

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

### Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“Extracción, Identificación y Cuantificación de *Swainsonina* a partir de *Astragalus arequipensis* (garbancillo) y de sus hongos endófitos por fermentación en cultivo sumergido discontinuo”**

Tesis presentada por la Bachiller:

Leyva Salas, Marcia Alejandra

Para optar el Título Profesional de  
Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ing. Javier F. Roque Rodríguez

**AREQUIPA - PERÚ**

**2013**

## Agradecimiento

Debo agradecer este triunfo;

Definitivamente, a ese Ser Supremo que hace posible mis sueños.

A dos seres extraordinario, mis padres quienes con su apoyo incondicional, paciencia, amor y amistad me motivan, siendo pilares fundamentales en mi educación espiritual y profesional.

Agradezco a la Universidad Católica de Santa María por la formación profesional recibida; gracias a los conocimientos y consejos impartidos por los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas.

Al Dr. José A. Villanueva Salas, por sus consejos y apoyo incondicional, un gran amigo y maestro.

A mis abuelos, por siempre creer en mí.

A todos los familiares que hicieron posible este proyecto.

Finalmente a esa persona que con su cariño y ganas de ayudar me animaba.

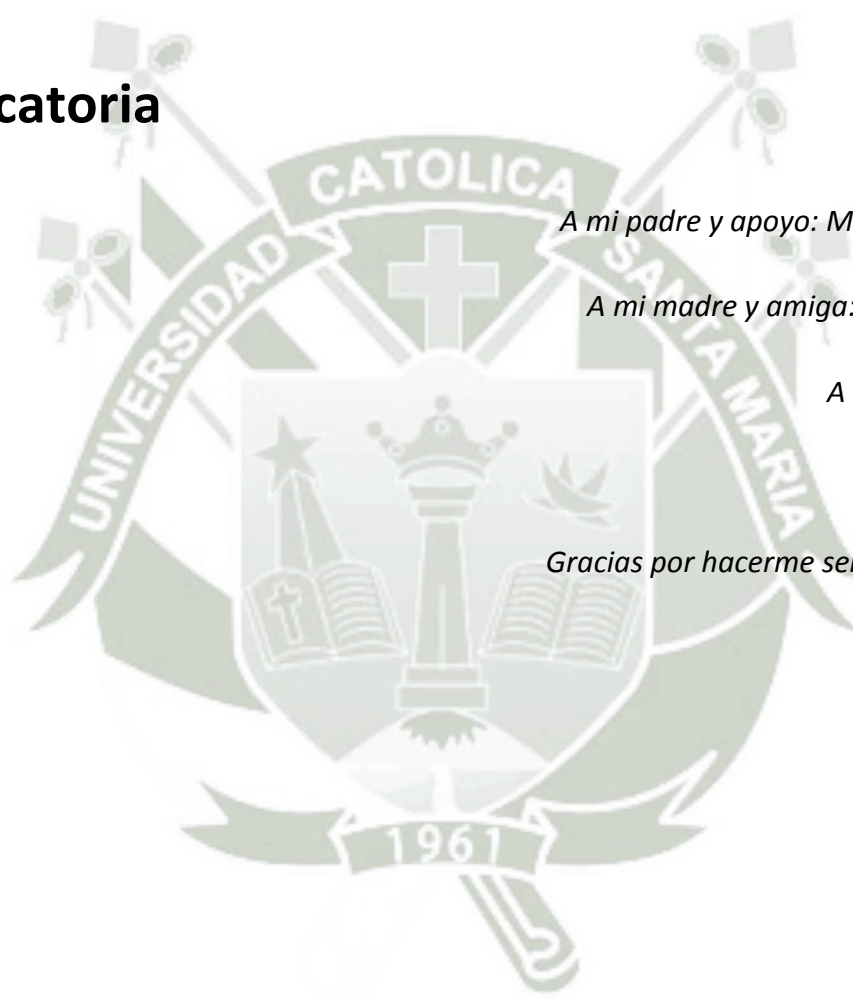
## Dedicatoria

*A mi padre y apoyo: Marcial Leyva,*

*A mi madre y amiga: Clara Salas,*

*A mis abuelos,*

*Gracias por hacerme sentir especial.*



# Índice

RESUMEN	1
---------	---

## CAPÍTULO I GENERALIDADES

1.1. INTRODUCCIÓN	3
1.2. OBJETIVOS	5
1.3. HIPÓTESIS	6
1.4. VARIABLES E INDICADORES	7

## CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. <i>Astragalus spp.</i> Como Especie Vegetal	8
2.2. Metabolitos Secundarios	13
2.3. Alcaloides	17
2.4. Swainsonina	21
2.5. Fuentes Vegetales y Fúngicas de <i>Swainsonina</i>	29
2.6. Método Extractivo y Fermentativo	30
2.7. Métodos de Identificación por TLC y HPLC	39
2.8. Perspectivas Futuras	49

## CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Ejecución	51
3.2. Materiales	51

3.3. Métodos	54
3.3.1. Obtención de los Extractos Alcaloides de las Hojas, Tallos y Raíz de <i>Astragalus arequipensis</i> Recolectada de la Región Arequipa	54
3.3.2. Aislamiento e Identificación de Hongos Endófitos de los Tallos, Raíz y Rizósfera de <i>Astragalus arequipensis</i> .	61
3.3.3. Obtención de los Extractos Alcaloides de la Fermentación en Cultivo Sumergido Discontinuo de los Hongos Endófitos con Tres Diferentes Medios Selectivos	64
3.3.4. Desarrollo de una Técnica por HPLC para Evaluar las Concentraciones de <i>Swainsonina</i> de los Extractos Alcaloides Obtenidos a partir de <i>Astragalus arequipensis</i> y su(s) Hongo(s) Endófito(s)	69
3.4. Flujograma De Actividades	72

## CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención y Evaluación por TLC, de los Extractos Alcaloides de las Hojas, Tallos y Raíz de <i>Astragalus arequipensis</i> Recolectada de la Región Arequipa	73
4.1.1. Recolección de Muestras.	73
4.1.2. Determinación de Especie de <i>Astragalus</i> recolectada.	75
4.1.3. Extracción de <i>Swainsonina</i> a partir de <i>Astragalus arequipensis</i>	76
4.1.4. Evaluación Cualitativa de Presencia de <i>Swainsonina</i> mediante TLC	76
4.2. Aislamiento e Identificación de los Hongos Endófitos de los Tallos, Raíz y Rizósfera de <i>Astragalus arequipensis</i>	79
4.2.1. Aislamiento de <i>Hongos Endófitos a partir de Astragalus arequipensis</i>	79
4.2.2. Identificación de Hongos Endófitos Aislados	81

4.3. Obtención de Extractos Alcaloideos de la Fermentación en Cultivo Sumergido Discontinuo de los Hongos Endófitos Aislados con Tres Diferentes Medios Selectivos	90
4.3.1. Fermentación de Hongos Endófitos en Cultivo Sumergido Discontinuo	90
4.3.2. Extracción de <i>Swainsonina</i> de Fermentación de Hongos Endófitos	93
4.3.3. Evaluación de Bioproducción de <i>Swainsonina</i> por Método Fermentativo mediante TLC	93
4.3.4. Determinación de Cinética de Crecimiento de Hongo(s) en Medio(s) Seleccionados como Productores de <i>Swainsonina</i>	96
4.4. Desarrollo de una técnica por HPLC para Evaluar las Concentraciones de <i>Swainsonina</i> de los Extractos Alcaloideos Obtenidos a partir de <i>Astragalus arequipensis</i> y su(s) hongo(s) endófito(s).	98
4.4.1. Evaluación Cualitativa de Extractos Alcaloideos Obtenidos a partir de <i>Astragalus arequipensis</i> y su Biomasa Fungal Endófito, Individualmente, por TLC	98
4.4.2. Desarrollo de técnica por HPLC-UV para Determinación Cuantitativa de <i>Swainsonina</i>	100
4.4.3. Determinación de Concentraciones en cuanto a la Obtención de <i>Swainsonina</i> a partir del Órgano Vegetal de <i>Astragalus arequipensis</i> y su(s) Hongo(s) Endófito(s) Seleccionados	103
CONCLUSIONES	106
RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXOS	116

# Índice de Figuras

<b>Fig.1.</b>	Espécimen vegetal de <i>Astragalus arequipensis</i>	9
<b>Fig.2.</b>	Fisionomía de <i>Astragalus arequipensis</i>	11
<b>Fig.3.</b>	Vías de Formación de Metabolitos Secundarios	14
<b>Fig.4.</b>	Esquema de la clasificación de Alcaloides	20
<b>Fig.5.</b>	Estructura Molecular de <i>Swainsonina</i>	21
<b>Fig.6.</b>	Biosíntesis de la <i>Swainsonina</i>	23
<b>Fig.7.</b>	Ruta del metabolismo de la lisina	24
<b>Fig.8.</b>	Gráfica de Ruta metabólica del procesamiento de Glicanos N-ligados, llevado a cabo en el aparato de Golgi	28
<b>Fig.9.</b>	Esquema de la placa cromatográfica TLC, para poder determinar el valor Rf	45
<b>Fig.10.</b>	Partes del Equipo de HPLC	48
<b>Fig.11.</b>	Ubicación geográfica del lugar de recolección de <i>Astragalus arequipensis</i>	55
<b>Fig.12.</b>	Recolección de las plantas	55
<b>Fig.13.</b>	Preparación de material vegetal para extracción	57
<b>Fig.14.</b>	Obtención del extracto alcaloideo por método sólido líquido	58
<b>Fig.15.</b>	Métodos para revelar el cromatograma TLC de determinación de <i>Swainsonina</i>	60
<b>Fig.16.</b>	Siembra de muestras en placa silica gel G60 de forma lineal	61
<b>Fig.17.</b>	Recolección de muestras de rizósfera	62
<b>Fig.18.</b>	Aislamiento de hongos endófitos de <i>Astragalus arequipensis</i>	62
<b>Fig.19.</b>	Hábitat natural de la planta recolectada	73
<b>Fig.20.</b>	Morfología de la flor, el cáliz, los tallos menores y las hojas	74
<b>Fig.21.</b>	Extractos alcaloides de <i>Astragalus arequipensis</i>	76
<b>Fig.22.</b>	Placas cromatográficas con tres reveladores	77
<b>Fig.23.</b>	Placa cromatográfica de extractos alcaloideos de fuente vegetal	78

