

Estudio preliminar del *Astragalus garbancillo* Cav.

J. Álvarez B.¹, N. Castro M.², E. Yupanqui T.³, E. Aliaga Z.²

(Recibido 22/10/2016 / Aceptado 8/11/2016)

RESUMEN

El "garbancillo" (*Astragalus garbancillo* Cav.) crece en Áncash y en lugares de alrededor de 4000 msnm. Cuando los animales consumen esta planta, tienen ciertos malestares como temblores, mareos, caída de pelaje, etc.; y si consumen en exceso, mueren. Nuestro objetivo es tratar de encontrar el compuesto o elemento químico responsable de la toxicidad de esta planta, razón por la cual se hizo un estudio en la parte orgánica y a través de un marcha fitoquímica se determinó la presencia de metabolitos secundarios. Se logró determinar cuantitativamente fenoles totales, ácidos grasos, alcaloides, y en la parte inorgánica se cuantificaron los principales elementos químicos, determinándose 25 elementos, de los cuales toma especial importancia conocer el porcentaje de selenio usando espectrometría de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (ICP), porque se cree que el contenido alto de este elemento, juntamente con el contenido considerable de alcaloide, podrían ser las causas de la muerte de los animales. Para la marcha fitoquímica, se trabajó en un extracto metanólico y se logró identificar flavonoides, alcaloides, terpenos, triterpenos taninos, fenoles, esteroides, quinonas, logrando cuantificar principalmente alcaloides totales expresados como escopolamina (0,55%) y fenoles expresados como ácido gálico (0,7%). Para la cuantificación de ácidos grasos y esteroides se realizaron extracciones en hexano. Para el primero, se realizó saponificación, hidrólisis ácida, metilación y finalmente el análisis por CG; y para el segundo, se realizó una saponificación, la parte insaponificable fue extraída con hexano, y finalmente se realizó el análisis por CG, determinándose como ácidos grasos mayoritarios los siguientes: palmítico (16:0), con un 3,2 %; esteárico (18:0), con 10,6 %; linoleico (18:2) y cis-oleico (18:1), con 6,7 %, y entre los esteroides mayoritarios se reportan brassicaterol, con un 44,03 %, β -sitosterol, en un 22,3 %, estigmasterol con un 13,1 %, y el porcentaje de selenio por ICP fue de 2,2 mg/kg.

Palabras clave: *Astragalus garbancillo* Cav., esteroides, ácidos grasos, metales.

Preliminary study *Astragalus garbancillo* Cav

ABSTRACT

The research is the "garbancillo" (*Astragalus garbancillo* Cav.), This plant grows in Ancash-Peru in places of around 4000 m. altitude. When animals eat these plants they have certain ailments such as tremors, dizziness, loss of hair, etc. And in excess, die. Our objective is to determine quantitatively the selenium content, phytochemical, fatty acids and sterols, and isolation of active ingredients of toxicological testing. Phytochemical was performed to identify the active ingredients, which indicate it contains tannins, alkaloids, steroids and triterpenes as major components, in addition to quinones, catechins, flavonoids, phenols, in smaller amounts. Quantitative analysis was also performed for selenium and other metals by ICP.

The aim of conducted research was to study the "garbancillo" (*Astragalus garbancillo* Cav.); which grows in Ancash at 4000 meters over sea level. The consumption by animals of this plant produces certain discomforts such as tremors, dizziness, falling fur, etc. and can kill when taken in excess. Our goal is to find the chemical compounds or elements, which are responsible of toxicity. For this reason, the study was conducted in organic phase through phytochemical screening. This procedure determines the presence of

1 Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química. Lima.

2 Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Lima.

3 Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, Facultad de Ciencias, Sección Química. Huaraz. E-mail: jenny.alvarez73@yahoo.com

secondary metabolites. It was possible to determine the percentage of total phenols, fatty acids, alkaloids, as well as 25 chemical elements. The most important was selenium, which was analyzed by atomic emission spectrometry inductively coupled plasma (ICP). Due to high concentration of selenium in combination with considerable alkaloid content could be the cause of death.

