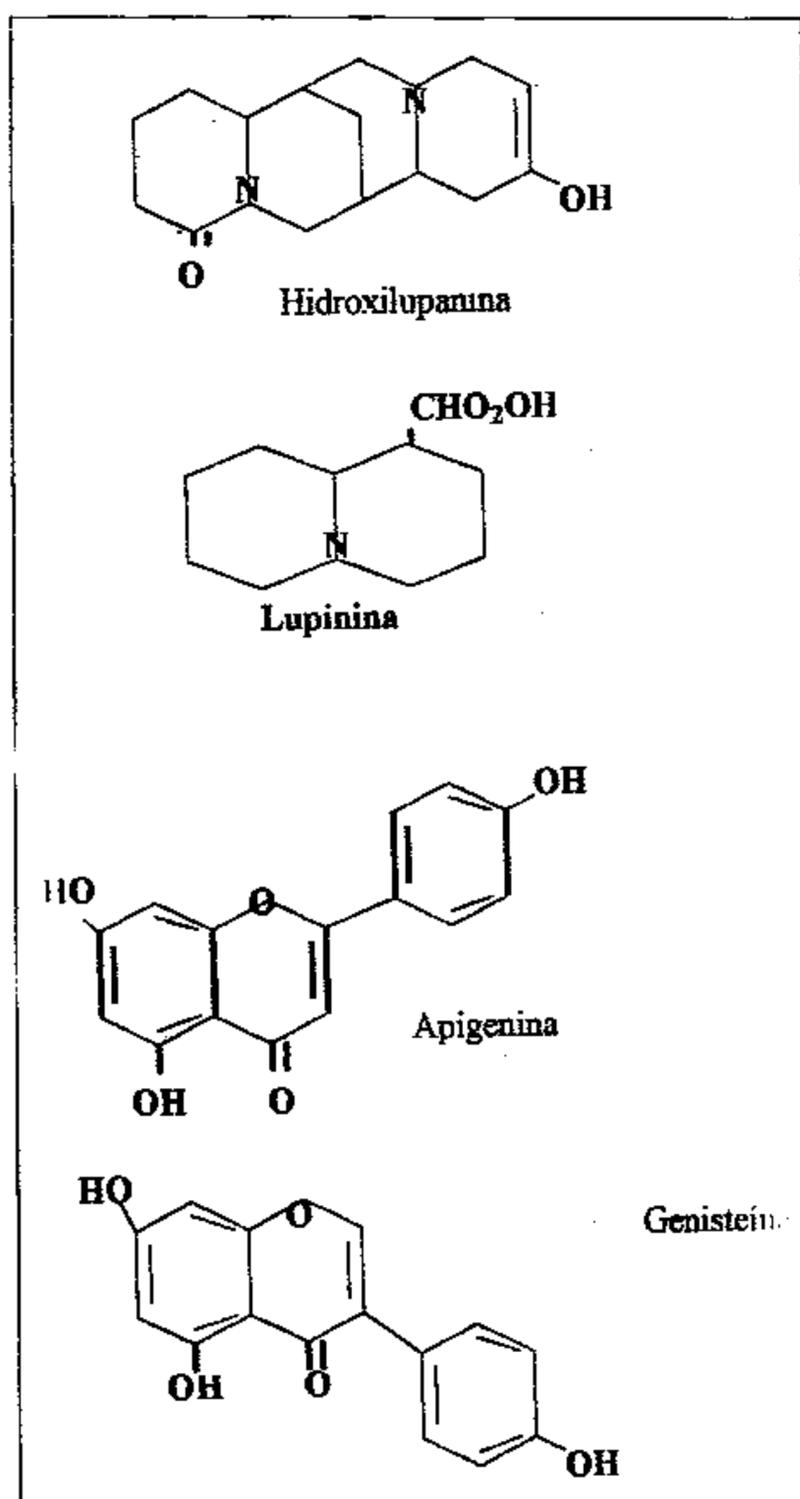
El acetato de sodio sirve para detectar los grupos hidroxilo más ácidos del flavonoide (7' y 4'), se produce desplazamiento batocromico de las Banda II (281.5 nm) y Banda I (365,5 nm), mientras que el AcONA/H₃BO₃ es para detectar grupos O-dihidroxilo. La Banda II (274.5 nm) no muestra ningún desplazamiento y la Banda I (318.5 nm) muestra un desplazamiento hipsocrómico.