<b>Fig.24.</b>	Placas PDA de crecimiento de hongos endófitos de tallos y raíz de <i>Astragalus arequipensis</i> , a los 28 días de incubación a 19-22°C	80
<b>Fig.25.</b>	Placas PDA de crecimiento de hongos endófitos de <i>Astragalus arequipensis</i> , a los 28 días de incubación a 23°C de la muestras de rizósfera en tres diluciones (1=10 <sup>1</sup> , 2=10 <sup>2</sup> , 3=10 <sup>3</sup> )	81
<b>Fig.26.</b>	Colonia denominada “α” y vista de células en KOH al microscopio a 40X	85
<b>Fig.27.</b>	Colonia denominada “β” y vista de células en KOH al microscopio a 40X	86
<b>Fig.28.</b>	Colonia denominada “δ” y vista de células en KOH al microscopio a 40X	87
<b>Fig.29.</b>	Colonia denominada “γ” y vista de células en KOH al microscopio a 40X	88
<b>Fig.30.</b>	Colonia denominada “ε” y vista de células en KOH al microscopio a 40X	89
<b>Fig.31.</b>	Matraces de fermentación en Medio Avena [M2]	90
<b>Fig.32.</b>	Matraces de fermentación en Medio Avena-Lisina [M3]	90
<b>Fig.33.</b>	Gráficos de control de pH de los fermentados días de incubación versus pH de cada hongo en cada uno de los medios	92
<b>Fig.34.</b>	Placas Cromatográficas de las 15 muestras vistas a la luz UV antes de ser reveladas	94
<b>Fig.35.</b>	Placas Cromatográficas de las 6 muestras que poseen <i>Swainsonina</i> con Rf 0.55 después de haber sido reveladas con reactivo de Ehrlich	95
<b>Fig.36.</b>	Gráfico de curva de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> y <i>Ulocladium spp</i> en medio Avena [M2] durante 25 días de incubación a temperatura 19-22°C.	97
<b>Fig.37.</b>	Gráfico de curva de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> y <i>Ulocladium spp</i> en medio Avena-Lisina [M3] durante 25 días de incubación a temperatura 19-22°C.	97
<b>Fig.38.</b>	Placas cromatográficas de la corrida de los extractos alcaloideos de fuente vegetal y fungal	99
<b>Fig.39.</b>	Cromatograma de curva de calibración de <i>Swainsonina</i> en HPLC	99

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b>	Variables independientes consideradas para la evaluación de resultados	7
<b>Tabla 2.</b>	Variables dependientes consideradas para la evaluación de resultados	7
<b>Tabla 3.</b>	Cuadro de tasa de mortalidad anual de animales afectados por procesos nutricionales y garbancillo en la SAIS Tupac Amaru durante los años 1969-1987	13
<b>Tabla 4.</b>	Información básica acerca de <i>Swainsonina</i>	22
<b>Tabla 5.</b>	Función de cada unidad de glicano que se une a la proteína en formación en el Retículo Endoplásmico Rugoso	27
<b>Tabla 6.</b>	Ejemplo de metabolitos primarios y su uso comercial	36
<b>Tabla 7.</b>	Algunos ejemplos de compuestos en medio de cultivo que inhiben la producción de metabolitos secundarios	37
<b>Tabla 8.</b>	Disposición de compuestos de acuerdo a su polaridad y su velocidad de corrido, es decir orden de elución en la placa de cromatografía de capa fina	40
<b>Tabla 9.</b>	Listado de clasificación de compuestos para fase móvil de acuerdo a su capacidad de movilidad en la placa	41
<b>Tabla 10.</b>	Listado de compuestos de acuerdo a su adsorividad hacia la placa de sílica gel	43
<b>Tabla 11.</b>	Ecuación del coeficiente de velocidad "k" y sus respectivos símbolos indicados a la derecha de la tabla	43
<b>Tabla 12.</b>	Esquema de la placa cromatográfica TLC, para poder determinar el valor R <sub>f</sub>	45
<b>Tabla 13.</b>	Tabla detallada de cultivos repetidos para cada estructura vegetal(tallo, raíz) rizósfera y control	63
<b>Tabla 14.</b>	Composición de los medios de fermentación empleados para producción de <i>Swainsonina</i> por hongos endófitos	65
<b>Tabla 15.</b>	Hongos endófitos, medios seleccionados y condiciones para producción de <i>Swainsonina</i>	68
<b>Tabla 16.</b>	Características de cada planta recolectada	74

<b>Tabla 17.</b>	Morfología de la especie obtenida	75
<b>Tabla 18.</b>	Características macroscópicas de los hongos endófitos aislados de tallos	83
<b>Tabla 19.</b>	Características macroscópicas de los hongos endófitos aislados de la raíz	84
<b>Tabla 20.</b>	Denominación de los hongos endófitos aislados a partir de <i>Astragalus arequipensis</i>	89
<b>Tabla 21.</b>	Valores de velocidad de crecimiento para <i>Fusarium spp.</i> y <i>Ulocladium spp.</i> en los medios [M2] y [M3]	98
<b>Tabla 22.</b>	Valores de RSD para los estándares de <i>Swainsonina</i>	101
<b>Tabla 23.</b>	Muestras de fuente vegetal y fungal	102
<b>Tabla 24.</b>	Determinación de rendimiento de cada una de las fuentes tanto vegetal como fúngica.	104
<b>Tabla 25.</b>	Concentraciones de <i>Swainsonina</i> en el género <i>Astragalus</i> y sus hongos endófitos de investigaciones realizadas	105



# Índice de Ecuaciones

<b>Ecuación 1.</b>	Determinación de $R_f$ para TLC	59
<b>Ecuación 2.</b>	Determinación de velocidad específica de crecimiento microbiano	68



## ABREVIATURAS

TLC	Cromatografía en capa fina
R <sub>f</sub>	Coefficiente de Retención
HPLC	Cromatografía de Alto Performance
ME	Método Extractivo
MF	Método Fermentativo
SW	Swainsonina
H	Hoja
T	Tallo
R	Raíz
g	Gramos
mL/min	Mililitros por minuto
RSD	Desviación estándar relativa
SD	Desviación estándar



## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se extrajo, aisló y cuantificó la concentración de *Swainsonina* en *Astragalus arequipensis* recolectada en la provincia de La Unión en el Departamento de Arequipa-Perú, y producción de *Swainsonina* por sus hongos endófitos aislados e identificados.

Primero se determinó cualitativamente *Swainsonina* por TLC en los extractos alcaloides, obtenidos por un método de extracción sólido-líquido para alcaloides, de las hojas, tallo y raíz de *Astragalus arequipensis*; encontrándose que las hojas presentan mayor concentración de *Swainsonina* que los extractos de tallos y raíz. Seguidamente, se aislaron los hongos endófitos de *Astragalus arequipensis*, y se identificaron como *Fusarium spp.*, *Acremonium spp.*, *Mucor spp.*, *Ulocladium spp.* y *Penicillium spp.* Los hongos se llevaron a fermentación en cultivo sumergido discontinuo con medio Czapek [M1], medio Avena [M2] y medio Avena-Lisina [M3], se obtuvieron los extractos alcaloides clorofórmicos de cada fermentado y se determinó cualitativamente por TLC que *Fusarium spp.* y *Ulocladium spp.* son capaces de producir *Swainsonina* en medio Avena [M2] y medio Avena-Lisina [M3] por fermentación en cultivo sumergido discontinuo.

Además, se desarrolló una técnica de HPLC para la cuantificación de *Swainsonina* para determinar las concentraciones de *Swainsonina* de la fuente vegetal y fungal, siendo *Fusarium spp.* el hongo con mayor capacidad de producción en cultivo sumergido discontinuo, con medio Avena [M2] con un valor de 793.7  $\mu\text{g SW/L}$  de medio y 87.67  $\mu\text{g SW/g}$  de células en peso seco y a partir de las hojas de *Astragalus arequipensis*, siendo la de menor concentración, 0.243  $\mu\text{g SW/g}$

Palabras Clave: *Swainsonina*, *Astragalus arequipensis*, TLC, HPLC, hongos endófitos, *Fusarium spp.*, *Ulocladium spp.*, cultivo sumergido discontinuo.

## ABSTRACT

In the present investigation *Swainsonine* was isolated, quantified and extracted from *Astragalus arequipensis* collected in the province of La Union in the Department of Arequipa- Peru, and from their endophytic fungi isolated and identified.

First, it was determined by TLC at  $R_f = 0.55$  that the chloroform alkaloid extract obtained by an alkaloid solid-liquid extraction method from the leaves of *Astragalus arequipensis*, had higher concentrations of *Swainsonine* compared to the stem and root extracts. Then fungal endophytes were isolated from *Astragalus arequipensis* and identified as *Fusarium spp.*, *Acremonium spp.*, *Mucor spp.*, *Ulocladium spp.* and *Penicillium spp.* The fungi were carried to batch fermentation in submerged culture with Czapek broth [M1], Oatmeal broth [M2] and Lysine broth [M3], then chloroform alkaloid extracts were obtained from each fermented and it was determined by TLC that *Ulocladium spp.* and *Fusarium spp.* are capable of producing *Swainsonine* in Oatmeal broth [M2] and Lysine broth [M3] by batch fermentation in submerged culture.

Furthermore, a HPLC technique was developed to evaluate the *Swainsonine* concentrations on plant and fungal source and fungal source, being *Fusarium spp.* The fungi with more production by batch fermentation in submerged culture production batch, with Oatmeal broth [M2]; the concentration was 793.7 mg SW / L of media and 87.67 mg SW / g cell dry weight and from the leaves of *Astragalus arequipensis*, being the lowest concentration, 0.243 mg SW / g

Keywords: *Swainsonine*, *Astragalus arequipensis*, TLC, HPLC, endophytes fungi, *Fusarium spp.*, *Ulocladium spp.*, batch submerged culture.

# CAPÍTULO I

## GENERALIDADES

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La región Andina de América del Sur, especialmente de Perú, es una de los más importantes centros de diversidad de cultivos en todo el mundo, muchos de estos cultivos poseen propiedades beneficiosas para el ser humano; ya sea a nivel nutricional o medicinal.

Sin embargo, no todas son beneficiosas; es el caso de las plantas tóxicas como las especies de *Astragalus* y en el País hay casos de intoxicación por consumo de estas leguminosas; teniendo diferentes nombres comunes como, garbancillo o *kontekonte*; es la leguminosa de mayor impacto en la ganadería de la Sierra del Perú (Espinoza *et al*, 1991).

Las especies del género *Astragalus* identificadas presentes en el País, son *Astragalus arequipensis*, *Astragalus cajamarquino* y *Astragalus garbancillo*; las cuales se encuentran documentadas por Edith Gómez Sosa. (Gómez *et al*. 2001, 2004, 2010).

Debido a la toxicidad del género *Astragalus*, en nuestro País no se le ha dado ningún uso positivo ya que, en el Perú es considerada una amenaza para el sector ganadero. Lamentablemente, la población opta por incinerar las zonas que se encuentran pobladas por el género *Astragalus*.

Las plantas son fuente de metabolitos secundarios. Uno de estos metabolitos secundarios son los alcaloides, los cuales son empleados para diferentes objetivos, específicamente, para el sector salud.

Con referencia a este tipo de interés por los alcaloides para beneficio humano es que se ha determinado que ciertas especies de *Astragalus* poseen *Swainsonina*, que es un alcaloide descubierto ya hace 30 años a partir de *Swainsonina canescens*.

La medicina tiene interés por la *Swainsonina*, gracias a sus diferentes actividades farmacológicas, como estimuladora del sistema inmunológico e intervención en la expresión de células tumorales. Por lo tanto, es un metabolito secundario de interés biotecnológico por su aplicación.