For phytochemical screening was analyzed a methanolic extract and were identified flavonoids, alkaloids, terpenes, tannins, phenols, steroids triterpene alkaloids, quinones, achieving mainly quantify alkaloid (0.55%) and expressed as gallic phenol (0.7%) acid. The quantification of fatty acids was carried out in hexane extractions then acid hydrolysis and methylation, finally GC analysis was performed. The quantification of sterols was carried out in hexane extractions, the unsaponifiable part with hexane was extracted, and finally the analysis was performed by GC. The following were determined as major fatty acid: palmitic acid (16:0) with 3.2%; stearic acid (18:0) with 10.6%; linoleic (18:2) and cis-oleic (18:1) with 6.7%. Among the major sterols were reported brassicaterol with 44.03%, β -sitosterol 22.3%; stigmasterol with 13.1%. and the percentage selenium by ICP was 2,2 mg / kg

Keywords: *Astragalus garbancillo* Cav., sterols, fatty acid, metals.

I. INTRODUCCIÓN

El *Astragalus garbancillo* crece en la sierra, entre 2000 y 4500 msnm; se usa en medicina (contra la urticaria, la cefalalgia, la caspa), en etnoveterinaria (para control de acariosis), como jabón para lavar la ropa, como insecticida y como leña^[1].

Según las indicaciones más recientes, el ganado vacuno, sobre todo las hembras, deberían recibir una ración de 0,3 ppm de selenio, equivalentes a un consumo diario de unos 3 mg y las que están en lactancia de 6 mg, con una dosis diaria de 1000 y de 300-500 U.I. de vitamina E, respectivamente ^[2].

Según el National Research Council (NRC), las necesidades de selenio que deben cubrirse con la ración son de 0,1-0,3 ppm aproximadamente. Las directivas comunitarias más recientes (12.04.1991), que ya se aplican, son de 0,5 mg de selenio admitido/kg de alimento completo. Se dice que estas cantidades pueden modificarse como resultado de la influencia de factores sinérgicos o antagónicos presentes en la ración, tales como las grasas, las proteínas, los aminoácidos, la vitamina E, el azufre, el cobre, el arsénico y el cadmio^[2].

Nuestra investigación tuvo por objetivo caracterizar la planta en su contenido de metales y particularmente cuantificar el selenio, ya que se supone que este elemento podría ser la razón de la muerte del ganado

al consumir la planta, juntamente con la identificación de metabolitos secundarios a través de la marcha fitoquímica, cuantificación de alcaloides por titulación potenciométrica, cuantificación de ácidos grasos y esteroides por cromatografía de gases.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal. Las muestras proceden del pueblo Huacacorral, distrito de Chiquián, provincia de Bolognesi, del departamento de Áncash, a 3750 msnm; recolectadas en el 2014. La identificación taxonómica fue realizada por la Dra. Haydee Montoya Terreros, del Museo de Historia Natural de la UNMSM (Figura 1).



Figura 1. La planta de "garbancillo".

Equipos

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard, 5890 Serie II. Condiciones cromatográficas:

Equipo autosystem PE, columna DB-225 (50% cianopropilfenil-metilpolisiloxano) 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm, programación de temperatura de la columna 1' / 70° / 10° / min / 180° / 3° / min / 220° / 5', temperatura de inyección y detección 250°, detector FID, gas de arrastre He, flujo 1 mL/min., volumen inyectado 1 µL, split 1:100.