Con el reactivo de cloruro de aluminio, se forma un pico de absorción de la Banda II (276 nm) muy estable después que se le agrega HCl dando nuevamente la Banda II (274.5 nm), esto corrobora la formación de un complejo muy estable entre el grupo carbonilo y el hidroxilo presente en C-5.

Los resultados espectroscópicos y sus desplazamientos indica que se trata de una flavona o isoflavona.

Sin embargo por la fuerte fluorescencia del cromatograma frente a la luz UV y después de agregarle vapores de amoniaco, todo indicaría que se trata de la Genisteína en forma libre o forma de glicósido.

Los alcaloides fueron sometidos a fraccionamiento cromatográfico, obteniéndose 5 fracciones de mayor concentración a los que denominamos A1, A2, A3, A4 y A5. La fracción A2 tiene mayor actividad antimicrobiana, fue analizada por espectroscopía IR. En el espectro IR se observa grupo OH a 3600.7 cm^{-1} , grupo carbonilo a 1763 cm^{-1} , por estas características del espectro se trataría de la estructura química de los alcaloides Lupinina o Hidroxilupanina debiendo ser necesario otros métodos espectroscópicos para diferenciar las estructuras.



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

Los resultados obtenidos de los ensayos antimicrobianos de los eluatos de flavonoides y alcaloides, muestran una resolución de inhibición menor a los extractos de flavonoides y alcaloides, estos resultados se deben probablemente que además de contener sustancias activas de propiedades químicas semejantes, existen otras sustancias como los taninos, que incrementan en cierta forma esta actividad, también los resultados observados, podrían ser causados por un sinergismo de los constituyentes.

CONCLUSIONES

1. Las hojas de la especie *Lupinus ballianus* C.P. contiene flavonoides y alcaloides como principales metabolitos secundarios.
2. El flavonoide presente en las hojas es la gensteina y el alcaloide la lupinina o la hidroxilupinina.
3. El extracto alcohólico obtenido por reflujo, el flavonoide y el alcaloide, a la concentración de 200 mg/ml tiene actividad antimicrobiana frente a las gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 5438, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9342) y gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*). El alcaloide presenta actividad contra *Aspergillus niger*.
4. La actividad antimicrobiana del flavonoide a la concentración de 200 mg/ml frente al *Staphylococcus aureus* es 0,24 mcg/ml equivalente a 0,404 UI/ml de penicilina G sódica.
5. La concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico obtenido por reflujo es de 40 mg/ml, para el flavonoide y para el alcaloide es de 20 mg/ml.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SOUKUP J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de géneros 1970. Edit Salesiano - Lima pág. 250-251.
2. WITH H.C.D. Plantas superiores 1965
Editorial Seix Barral Barcelona Tomo I
3. FERREYRA R. Flora of Peru UNMSM. Pág. 53-59.
4. GROSS G.R. y TUESTA VARGAS L. El contenido de alcaloides de algunas selecciones de *Lupinus*. Informe N° 4 Instituto Nacional de Salud 1979.
5. GROSS G.R. El cultivo y la utilización de tarwi.
Organización de las Naciones Unidas, Roma 1982.
6. RODRÍGUEZ R. Plantas para leña en el Sur-Occidente de Puno - Perú. Proyecto Arbol Andino Puno 1988.
7. TAPIA M., VARGAS C. Wild lupine of the Andes of Perú
Agricultural and Nutrition 1980: pág. 24-28.
8. SALINAS A. Estudio tecnológico para la instalación de una planta de aceite de *Lupino*. UNMSM. 1979.
9. Plantas que curan. Edit. Tres livros e Fasciculos Brasil 1984. Tomo I. pág. 56-57.
10. FINELL R.H., GAY C-C. and ABBOTT L.C.
Life Sciencies 1991: 6, 27-39.
11. HATFIELD G.M., YANG D.J. FERGUSON P.W.
Agric. Food Chem. 1985: 33(5), 909-912.
12. SMITH R.A. *Vet. Hum. Tox* 1987: 29(6) 444-445
13. TYSKI S. MARKIEWICK M., GULEWICZ K.
PLANT Physiol 1988: 133(2), 240-242
14. BARNABS C. *Fitoterapia* 1988: 39(5), 393.