Las plantas son fabricas químicas de biosíntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios como los terpenos, alcaloides y flavonoides; sin embargo no son la única fuente de metabolitos, sino que los microorganismos que habitan a nivel intercelular de la planta son muchas veces los que contribuyen a la producción del metabolito y la tecnología de los biorreactores ha aprovechado esta capacidad de los microorganismos para la producción de metabolitos desarrollando métodos fermentativos.

Cierta especies vegetales poseen microorganismo endófitos, éstos colonizan los espacios intercelulares de las plantas (Firáková *et al.* 2007) y ésta relación se ha vinculado a la contribución de la producción de metabolitos secundarios en dichas plantas.

Por lo antes mencionado es que el presente trabajo constituye un aporte a la extracción, identificación y cuantificación de *Swainsonina* de interés biotecnológico a partir de una fuente vegetal nativa de la Región Arequipa; *Astragalus arequipensis* y a su vez explorar la bioproducción de dicho metabolito por fermentación en cultivo sumergido discontinuo de los hongos endófitos propios de dicha especie vegetal; y de esta forma contribuir no solo a revalorar la flora nativa sino también a proporcionar la tecnología necesaria para la producción del alcaloide en biorreactor, y evitar su uso indiscriminado, valorando la biodiversidad de nuestra región.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo General

Extraer, identificar y cuantificar *Swainsonina* a partir de *Astragalus arequipensis* (garbancillo) y de sus hongos endófitos por fermentación en cultivo sumergido discontinuo.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Obtener y evaluar por Cromatografía en Capa Fina (TLC), los extractos alcaloideos de las hojas, tallos y raíz de *Astragalus arequipensis* recolectada de la Región Arequipa
- Aislar e identificar los hongos endófitos de los tallos, raíz y rizósfera de *Astragalus arequipensis*
- Obtener los extractos alcaloideos de la fermentación en cultivo sumergido discontinuo de sus hongos endófitos en tres diferentes medios selectivos.
- Desarrollar una técnica de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para evaluar las concentraciones de *Swainsonina* de los extractos alcaloideos obtenidos a partir de *Astragalus arequipensis* y los medios de fermentación de sus hongos endófitos.

### 1.3. HIPÓTESIS

Ya que la medicina tradicional oriental atribuye propiedades medicinales a especies del género *Astragalus*, es posible que *Astragalus arequipensis* tenga metabolitos secundarios de interés como la *Swainsonina* y además pueda ser obtenida por método fermentativo en cultivo sumergido discontinuo de la biomasa fungal endófito de *Astragalus arequipensis*.

#### 1.4. VARIABLES E INDICADORES

**Tabla 1.** Variables independientes consideradas para la evaluación de resultados

	Variables Independientes	Indicadores
ESPECIE <i>Astragalus arequipensis</i>	Hojas	gramos
	Tallos	gramos
	Raíces	gramos
MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE SWAINSONINA	Método Extractivo (ME)	Cloroformo (CHCl <sub>3</sub> )
	Método Fermentativo (MF)	Cultivo Sumergido Discontinuo
MÉTODOS DE DETECCIÓN DE SWAINSONINA	Método Cromatográfico Cualitativo	Cromatografía en Capa Fina (TLC)
	Método Cromatográfico Cuantitativo	Cromatografía Líquida de Alto Performance (HPLC)

**Tabla 2.** Variables dependientes consideradas para la evaluación de resultados

	Variables Dependientes	Indicadores
EXTRACCIÓN DE SWAINSONINA	Constante coeficiente de retención (Rf) de <i>Swainsonina</i>	0.53-0.55
	pH	4-8
HONGOS Y FERMENTACIÓN	Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )	>0 g/hora
	Concentración de <i>Swainsonina</i> partir de <i>Astragalus. arequipensis</i>	>0ugSW/g
PRODUCCIÓN DE SWAINSONINA	Concentración de <i>Swainsonina</i> por Litro de Medio de fermentación	>0ug SW/L
	Concentración de <i>Swainsonina</i> por gramo de células fungales en peso seco	>0ug SW/g

# CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Astragalus* spp. Como Especie Vegetal

La especie *Astragalus arequipensis* se encuentra registrada en el Herbario del Museo Parisino con el nombre *Astragalus arequipensis* Vogel, con el número de registro P00542165 (Figura 1), revisada por la bióloga argentina Edith Gomez-Sosa (1992) se encuentra clasificada de la siguiente manera:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Familia: Fabaceae
- Género: *Astragalus*
- Especie: *Astragalus arequipensis*

La mayoría de leguminosas del género *Astragalus* son plantas perennes con o sin tallo, las hojas son alternas y pinnato-compuestas, las flores son papilionadas en forma variable presentes en racimos axilares y su fruto es una legumbre (Montero *et al.* 2006), éste último órgano característico de las leguminosas, deriva de un ovario compuesto por un solo carpelo el cual, en la madurez, se abre longitudinalmente en dos valvas, lo que indica que su dehiscencia ocurre por la nervadura media y por la unión carpelar.

No obstante, existe una inmensa variedad de formas y tamaños de frutos en la familia. De hecho, hay especies con frutos con tendencia a la indehiscencia, es decir que no se abren en la madurez, y en ocasiones el cáliz se transforma en una estructura de dispersión (Watson *et al.* 2007).

**Figura 1.** Espécimen vegetal de *Astragalus arequipensis* que almacena el Herbario del Museo Nacional de Historia Natural<sup>1</sup>



*Astragalus arequipensis*  
Veg.  
Vidal E. Gómez-/13  
Determinavit: Buskat 1958

G. Mandon. *Plantae Andium*  
*Bolivianum*  
N° :110 *Astragalus*  
Alt: 3000-4000msnm

Herbier Museum  
Paris  
P02922434

<sup>1</sup> Pagina Web de la Colección de Especímenes del Herbarium of Museum National d'Histoire Naturelle Parisiensis, (consultada el 24/08/2012)

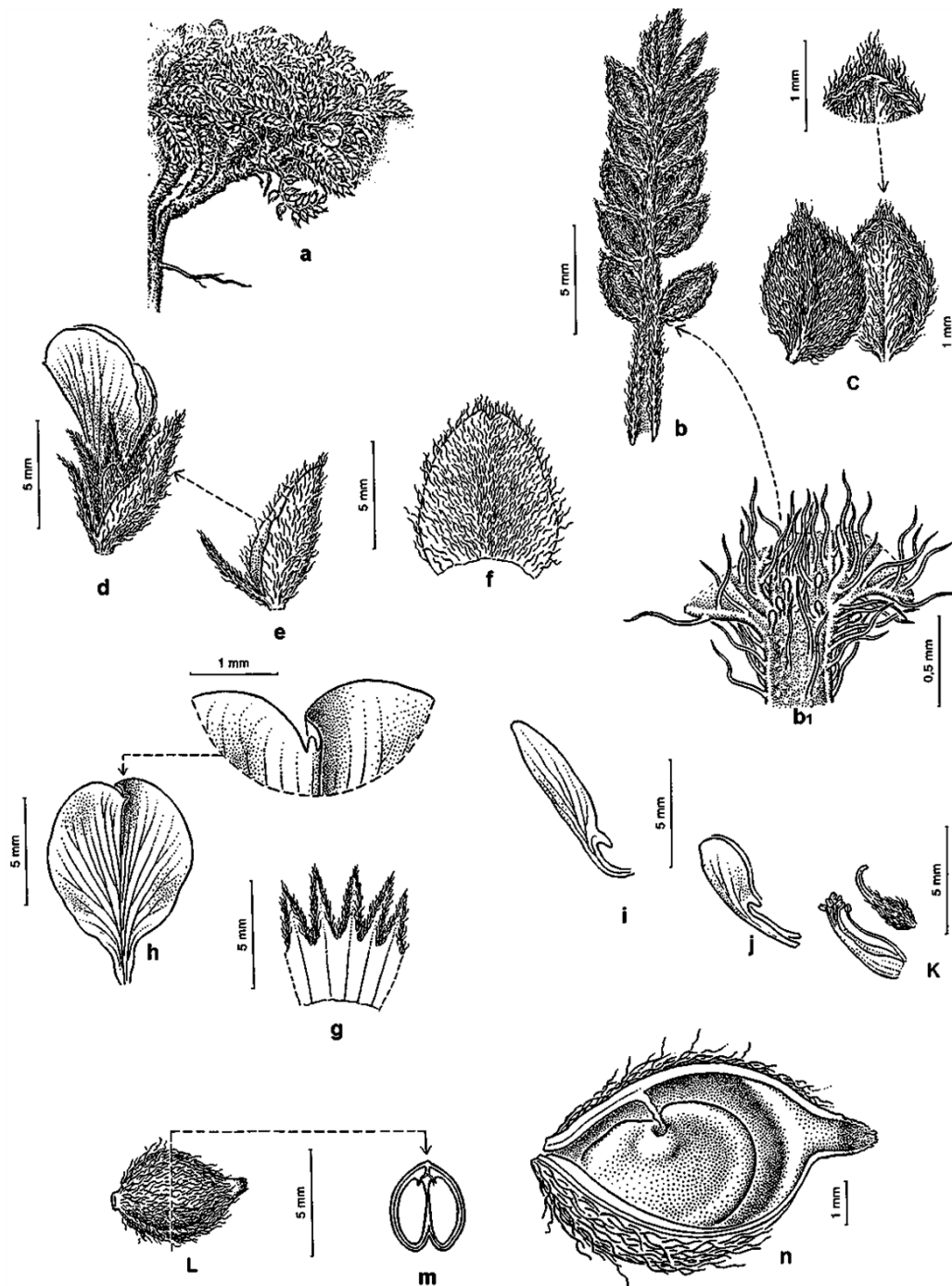
*Astragalus arequipensis* es una hierba perenne, seríceo-vellosa; sus órganos poseen las siguientes características según Sosa (1992):

- Ramas de 30-70 cm, estípulas membranosas, seríceo-vellosas.(Figura 2a)
- Hojas imparipinadas de 0.3 0.5 cm, con pecíolo de 0,3-0,5 cm, acanalado (Figura 2b)
- Crasiúsculos elípticos obtusos, blanco-seríceos, con pelos glandulares en su inserción (Figura 2b<sub>1</sub>).
- 15-17 folíolos, de 3 x 2,5-3 mm (Figura 2c)
- Flor erguida, blanca a amarillenta de 0.4-1.0 cm (Figura 2d)
- Brácteas elípticas de 3 mm y bractéolas de 2 mm, seríceo-vellosas (Figura 2e)
- Cáliz seríceo-velloso, con pelos glandulares en su inserción, tubo de 3,5 mm, dientes de 1,5 mm con superficie interna glabra (Figura 2g)
- Estandarte subcircular, oapiculado, de 8-9 x 7 mm
- Alas lineares de 8,5 x 1 mm (Figura 2i)
- Quilla obtusa de 5,5-6 mm(Figura 2j)
- Ovario velloso, estilo glabro con ápice incurvo; óvulos 2.; androceo y gineceo (Figura 2.k)
- Legumbre blanco-vellosa de 3 x 2 mm, subcoriácea, subglobosa con apículo de 1 mm; ligera invaginación dorsal sólo hacia la base, seguida de un reborde membranoso de 0,5 mm (Figura 2.L, 2 m)
- Semillas 1-2, reniformes, lisas tubo de 3,5 mm, dientes de 1,5 mm (Figura 2.n)

Esta especie crece en los parajes alto andino de Perú, Bolivia y Argentina entre 3,000 a 5,000 m.s.n.m y son resistentes a sequías (Espinoza *et al.*, 1991)

Estas plantas experimentan ciclos poblacionales extremos, explotando durante las temporadas de lluvias y muriendo durante los años de sequía extrema. Sin embargo algunas especies son relativamente estables (Ralphs & James, 1999). Pero es importante saber que las semillas persisten latentes por 50 años (Knight & Walter, 2003).