Espectrómetro de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (ICP) y espectrofotómetro de absorción atómica

Preparación de muestra para marcha fitoquímica

130 gramos de muestra seca (% humedad 13,5%) y molida, se maceró en 500 mL de metanol por 3 días. La solución alcohólica (volumen total de 1,2L) se concentró a 80 mL, de los cuales 20 mL se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio, obteniéndose un residuo de 520 mg. Este sólido se usó en el análisis de ácidos grasos y esteroides. El resto del extracto alcohólico se usó para realizar la marcha fitoquímica, empleando reacciones de precipitación y coloración para reconocer diversos grupos funcionales^[3]. En el estudio se encontraron taninos, fenoles, alcaloides, esteroides y triterpenos, además en pequeñas cantidades contiene quinonas, flavonoides.

Determinación de ácidos grasos y esteroides

a. Ácidos grasos. Se pesó 120 mg del extracto metanólico seco, se saponificó con KOH 0,5 N, en baño de agua a 55° por 30 min. La saponificación libera los ácidos grasos que se neutralizaron con 5 mL de HCl diluído (1:1); se realizó la extracción con 10 mL de hexano y se llevó a sequedad. El residuo se disolvió con 10 mL de hexano; se separó una alícuota de 1 mL, la que se evaporó a sequedad. Se agregó 10 mL de HClO₄ al 5% en metanol calentándose

a 55° por 5 minutos. Los ésteres se extrajeron con hexano, se lavaron y se secaron con corriente de nitrógeno. Una alícuota de 1 mL se inyecta en el cromatógrafo^[4, 5].

b. Esteroides. Se pesó 130 mg del extracto seco, se saponificó con 2mL de KOH 50% y 8mL de etanol 95%, agitándose por 10 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a baño de maría a 90° por 1 hora; se agregó 5 mL de agua destilada transfiriéndose la mezcla a pera de decantación. Los esteroides se extrajeron con 5mL de hexano por 4 veces, los extractos se concentraron agregándoles hexano hasta un volumen de 1mL, tomándose alícuotas de 1uL para el análisis GC^[4, 5].

Determinación de compuestos fenólicos

totales: Se realizó en extracto alcohólico, para ello se utilizó la técnica de Folin Ciocalteu, la cual se basa en la propiedad de los fenoles de reaccionar frente a agentes oxidantes.

La lectura de la absorbancia del complejo se realizó a 760 nm en un espectrómetro ultravioleta visible. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (patrón). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto^[6].

Preparación de la muestra. A partir del extracto etanólico, se realizó un extracto acuoso con 1 gramo del extracto y 10 mL de agua. Se sonicó por 30 minutos a 30 °C y se liofilizó.

Curva de calibración. Se prepararon diferentes soluciones a partir de la solución patrón de ácido gálico 0,1g/L de concentraciones 1; 1; 5; 2; 3 y 4 mg/L. Se añadió 250 uL del reactivo 1N, 750 uL de carbonato de sodio al 20% y se llevó a volumen final de 2 mL. Se dejó en reposo 2 horas y se procedió a hacer las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Tratamiento de la muestra. Se pesó 2 mg de muestra liofilizada y se disolvió en 50 mL de agua desionizada, se midió 500 μ L de la disolución a la cual se añadió 750 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu, luego se continuó según la metodología^[6].

Determinación de alcaloides totales. Para la determinación de alcaloides se obtiene un extracto bruto orgánico con amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N y 60 mL de etanol-éter etílico (1:2) durante 15 horas. A la muestra alcalinizada (que se encontraba dentro del cartucho y colocada en el equipo soxhlet), se le adicionó 150 mL de éter etílico y se extrajo en soxhlet durante 9 horas por día, durante 7 días, se extrajo con éter y se llevó a sequedad. El extracto bruto se disolvió con cloroformo-éter etílico (1:1), luego se extrajo con 50 mL de ácido sulfúrico 0.5 N, hasta prueba negativa de alcaloides (por Dragendorf). Se alcalinizó el extracto acuoso con 25 mL de NH_3 hasta pH 11, se extrajo en pera de separación el alcaloide con 30 mL de cloroformo-éter (1:1) hasta prueba negativa de alcaloides. Los extractos orgánicos se juntaron y se concentraron en un rotavapor a sequedad, se disolvió con cloroformo y se añadió 25 mL de ácido sulfúrico estandarizado de 0.02040N. Después de eliminar el solvente, la solución ácida se titula con el potenciómetro con hidróxido de sodio 0.0173 N, siendo el punto de equivalencia 13 mL obteniéndose 0,55% de alcaloides totales expresado como escopolamina^[7].

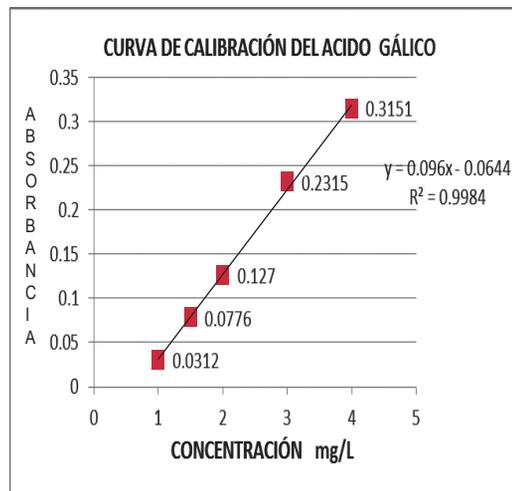
Determinación de selenio

Se realizaron los análisis de metales por espectroscopía de emisión por plasma inductivamente acoplado, método basado en EPA-200.7-Rev4.4-1994; y para el análisis de selenio se utilizó el método de espectroscopía de absorción atómica mediante generación de hidruros^[8, 9].

El contenido de selenio en la planta es de 2,2 mg/kg, cantidad elevada para el consumo de animales.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la marcha fitoquímica indica que hay presencia en la planta de flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, fenoles, alcaloides esteroides triterpenos, quinonas, flavonoides, de los que se logra cuantificar los fenoles totales expresados como ácido gálico (0.7%), alcaloides totales expresados como escopolamina con 0,5%, porque son los compuestos mayoritarios.



Concentración de ácido gálico y absorbancia

Concentración Ácido gálico mg/L	Absorbancia
1.0	0.0312
1.5	0.0776
2.0	0.127
3.0	0.2315
4.0	0.3151

Los resultados del análisis de metales por espectroscopía de emisión de plasma y espectroscopía de absorción atómica se muestran en la tabla 1. Del análisis resaltamos que tiene un alto contenido en potasio con 15 g/kg, seguido por magnesio con 2 g/kg, calcio 9,6 g/kg, hierro 0,4 g/kg y el aluminio 0,2 g/kg. El resto de los valores varía entre 0,0001 y 0,048 g/kg.

En cuanto a la cuantificación de alcaloides totales por titulación potenciométrica, se obtuvo 0,55% expresado como escopolamina.

Los niveles de toxicidad^[10] se sitúan alrededor de 3 mg/kg, como indica el Código Latinoamericano de Alimentos, y 1.5 ppm ya causa intoxicación en ratas. Este es el motivo principal por el que es muy importante respetar las cantidades indicadas para no correr el peligro de intoxicar al animal^[11].

No es fácil establecer cuáles son las necesidades exactas del elemento altamente tóxico. Es conveniente saber cuál es el nivel máximo tolerable por los animales por ración y no exponerlos a una intoxicación.

Tabla 1. Resultados de los análisis de metales.