Figura 2. Fisionomía de *Astragalus arequipensis*<sup>1</sup>



(a) aspecto general (b) hoja con detalle de pelos glandulares en su inserción (b1) detalle del crasiúculo (c) folíolo (d) flor (e) bráctea (f) estípula (g) cáliz, vista interna (h) estandarte con detalle del ápice (i) ala (j) quilla (k) androceo y gineceo (L) fruto (m) sección transversal del fruto (n) sección longitudinal del fruto con invaginación dorsal aólo hacia la base, seguida de un reborde membranoso y son semilla. <sup>1</sup> Gomez 2010

El género *Astragalus*, es el género más grande en la tierra (Mabberley *et al.* 1997, *Astragalus Homepage et al.* 2012). Abarca a más de 2,500 especies siendo su hábitat muy extenso: Sudoeste Asia (1000-1500 spp.), los Himalayas (500 spp.), Norteamérica occidental (400-450 spp.) y a lo largo de América del sur (100 spp.) (*Astragalus Homepage et al.* 2012).

Las especies del género *Astragalus* identificadas presentes también en el País, son *Astragalus arequipensis*, *Astragalus cajamarquino* y *Astragalus garbancillo*; las cuales se encuentran documentadas por Edith Gómez Sosa. (Gómez *et al.* 2001, 2004, 2010) y *Astragalus dillinghamii*, registrada por Cronqui (1992)

En Bolivia, Perú y Chile las especies de este género son consideradas venenosas para los herbívoros (Montero *et al.* 2006). Entre 1969 y 1987, en la Sierra Central del Perú en la SAIS Tupac Amaru ubicada en Pachacayo , la tasa anual de mortalidad sobre el total de animales, por consumo de especies del género *Astragalus* fue de 0,08% y la tasa de mortalidad sobre el total de animales muertos por factores nutricionales fue de 4.97%. (Tabla 3).

Lamentablemente no se tienen datos estadísticos recientes, pero esta afección también fue reportada por pequeños productores de la Sierra Norte y de la Sierra sur oriental, en donde la intoxicación ocurre prácticamente en la cuarta parte de los animales afectados por el consumo de plantas tóxicas. Las plantas venenosas son el principal problema de las pérdidas económicas en la industria ganadera (James *et al.* 1994). Estas plantas retienen una parte de su toxicidad aun cuando están secas. Torell (2000), menciona que los animales llegan a depender tanto de éstas, que se vuelven adictos y terminan como consumidores crónicos.

Knight & Walter (2003) afirman que los animales desarrollan cierta preferencia hacia estas plantas, aparentemente porque tienen buen sabor, sin llegar a existir dependencia hacia la planta por lo que no se puede hablar de adicción.

Según Montero (2006), la dosis letal media del *Astragalus dillinghamii* en ratones *Mus musculus balb/c-53* de sexo masculino es de  $111.7 \pm 4.82$  g/kg .

**Tabla 3.** Cuadro de tasa de mortalidad anual de animales afectados por procesos nutricionales y garbancillo en la SAIS Tupac Amaru durante los años 1969-1987<sup>1</sup>

CAUSA DE MUERTE	N° DE ANIMALES MUERTOS	TASAS DE MORTALIDAD (%)		
		Sobre la población	Sobre el total de animales muertos	Sobre el total de animales muertos por factor nutricional
<b>Total</b>	303 358	14.70 ± 3.58	-	-
<b>Nutricional</b>	49 624	1.91 ± 0.87	15.50 ± 3.16	
<b>Garbancillo</b>	2 201	0.08 ± 0.06	0.78 ± 0.54	4.97 ± 3.93

<sup>1</sup>Espinoza *et al.* (1991)

A pesar de los efectos perjudiciales de la ingesta de especies del género *Astragalus*, en dosis controladas y menores a las dosis letales, puede ser beneficiosa para la salud como la cultura oriental ha intentado demostrar ya que es una de las hierbas más importantes en China, considerada como medicinal.

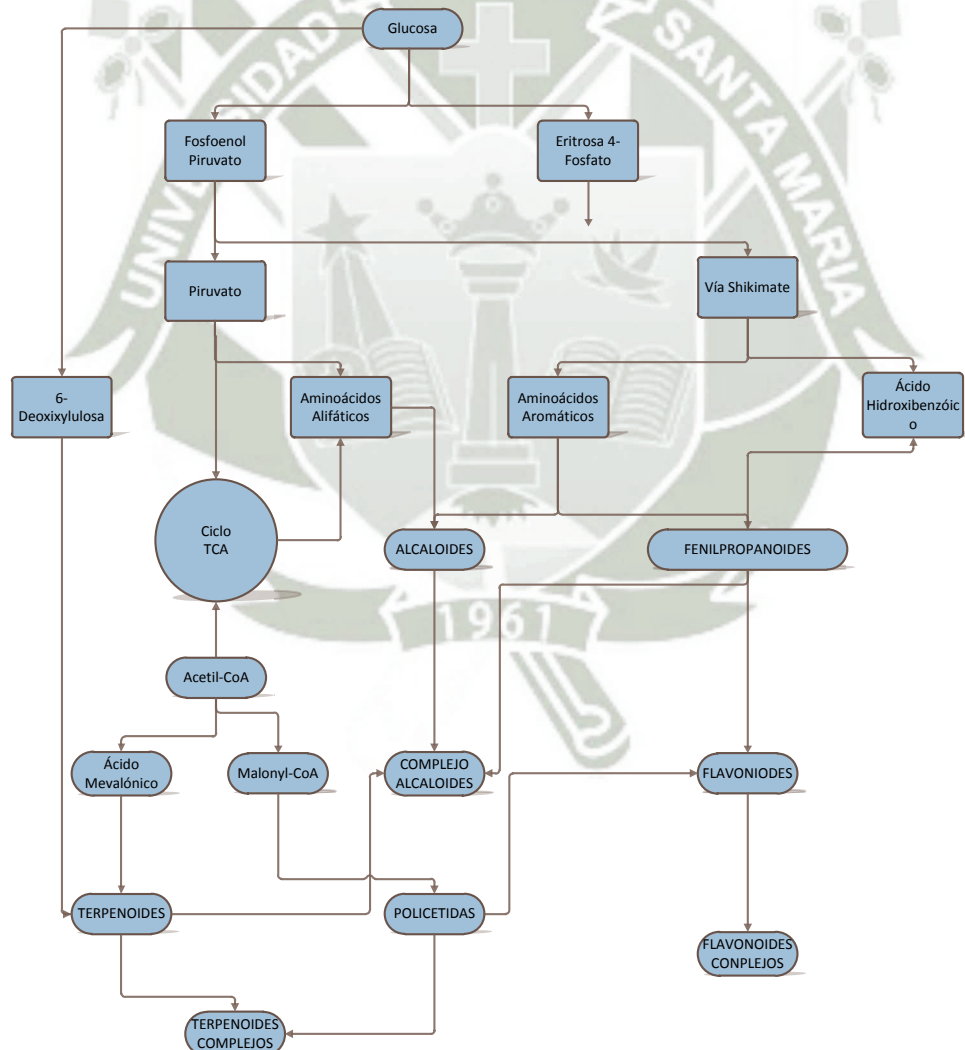
Las especies encontradas en China como *Astragalus membranaceus* y *Astragalus mongholicus* se encuentran registradas en *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, este es un compendio de medicinas tradicionales de China. Por siglos esta cultura la ha empleado para diferentes padecimientos.(Hao *et al.* 2004)

## 2.2. Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son una amplia gama de compuestos orgánicos de diferentes orígenes, que pueden ser inducidos por respuesta a estrés o como su proceso metabólico. Son considerados compuestos no esenciales para la estructura celular o supervivencia del organismo que la produce, pero normalmente cumplen con el rol de protección del organismo, ya sea planta, animal o microorganismos contra un estrés biótico o abiótico. (Hattenschwiler *et al.* 2000).

En cuanto a los factores que intervienen en la formación de metabolitos secundarios son los ambientales tales como el ya mencionado estrés abiótico o biótico, también se considera el balance nutricional-carbono y los factores genéticos tales como el genotipo y ontogénesis que usualmente regulan la biosíntesis de los metabolitos secundarios en plantas (Lila *et al* 2006). La figura 3 describe la formación simple de metabolitos secundarios en el cual se parte del carbohidrato más común, la glucosa y donde se puede apreciar la interrelación entre ellos. La primera etapa en la formación de un metabolito secundario implica la formación de una enzima bifurcadora que dirige una cierta cantidad del metabolismo primario hacia el metabolismo secundario.

**Figura 3.** Vías de formación de los metabolitos secundarios <sup>1</sup>



<sup>1</sup>Quored *Metabolitos Secundarios* ([www.urlg.com](http://www.urlg.com)) fecha de consulta 11oct/2012

De acuerdo a la biosíntesis de los metabolitos secundarios, cada uno de ellos puede tener una estructura característica, por lo tanto se encuentran agrupados en: policétidos, metabolitos secundarios de ácidos grasos, terpenoides, esteroides, fenilpropanoides y componentes nitrogenados (alcaloides, aminoácidos no proteínicos, glucósidos cianógenos y glucosinolatos)

Las plantas son consideradas famosas como fabricas químicas para la biosíntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios. Muchos de estos químicos son ampliamente utilizados en la medicina, para teñidos, esencias y pesticidas; las cuales tienen una gran importancia económica (Yuan Zhi-lin *et al.* 2007).

Además, los compuestos de origen vegetal como los terpenos, alcaloides y flavonoides son ampliamente usados como drogas o como suplementos alimenticios, para curar o prevenir una serie de enfermedades; ya sea por su actividad antioxidante o antimutágena (Rispaill *et al.* 2005).

Las fuentes de origen vegetal no son las únicas, las de origen microbiano es otra de las opciones e incluso la de mayor rendimiento gracias a la tecnología de la fermentación y los biorreactores; ya que se aprovecha de la relación microorganismos-planta. Si una planta produce un alcaloide muchas veces puede ser debido a que a nivel intercelular haya microorganismos contribuyentes a ésta metabolización.

En cuanto a estas interacciones, de manera general se expone que si dos o más especies que coexisten en un lugar no se afectan mutuamente la relación es *neutralismo*. En el ambiente esto ocurrirá cuando se da en baja densidad de la población, satisfaciendo los requerimientos de desarrollo, abundancia de los nutrientes. (Manacorna *et al.* 2005). Cuando algo de esto se modifica, las especies comienzan a interactuar, estas interacciones pueden ser benéficas o sinérgicas (Manacorna *et al.* 2005). Estas interacciones microbianas se dan a nivel rizósfera (raíces), hojas (filósfera) o espermosfera (semillas), y a nivel interno (endófito).