Elemento químico	Cantidad en mg/kg
Potasio	14982,0
Calcio	9654,0
Magnesio	2070,0
Hierro	371,1
Aluminio	249,0
Manganeso	68,7
Estroncio	48,1
Sodio	47,4
Boro	23,0
Zinc	22,6
Cobre	6,3
Bario	3,6
Berilio	0,1
Cadmio	0,1
Cobalto	0,3
Cromo	2,2
Estaño	0,6
Molibdeno	0,3
Níquel	0,7
Plata	0,5
Plomo	0,6
Selenio	2,2
Talio	0,5
Titanio	3,9
Vanadio	0,6

Se determinó como ácidos grasos mayoritarios del "garbancillo" los siguientes: palmítico (16:0), con un 3,2 %; esteárico (18:0), con un 10,6 %; linoleico (18:2), con un 5,8 %; y cis-oleico (18:1), con un 6,7 %. Entre los esteroides mayoritarios, se reportan brassicaterol con un 44,03 %, β -sitosterol en un 22,3 %; estigmasterol en un 13,1 %.

Esta investigación no ha llegado a su fin. La prueba toxicológica está pendiente, así como la determinación de la relación que existe entre los metabolitos y los elementos encontrados mediante los análisis realizados y los síntomas que padecen los animales al consumir esta planta.

IV. CONCLUSIONES

Según el análisis fitoquímico el *Astragalus garbancillo Cav*, contiene mayoritariamente alcaloides y flavonoides.

El contenido de alcaloides es 0,55%, alto para una planta que se utiliza como alimento para animales.

El contenido de selenio es 2,2 mg/kg de planta. Este valor es bastante elevado si consideramos que el ganado vacuno consume alrededor del 12% de su peso vivo, aproximadamente 50 kilos de pasto en promedio.

Las causas posibles de los síntomas e inclusive la muerte del ganado vacuno que consume esta planta se orientan al alto contenido del selenio, siendo importante hacer un estudio toxicológico, pero también se puede utilizar esta planta como una fuente rica en selenio en las vacas lecheras, las cuales necesitan un elevado contenido de selenio antes del parto para evitar retenciones de placenta y mastitis, cuidando las dosis de consumo según el peso.

En cuanto al contenido de fenoles de antioxidantes, habría que racionalizar, respetando las raciones a ser ingeridas.

Esta planta tiene alto contenido de ácidos

grasos siguientes: palmítico 3.2%, esteárico 10.6%, linoleico 5.8% y cis-oleico con 6.7%, y entre los esteroides mayoritarios está el brassicaterol con 44,05%, b sitosterol con 22,3 y estigmasterol con 13,1%, siendo fuente importante de antioxidantes.

V. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Haydee Montoya Terreros, del Museo de Historia Natural de la UNMSM, por la identificación taxonómica de la planta.

Se agradece al laboratorio de Servicios Analíticos Generales por los análisis por GC.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Brack Egg, A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú, Ed. CBC, Cusco, Perú, 1999, página: 52, 53.
- [2]. Krasteva, I., Nikolov, S. "Flavonoid in *Astragalus corniculatus*" *Quim. Nova*, 2008; 31(1): 59-60.
- [3] Lock O., Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales, Ed. Fondo editorial-PUCP, 1994, página 21-35.
- [4] Gunstone D, Fatty and Lipid chemistry, Ed. Chapman and Hall, London, 1996.
- [5] Guil G., Reboloso .M., Torija M., *Journal of food Composition and Analysis*, 2003; 16(2): 111-119.
- [6] Gutiérrez D, Ortiz C, Mendoza C. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México. Del 22 al 24 de octubre del 2008.
- [7] Reyna P., Torpoco V., Córdor E., Estudio químico de las semillas del Toe. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 2004, 70(4), 189-200.
- [8] Protection Agency United States Environmental EPA-200.7- Determination of metals and trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry Rev4.4 1994.
- [9] Standard Methods for Examination of Water & Wastewater -2005, M 3114 B y C.
- [10] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, World Health Organization Codex alimentarius, Editorial Production and design group, Publishing management service FAO, Roma, 2005.
- [11] Mondragón M., Jaffé W., Selenio en alimentos y en la orina de escolares de diferentes zonas de Venezuela. *Separata de Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 1971, 21(2), 185-196.