*Los microorganismos endófitos* son organismos inherentes a las plantas que establecen una asociación específica con su hospedero para mutuo beneficio.

Existen sin-número de especies vegetales de importancia económica que interactúan con especies de hongos endófitos. La planta provee al hongo alimento, hospedaje y protección; por su parte, aunque no hay certeza sobre los mecanismos de acción, los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo abiótico (salinidad, acidez) o biótico (ataque de plagas). Esta simbiosis otorga mayor habilidad competitiva a las plantas y permite una plena expresión de su potencial genético traducido en altas tasas de germinación, mejor densidad, más biomasa en los tejidos y mayor producción de semilla. La relación entre el hongo y la planta se considera mutualista (Clay *et al.* 1986,1887).

Partida (2011) divide los microorganismos endófitos en:

- *Micorrizas*: Los hongos micorrizas forman asociaciones prácticamente ubicuas con las raíces de la planta. Los recursos del suelo son tomados por los hongos y canjeados por los asimilados derivados de plantas, también tiene múltiples efectos sobre la resistencia de la planta.
- *Fijadores de nitrógeno*: son microorganismos de las plantas de la familia Fabaceae y bacterias (*Rhizobium*) y géneros relacionados, todos pertenecientes a la Rhizobiales orden que infectan raíces de las plantas donde hay nódulos. Proporcionan a la planta de nitrógeno fijado de la atmósfera.
- *Tipo I de hongos endófitos clavicipitaceos*: son un grupo de la familia *Clavicipitaceae* que se transmite verticalmente a través de las semillas de sus huéspedes y por lo tanto causan una infección sistémica de ciertas hierbas. Debido a la producción de alcaloides, estos endófitos contribuyen directamente a la resistencia de sus plantas huésped a los herbívoros, pero numerosos estudios también han informado de efectos sobre la sequía y la tolerancia a las inundaciones, la producción de biomasa y, en consecuencia, la capacidad competitiva de la hierba.
- *Tipo II hongos endófitos*: Hongos no sistémicos, transmisión horizontal, recién se están descubriendo. Comprenden especies tanto de Ascomycota y Basidiomycota.

- *Endófitos bacterianos*: Incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno no noduladoras que infectan a los brotes, así como otras bacterias que ejercen múltiples efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la planta huésped. Estas bacterias forman el grupo funcional grande de "planta-bacteria promotora del crecimiento" (PGPB).

Por lo tanto, debemos asumir que la verdadera biodiversidad de bacterias endofíticas que infectan a las plantas silvestres en la naturaleza está tan gravemente subestimado como es la biodiversidad de tipo II hongos endófitos.

Christensen (1993) demostró una gran variabilidad en la naturaleza y producción de estos metabolitos secundarios por diferentes cepas de endófitos. Las gramíneas forrajeras son quizás el grupo vegetal en el que más se ha reportado la presencia de hongos endófitos, asociados a los géneros *Lolium*, *Festuca* y *Brachiaria*.

Los microorganismo endófitos, en especial los hongos endófitos son generalmente elegidos de entre los que han alcanzado el llamado GRAS (*Generally Recognized As Safe-Reconocidos como Inofensivos*) por parte los EE.UU. *Food and Drug Administration* (FDA-Administración de Alimentos y Drogas)(Demain *et al* 1999).

Por lo tanto, se emplean los microorganismos para producción de metabolitos secundarios en reemplazo a las fuentes vegetales mediante la fermentación y uso de biorreactores.

### 2.3. Alcaloides

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos; de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes en dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación. Generalmente están presentes en forma de ésteres: tartratos, maleatos, citratos, oxalatos, benzoatos, etc. También aparecen como amidas, glicósidos y como aminas libres.

Se conocen unos 6000 compuestos presentes en más de 100 familias de fanerógamas, fundamentalmente en angiospermas: amarilidiáceas, liliáceas, lauráceas, magnoliáceas, papaveráceas, rutáceas, solanáceas, también en familias de hongos y en anfibios.

En el caso de los alcaloides en las plantas, que es de mayor incidencia; estos metabolitos secundarios se encuentran en la corteza, raíces, hojas y flores. Y se localizan preferentemente en zonas de intensa actividad celular ya que son metabolitos secundarios procedentes de materiales de desecho de las células.

La función de los alcaloides en las plantas no es muy clara, existen algunas sugerencias (Rodríguez *et al.* 2009) sobre el rol que juegan estas sustancias en los vegetales:

- Facilitan el transporte en la planta, pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado o para transporte del mismo; en el caso de las *Solanaceas*, los ésteres del tropano se forman en las raíces y son transportados a las partes aéreas donde pueden ser hidrolizados.
- La microquímica ha permitido mostrar en forma general, que los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; esto nos permite pensar que los alcaloides cumplen una importante función como es la de proteger a la planta, por su sabor amargo del ataque de insectos.
- Los alcaloides sirven de reguladores del crecimiento, se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente durante la germinación de las plantas de cebada.
- Mediante técnicas biotecnológicas, las plantas que acumulan alcaloides en las partes aéreas, se han producido sin alcaloides y la pérdida de alcaloides en el vástago no impide el desarrollo de la planta, lo cual sugiere que los alcaloides no son esenciales para los vegetales. Si bien, la presencia de alcaloides no es vital para la planta, estos deben de participar en secuencias metabólicas y no son solamente productos de desecho del metabolismo.

Las masas moleculares de los alcaloides normalmente varían entre 100 y 900 g/ mol. Cuando poseen un nitrógeno es que pertenece al grupo amino por lo tanto le confiere propiedades alcalinas y pueden comportarse como sales o ácidos de acuerdo al pH, la función de la amina acompañada de otros grupos funcionales con alcoholes, ésteres, fenoles, mas función fenol es comportarse como anfóteros, esto quiere decir que si funciona como amina son alcaloides base y si funciona como fenol son alcaloides ácidos.

La presencia de oxígeno en las moléculas le confiere ciertas propiedades fisicoquímicas a los alcaloides. Si son oxigenados son sólidos y cristalizable, incoloros e inodoros, rara vez coloreados. Si no son oxigenados son líquidos, volátiles, olorosos y arrastrables con vapor de agua. Y cuando el porcentaje de oxígeno es bajo y el peso molecular elevado, el alcaloide está en estado líquido o se cristalizan difícilmente.

Su basicidad es variable, al estado base y en disolución son sensibles al calor, luz y  $O_2$ ; permite formar sales con ácidos minerales (clorhidrato, sulfatos, nitratos) u orgánicos (tartratos, sulfamatos, maleatos). Sus sales son sólidas y fijas. Forman sales dobles con Hg, Au, Pt I y metales pesados.

Reaccionan con los ácidos dando sales solubles en agua. Las bases libres son insolubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares o poco polares y en alcoholes

La nomenclatura de los alcaloides no se encuentra sistematizada, el nombre suele derivar de su origen (nombre de la planta) o de su descubridor. El nombre termina en –ina, reflejando su carácter de amina. Por ejemplo: *Estricnina*; presente en las semillas de *strychnos*, *quinina*; presente en la corteza de la quina, *cocaína*; presente en la coca, *morfin*; morfeo es el dios griego del sueño

Arango (2008) clasifica los alcaloides (Figura 4) en alcaloides derivados de la ornitina y lisina, alcaloides derivados de la fenilalanina y tirosina, alcaloides derivados del triptófano, alcaloides de la histidina y de metabolismo terpénico, derivados de bases púricas (xantánicas), glicósidos cianogénicos (derivan de aminoácidos Val, Phe, Tyr) y derivados del ácido antranílico.

**Figura 4.** Esquema de la clasificación de Alcaloides<sup>1</sup>

<b>Clasificación De Alcaloides</b>	Derivados de Ornitina y Lisina (Aminoácidos Alifáticos)	Tropánicos
		Pirrolidínicos
		<b>Indolizidínicos</b>
		Δ1piperidínicos
		Quinoliciidínicos
	Derivados De La Fenil Alanina Y Tirosina	Aminas Simples O Fenil Etil Aminas
		Alcaloides Isoquinoleicos
		Benciilisoquinileínas o Alcaloides Morfínicos
		Aporfinoides
	Derivados Del Triptofano (Alcaloides Indólicos)	Triptaminas Simples
	Triptaminas Complejas No Isoprénicas	
	Riptaminas Complejas Isoprénicas	
	Del Triptofano Con Núcleo Quinoleico	
Derivados Del Ácido Antranílico		
Derivados De La Histidina	Imidazólicos	
Derivados Del Metabolismo Terpénico	Alcaloides Sesquiterpénicos	
	Alcaloides Diterpénicos	
	Alcaloides Esteroidales	
Derivados De Bases Púricas (Xantánicas)		
Glicósidos Cianogénicos (derivan de aminoácidos Val, Phe, Tyr)		

<sup>1</sup> Cuadro resumen de Arango C. J. (2008) *Alcaloides y compuestos Nitrogenados*. Universidad de Antioquia. Medellín (19-78)

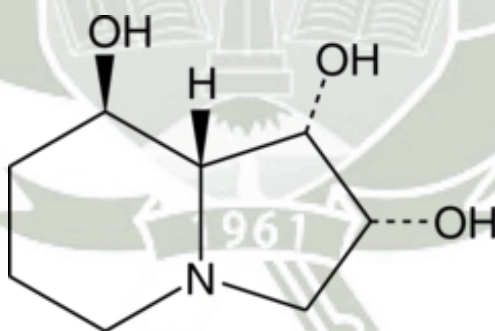
Los alcaloides indolizidínicos en su estructura tienen un núcleo indol. Aparecen en la piel de ciertos anfibios (pumilitoxinas). Son de interés por la propiedad de inhibición de las glicosidasas. Su extracción es compleja; se han encontrado en Fabaceae la *Swainsonina* y *Castanospermina*, la *Swainsonina* también es elaborada por ciertos hongos (*Rhizoctonia*, *Metarhizium*). Además, se han detectado en otras familias como Orchidaceae (*Dendrobium*) y Convolvulaceae (*Ipomoea*).

Los alcaloides son sustancias interesantes por sus actividades farmacológicas que se ejercen sobre los más variados terrenos: SNC, SNV (simpático y parasimpático), cardiovascular, anestesia, tumores, enfermedades parasitarias y enfermedades virales (Cassiano *et al.* 2010)

#### 2.4. Swainsonina

El compuesto posee una estructura química polihidroxihidratada de un anillo de 6 carbonos fusionado con un anillo de 5 carbonos, con una estructura tipo indolizidínicos (Figura 5).

Figura 5. Estructura molecular de *Swainsonina*<sup>1</sup>



<sup>1</sup>MSDS de *Swainsonina*, Cayman Chemical, (2012)

*Swainsonina* (1, 2,8-trihidroxiocetahidroindolizina) (Tabla 4) es un alcaloide que pertenece a la familia de las indolizidínicos que fue originalmente aislado de una planta australiana denominada *Swainsonina canescens*.

**Tabla 4.** Información básica acerca de *Swainsonina*.

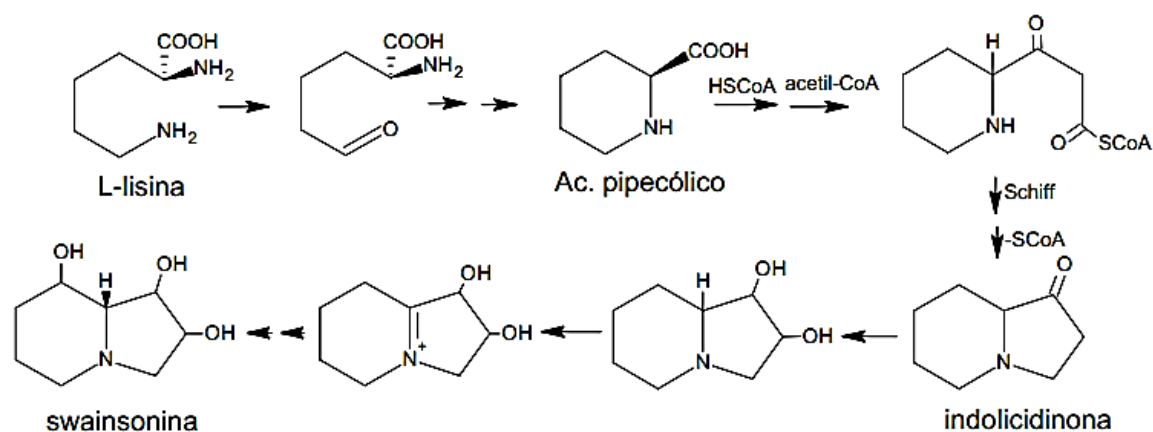
<b>Sinónimos</b>	1, 2, 8-indolizinetriol, octahydro(1S-(1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ , 8 $\alpha$ , 8 $\alpha$ , $\beta$ )) (-)-swainsonine Tridolgosir 8alpha, beta-indolizidine-1alpha 2alpha, 8beta-trio swainsonine from Locoweed swainsonine from Metarhizium anisopliae swainsonine from Rhizotonia leguminicola indolazine alkaloid
<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>8</sub> -H <sub>15</sub> -N-O <sub>3</sub>
<b>Peso Molecular</b>	173.2 g/mol
<b>N° CAS</b>	72741-87-8
<b>Punto de Ebullición</b>	353.32 °C a 760 mmHg
<b>Densidad</b>	1.382 g/cm <sup>3</sup>
<b>Ecotoxicidad</b>	Muy baja

<sup>1</sup>Material Safety Data Sheet, Santa Cruz Biotechnology, Inc, *et al* (2010).

En cuanto a los alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos, en éste caso la lisina; (Figura 6) con núcleo indolizidínico como la *Swainsonina* comprenden la fusión de dos anillos uno de seis miembros y el otro de cinco, el átomo de nitrógeno se encuentra en los anillos de fusión, se puede pensar que se forman como un híbrido entre alcaloides pirrolicidinas y quinolicidinas, pero su biosíntesis demostró que son derivados del aminoácido lisina vía ácido pipercolico.

La lisina es el aminoácido precursor de la *Swainsonina*, la lisina puede ser biosintetizada por la ruta del diaminopimelato (DAP) (Figura 7) en hongos o por la ruta de  $\alpha$ -aminoadipato (AAA). Durante su biosíntesis se pueden formar metabolitos tales como el ácido picolínico y ácido dipicolínico, los cuales son isómeros del ácido nicotínico y el ácido quinolínico, respectivamente.

Figura 6: Biosíntesis de la *Swainsonina*<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Michael. J.P (2007). *Indolizidine and quinolizidine alkaloids*. Nature.Prod. Rep. (24), 191-222

Cuando la lisina heterocicliza, forma la lactama de la lisina (Esqueleto base: perhidroazepina). Esta lactama es la base de las bengamidas. En cuanto a la alisina el producto de transaminación del amino terminal de la lisina. La desmosina proviene de este intermediario.

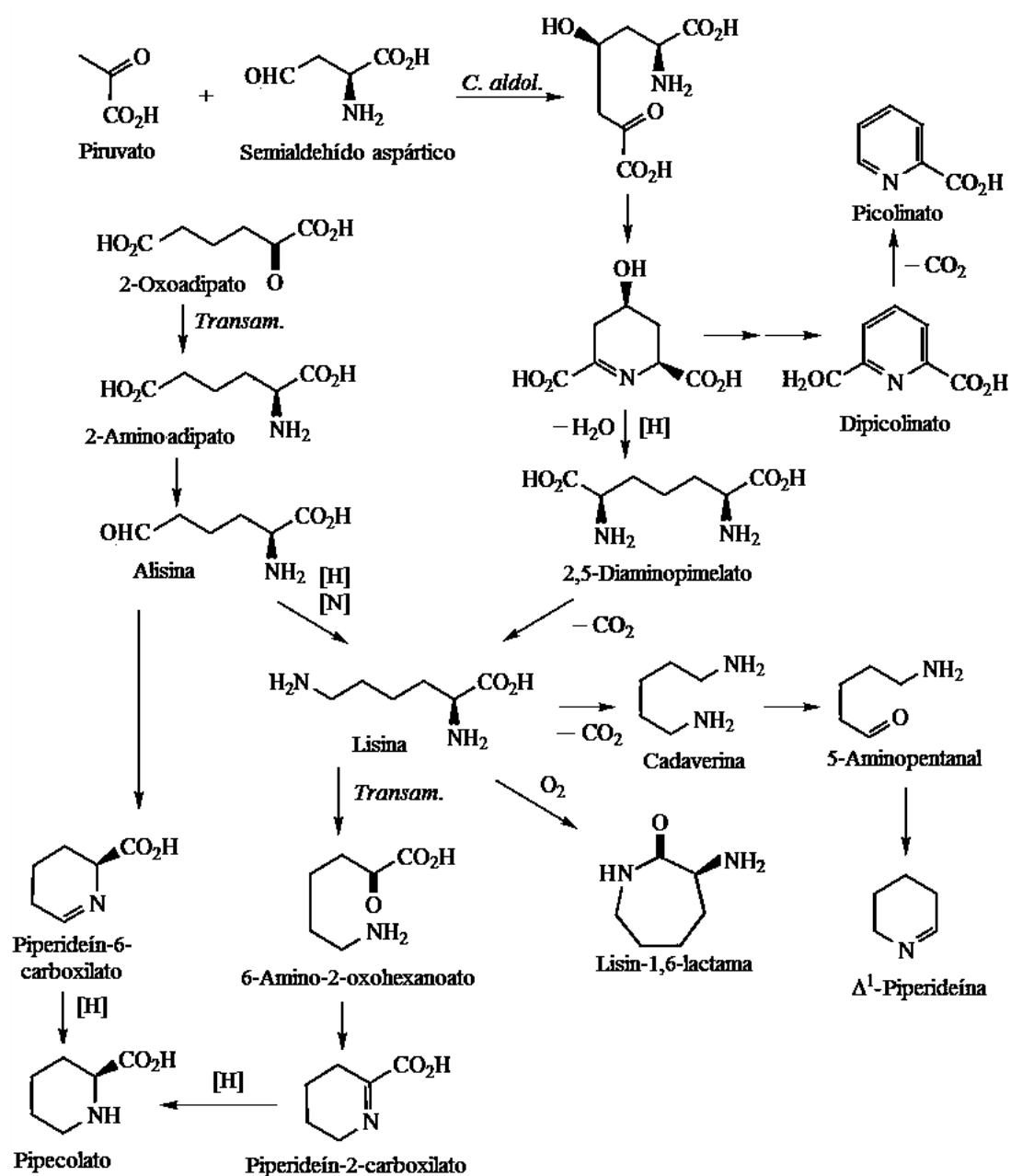
La alisina puede formar el ácido pipercolico, el cual es un componente de la ascomicina y la rapamicina. La descarboxilación de la lisina produce la cadaverina, la cual por heterociclización produce  $\Delta 1$ -piperideína. Este anillo puede formar varios sistemas de alcaloides. Los alcaloides de la lisina se pueden clasificar como derivados de la cadaverina y derivados del pipercolato como la *Swainsonina*.

El *locoísmo*, enfermedad producida por plantas que contienen alcaloides, es el principal problema ocasionado por plantas venenosas en el Oeste de Estados Unidos, son once especies de *Astragalus* y de *Oxytropis* que causan *locoísmo* debido a esto se les denomina *locoweeds* (hierbas locas) a las leguminosas de estos géneros con estas propiedades. (Ralphs & James *et al.* 1999).

Y la *Swainsonina* es uno de los alcaloides en mayores concentraciones, así como otros compuestos que también provocan efectos neurotóxicos. La *Castanospermina* es el otro alcaloide que también provoca otros efectos secundarios.

Hacia 1982, se encontró *Swainsonina* en *Astragalus lentiginosus*, especie que crece en Utah (Molyneux *et al* 1982). Luego en 1985 se encontró que en una especie que crece en el oeste de Texas-Estados Unidos, denominada *Astragalus emoryanus* es también una excelente fuente de *Swainsonina*.

Figura 7. Ruta del metabolismo de la lisina<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Michael. J.P.(2007). *Indolizidine and quinolizidine alkaloids*. Nature. Prod. Rep.(24),191-222

En China, la *Swainsonina* fue aislada por primera vez en 1989 de *Oxytropis ochrocephala*. Seguidamente fue también aislada de *Astragalus variabilis* por Huang (1992), *Astragalus strictus* por Zhao (1993), *Oxytropis kansuensis* por Tong (2001), *Oxytropis glacialis* en Tibet por Tan (2002), *Oxytropis glabra* por Ge (2003), y *Oxytropis falcata* por Huo (2008). El contenido de *Swainsonina* de *Oxytropis kansuensis*, *Astragalus variabilis*, *Astragalus strictus*, *Oxytropis sericopetala*, y *Oxytropis glacialis* fue analizado y semicuantificado en TLC. (Zhao *Et al* 2011)

Se han encontrado otras fuentes de *Swainsonina*, no sólo vegetales; es el caso de *Rhizoctonia leguminicola*, que demuestra que también es capaz de producir el *Swainsonina*. (Schneider *et al.* 1982)

Los descubrimientos más recientes de contenido de *Swainsonina* son; *Astragalus strictus*, *Astragalus hamiensis*, *Oxytropis glabra*, *Oxytropis kansuensis*, *Oxytropis ochrocephala*, *Oxytropis glacialis*, *Oxytropis deflexa*, y *Oxytropis latibracteata* (Liu *et al* 2009). Los resultados demostraron que el contenido de *Swainsonina* en *Oxytropis kansuensis* de 0.148 mg/g fue el más alto de todas las especies chinas y la de *Astragalus hamiensis* con 0.044 mg/g fue la más baja de todas las especies. El contenido promedio de *Swainsonina* en florecimiento fue de 0.139 mg/g, la cual fue el más alto en todas la etapa fenotípica, Mientras que el contenido promedio en las flores fue 0.162 mg/g, la cual fue la más alta en toda la planta (Zhao *et al.* 2011).

Acerca de las propiedades de la *Swainsonina*, es un inhibidor potente, competitivo y específico de varias glucosidasas, incluyendo la  $\alpha$  - glucosidas lisosómicas implicadas en el procesado de las glicoproteínas. Esta importante actividad inhibidora hace que la *Swainsonina* posea diversas propiedades biológicas que la convierten en un valioso agente terapéutico potencial para el tratamiento de diversas enfermedades. Entre las propiedades asociadas a este alcaloide están la actividad antiviral, antitumoral, antimalaria, antiinflamatoria, inmunosupresora y antidiabética. (Lo Re *et al.* 2008).

Así como también ha sido probado como tratamiento para glioma y carcinoma gástrico. Sin embargo, una prueba clínica en fase II de GD0039 (una sal hidroclicórica de *Swainsonina*) en 17 pacientes con carcinoma renal no fue satisfactoria. Su actividad contra tumores se atribuye a la estimulación de macrófagos.

También, existen estudios del alcaloide como adyuvante de quimioterapia y otras terapias (Goss *et al.* 1994). En ratones, *Swainsonina* reduce la toxicidad de doxorubicin, que es una droga empleada en la terapia del cáncer; esto indica que los pacientes que se someten a este tratamiento, con la administración del alcaloide soportarían mayores concentraciones de doxorubin. El ensayo en ratones sobre la reposición de la médula ósea dañada, se ha comprobado que *Swainsonina* es capaz de promover este proceso de restauración.

Se ha demostrado que el alcaloide *Swainsonina* es un inhibidor específico de la  $\alpha$ -manosidasa (Kang *et al.* 1983) (Dawn, 1984). En adición, se ha determinado que este alcaloide es un potente inhibidor del proceso de las glicoproteínas (Arumugham *et al.* 1983) (Cenci *et al.* 1983) (Elbein, 1980,1981, 1983,1984) (Gross *et al.* 1983)

En relación a la participación del alcaloide en vías metabólicas y de síntesis de compuestos. La *Swainsonina* inhibe a las glucósido hidrolasas, específicamente en las uniones -N de glicosilación. Inhibe a la alfa-manosidasas II del aparato de Golgi, por lo tanto provoca glúcidos híbridos (Goss *et al.* 1994). Esto quiere decir que interviene en la ruta metabólica de glicosilación de carbohidratos N-glicoproteínas. (Tabla 5)

La glicosilación o glucosilación proteica es el proceso de adición de carbohidratos a una proteína. El destino de las proteínas a las que se le ha añadido una cadena de glúcidos (glicoproteínas) es ser secretadas o formar parte de la superficie celular, aunque algunas proteínas nucleares y citosólicas también están glicosiladas. Los carbohidratos de las glicoproteínas tienen funciones relacionadas con el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático rugoso (REr), en el destino de la proteína en los compartimentos intracelulares y en las interacciones célula-célula. (Gonzales *et al.* 2008)

Hay dos familias de glicoproteínas, N-glicoproteína: los carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina (glutamina).y O-glicoproteína: en este caso, el punto de unión es el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y treonina. Los carbohidratos que se unen directamente a estos sitios son normalmente N-acetilglucosamina y O-acetilgalactosamina, respectivamente (Gonzales *et al.* 2008).

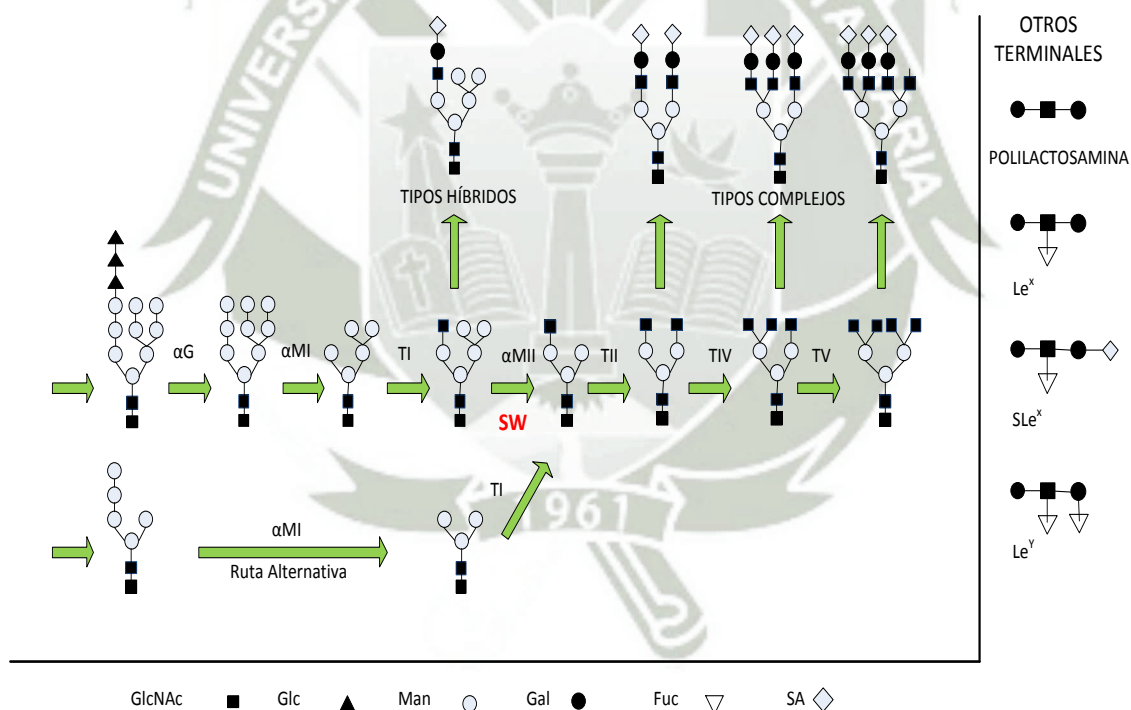
**Tabla 5.** Función de cada unidad de glicano que se une a la proteína en formación en el Retículo Endoplásmico Rugoso <sup>1</sup>

Glicano	Modo de generación	Función
Glc3Man9GlcNAc2	Transferido por Complejo oligosacariltransferasa (OST)	El glicano es transferido por OST desde OS-PP-Dol
Glc2Man9GlcNAc2	Glucosidasa I	Inhibición de la unión a OST. Libera la glicoproteína para iniciarse el plegamiento
Glc1Man9GlcNAc2	Glucosidasa II	Une las chaperonas del RE: calnexina y calreticulina; ayuda al reclutamiento de la Oxidoreductasa ERp57. Evita la agregación de proteínas. Inhibe el plegamiento global y retiene a las glicoproteínas en el RE.
Man9 GlcNAc2	Glucosidasa II	Libera las chaperonas y ocurre el plegamiento y la maduración de la proteína
Man8 GlcNAc2	Manosidasa I del RE	Marca al sustrato para la vía ERAD, cuando esta es una proteína mal plegada
ManX GlcNAc2	Manosidasa II del RE	Se une a ERGIC-53 en el RE y lo marca con destino ERGIC cuando está acoplada a una proteína plegada apropiadamente.

<sup>1</sup> Herbert, DN, Garman, SC, Molinari, M. 2005. Trends in Cell Biology 15(7):364-370.).

La propiedad de la *Swainsonina* de actuar en esta ruta metabólica de glicosilación de N-ligada; demuestra que es un potente inhibidor de alfa manosidasa II ( $K_i=40nM$ ). Pero no a las de tipo I, es por eso que el corte procede en cuenta al  $Man_5GlcNAc_2$  (Figura 8). En la figura hay bastantes secuencias que pueden ser añadidas en los terminales con preferencia de adición a las complejos estructurales de brazos  $\beta$ 1- GlcNAc- (mostradas a la derecha). También se muestra una vía alterna no dependiente de manosidasa II. Enzimas:  $\alpha G = \alpha$ -glucosidasa;  $\alpha MI = \alpha$ -manosidasa I;  $\alpha MII = \alpha$ -manosidasa II; TI, TII, TIV, TV = GlcNAc-Ts respectivas. Inhibidores de glucosidasa: SW = *Swainsonina*<sup>1</sup>

**Figura 8.** Gráfico de la ruta metabólica del procesamiento de glicanos N-ligados llevado a cabo en el aparato de Golgi.



<sup>1</sup>Goss *et al* 1995

A diferencia de otros alcaloides del mismo tipo, como la castanospermina, 1-deoxinojirimicina o 1-deoximanojirimicina; la *Swainsonina* es un inhibidor del procesamiento de carbohidratos más potente que los mencionados en un cultivo celular ( $IC_{50}=0.1\mu M$ )(Goss *et al.* 1995).

Los cambios en los patrones de glicosilación de las glicoproteínas celulares constituyen un sello distintivo en el cáncer humano e influye en la progresión del tumor, sugiriendo que los inhibidores de glicosidasas controlan la progresión del cáncer. Los estudios de la *Swainsonina* como inhibidor natural de la alfa-manosidasa Golgi son innovadores para la aproximación al tratamiento del cáncer. Se han desarrollado una variedad de pirrolidinas análogas a la *Swainsonina* como potentes inhibidores de la alfa-manosidasa capaces de poseer efecto antiproliferativo en las células cancerígenas humanas (Geber-Lemaire *et al.*, 2010).

## 2.5. Fuentes Vegetales y Fúngicas de *Swainsonina*

El compuesto tóxico primario de *Astragalus*; *Swainsonina*, que ahora se cree que son producidos por los *Oxytropis Undifilum* endófitos (Pryor *et al.*, 2009) y que se hace referencia como *Embellisia Oxytropis* (Braun *et al.* 2003, Ralphs *et al.*, 2008, Lu *et al.* 2009).

Hasta ahora, 10 cepas de endófitos han sido aisladas de *Oxytropis glabra* en Mongolia interior por Lu (2009). Cuarenta y dos cepas de endófito se han aislado de *Astragalus variabilis*, *Astragalus strictus*, *Oxytropis glabra*, *Oxytropis kansuensis*, *Oxytropis ochrocephala*, *Oxytropis glacialis*, y *Oxytropis sericopetala*. De estas, 11 cepas producen *Swainsonina* y nueve se han clasificado como *Oxytropis Undifilum* de acuerdo tanto con la característica morfológica y análisis de la secuencia 5.8SrDNA/ITS (Yu *et al.* 2009).

El efecto de diferentes macro y micro elementos utilizados a lo largo de la fermentación con fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de alcaloides por biomasa fungi es importante (Amici *et al.*, 1966 y 1967), la concentración de fosfato en el medio juega un papel más importante. El agotamiento de fosfato en el medio, que es un factor limitante del crecimiento, es considerado esencial en la producción de metabolitos secundarios (Amici *et al.* 1969).

La adición de algunos productos químicos como glicoles aumenta el rendimiento de alcaloide (Waseemuddin *et al.* 2010). Un efecto negativo en lugar de específico del fosfato inorgánico surge de su capacidad para inhibir y/o reprimir fosfatasas.

Debido a intermediarios biosintéticos de ciertas vías son fosforilados mientras que el último producto no está, las fosfatasa se requieren a veces en biosíntesis. (Krebs *et al* 1979) Fosfato también parece interferir en muchas rutas metabólicas secundarias no se sabe que tienen intermedios fosforilados.

## 2.6. Método Extractivo y Fermentativo

Por lo tanto, gracias a sus aplicaciones, los metabolitos secundarios de las plantas son objeto de la mayoría de investigaciones, pero su extracción como parte de la fitoquímica o las investigaciones biológicas, representan desafíos específicos que deben estar dirigidos por procesos de extracción por solventes. Ya que para obtener los metabolitos secundarios de las plantas se necesitan procesos de extracción, el ampliamente empleado es la extracción sólido-líquido.

Para la obtención de metabolitos secundarios se emplean normalmente métodos comunes de separación y purificación de compuestos químicos, que se aplican a diario las industrias de producción de activos y en los laboratorios farmacéuticos como un proceso básico para la obtención de compuestos químicos puros.

Se refiere a la extracción de uno o varios componentes solubles de un sólido mediante el contacto de éste con un solvente líquido selectivo. Esta operación también recibe el nombre de lixiviación, preferentemente en industria minera o de percolación cuando el solvente está a temperatura cercana a su punto de ebullición. Es muy usada para extraer sustancias inorgánicas, solubles, de minerales sólidos. (Orozco *et al*. 2000). Las extracciones exitosas de metabolitos comienzan con una selección y preparación del material vegetal.

Durante la extracción, se han desarrollado gracias a la investigación de procesos industriales y farmacéuticos para la obtención de principios activos; una gama de técnicas, que varían en costo y nivel de complejidad, pueden ser utilizadas para la extracción de alcaloides a partir de material vegetal. Para la mayoría de aplicaciones, relativamente técnicas simples, tales como filtración y maceración, son eficaces y económica.

Sin embargo, algunas aplicaciones específicas, requieren más sofisticado y costosas técnicas de extracción con equipo especializado, tal como el utilizado en la destilación de vapor de gran escala y-super crítico extracción de fluidos (SFE), cromatografía.

Los métodos de extracción con solventes se pueden clasificar como continua o discontinua. En continuo (por ejemplo, la percolación y extracción Soxhlet), los flujos de disolvente a través del material de la planta de manera continua. Como constituyentes difundirse desde la planta en el disolvente circundante, el disolvente se vuelve cada vez más saturado, pero debido a que el disolvente está fluyendo continuamente, el disolvente saturado se sustituye a menos saturado con disolvente.

En el caso de discontinua métodos, el disolvente se añade y se retira en lotes. Por lo tanto, una vez se alcanza el equilibrio entre la concentración de soluto dentro de la planta material y la concentración en el disolvente de extracción, esencialmente detiene hasta que se decanta el disolvente y se reemplaza con disolvente nuevo. Independientemente de la técnica de extracción utilizado, la solución resultante debe ser filtrada para eliminar cualquier partícula restante.

Los extractos se pueden concentrar a presión reducida en un evaporador rotatorio o secado bajo una corriente de nitrógeno. Si se utiliza un rotavapor, es aconsejable mantener la temperatura del baño de agua por debajo de 40 ° C para evitar la descomposición de los componentes termolábiles.

Para la extracción de alcaloides del tipo *Swainsonina* se han empleado como pre-tratamientos a la extracción reflujo, macera, extracción en soxhlet, ultrasonido, ya que los vapores en expansión desde cualquier aparato presurizado aumentan la porosidad debido a la explosión, al igual que la evaporación a partir de las células de sólidos. Una alternativa a esto es el uso de ultrasonido para destruir las paredes celulares y facilitar la extracción. (Jorg Bart *et al.* 2012; Wang *et al.* 2010; Eere *et al.* 2009).

En cuanto a los procesos de extracción y purificación de alcaloides a partir de células microbianas es necesario considerar unos pasos esenciales tales como: la separación del (los) alcaloide (s) de la parte principal de las sustancias no-alcaloideas, también consideran que las plantas contienen más de un alcaloide (Verma *et al.* 2007),

Para dar un ejemplo, como: los alcaloides de la cinchona que es un género de plantas fanerógamas del orden de las *Gentianales* de la familia de las *Rubiaceae*. La quinina, un alcaloide con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas. El descubrimiento de sus propiedades supuso una revolución en medicina, y aún, hoy en día, sigue siendo utilizada la quinina con fines médicos. (Cuvi *et al.* 2011). En referencia a la cichona, se han encontrado más de veinticinco alcaloides, si se toman en cuenta los métodos de separación de cada alcaloide de la mezcla de alcaloides obtenidos, los estudios han utilizado diversas técnicas de separación, por ejemplo, la cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (HPLC) la cromatografía en columna, por la ayuda de cromatotrón, y cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC). En resumen las técnicas cromatográficas son las más efectivas.

En referencia a los métodos de obtención de alcaloides, existen los métodos generales de aislamiento de los alcaloides en gran medida dependen de varios factores vitales, como por ejemplo: (a) la naturaleza alcalina de la mayoría de los alcaloides, (b) la capacidad y la facilidad de formación de sales de alcaloides con ácidos, y (c) la relación de solubilidad de las sales resultantes alcaloides o bien en disolventes orgánicos polares, por ejemplo, etanol ( $C_2H_6O$ ), cloroformo ( $CHCl_3$ ), isopropanol ( $C_3H_8O$ ), etc, o en medio acuoso. (Djilani *et al* 2006)

Duoc (2012) indica los siguientes cinco pasos como los más importantes y vitales, a saber para la extracción de alcaloides; estos son (a) Preparación de la muestra (b) la liberación de la base de alcaloide libre (c) Extracción de la base de alcaloide con disolvente orgánico (d) Purificación del extracto alcaloide crudo y (e) Fraccionamiento de alcaloides crudo.

En referencia al paso primer paso de preparación de la muestra. Lo más común encontrado en diferentes referencias bibliográficas es la primero la deshidratación del material y luego pulverización, otra es la congelación y liofilización del material (Lihong *et al.* 2007), la finalidad es reducir le material vegetal a un polvo moderadamente gruesa por los medios adecuados con amoladoras y tamices, para aumentar la superficie de contacto del disolvente con los tejidos de soporte rotura de alcaloides y células.

En el caso de sustancias de plantas que son ricas en aceites y grasas, tales como: las semillas, granos, estos componentes químicos no alcaloides necesitan ser completamente eliminado por extracción mediante un disolvente no polar como n-hexano ( $C_6H_{14}$ ), éter de petróleo ligero, en una aparato soxhlet, o a reflujo que no extraerá los alcaloides en cuestión. (Duoc *et al* 2012)

El siguiente paso es la liberación de alcaloides como bases, esto ocurre debido al comportamiento de los alcaloides que al ser bases reaccionan con un ácido para producir una sal, las sales son más solubles en agua y tiene un punto de fusión más alto que los aminos originales (Amstrong *et al* 2011). Por lo tanto, cuando la sustancia vegetal está expuesta a un medio alcalino, las sales de alcaloides se convierten fácilmente en el correspondiente alcaloide base.

La elección de una base mineral adecuado (alcalino) para la facilidad de liberación del alcaloide de las sales no sólo es muy importante, sino también igualmente significativo y en gran medida dependen de los factores siguientes, a saber el estado natural de los alcaloides:

Se ha observado que la sal de un alcaloide fuertemente básica con un ácido mineral por lo general tiende a someterse a escisión bajo las influencias de una base más fuerte. Del mismo modo, la sal correspondiente de un alcaloide débilmente básico y un ácido orgánico relativamente débil requerirá una base más débil para su escisión.

También es importante conocer las características químicas de la base alcaloide, ya que el uso de ejemplo, el álcali fuerte, hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH) debe evitarse en la medida de lo posible en virtud del hecho de que ciertos alcaloides sufrir hidrólisis en contacto prolongado con una base fuerte.

Muchos autores recomiendan el uso del hidróxido de amonio en especial para la *Swainsonina* (Wang *et al.* 2011; Ebere *et al.* 2009 Zhong-Ze Ma *et al.* 2008; Gartz *et al.* 1994; Adams *et al.* 1996; HangLu *et al.* 2012; Lihong *et al.* 2011; Verma *et al.* 2007); ya que es una solución diluida de hidróxido de amonio siendo uno de los más selectos y más frecuentemente usados para la liberación de los alcaloides de las fuentes vegetales. Goza de una doble ventaja:

- En primer lugar, siendo su alcalinidad adecuada para liberar la mayor parte de los alcaloides comunes,
- Por segundo, su naturaleza volátil de modo que se puede eliminar por evaporación del disolvente. Ya que tiene una tendencia a ser extraído por disolvente de éter a partir de la solución acuosa, por lo tanto, es casi necesario deshacerse de él por evaporación y posterior lavado repetidamente. (Harrington *et al* 2011).

La extracción de la base de alcaloides pueden ser con tres solventes miscibles en agua tales como: metano ( $\text{CH}_4\text{O}$ ), etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ ), isopropanol ( $\text{CH}_2\text{OHCH}_3$ ), por lo tanto, estos disolventes mismas también se pueden emplear para la extracción de las sustancias de la planta. La otra es la extracción con disolventes inmiscibles en agua, los más ampliamente utilizados son: cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), éter dietílico ( $(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ) (éter de disolvente) y éter isopropílico ( $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2$ ) (Duoc *et al* 2012)

Curiosamente, el cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) es considerado como el más fino disolvente inmisible en agua para un amplio espectro de alcaloides presentes en el reino vegetal y extractos de ellos con diferentes grados de facilidad (Armstrong *et al.* 2011)

Sin lugar a dudas, siendo el agua un disolvente polar excelente y barato absolutamente para la extracción de alcaloides, pero si ofrece un enorme volumen de desventajas ya que lleva consigo un gran número de otros componentes de la planta, por ejemplo: azúcar, pigmentos (por ejemplo, clorofila), almidones, taninos, proteínas, que en última instancia, pone a través de una pérdida colosal de tiempo, energía y productos químicos.

Una vez obtenido el extracto alcaloideo, es necesaria la purificación, puede ser sometida a extracción con solución de ácido. El uso de ácido clorhídrico (HCl) se restringe cuando permanece cloroformo como disolvente por el hecho de que un buen número de hidroclouros de alcaloides pocos son claramente soluble en el segundo. Sin embargo, diluir ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) siempre se prefiere sobre ácido clorhídrico (HCl) para uso general en la extracción de alcaloides. Posteriormente, la solución ácida se hace alcalina con solución diluida de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) para liberar los alcaloides que se extraen con un solvente orgánico.

El disolvente se elimina a presión reducida y las trazas de humedad se eliminan con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

Existe la formación de emulsiones que se pueden separar por centrifugación, y para descartar la presencia de componentes extranjeros interferentes tales como: pigmentos, resinas, ceras, aceites y grasas, se emplea una solución de 2.5-5% (w/v) (peso-volumen) de acetato de plomo ( $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ), el exceso de plomo presente en el filtrado se elimina mediante la adición de fosfato de sodio ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Atkins *et al* 2007).

Los métodos extractivos son una manera de obtener metabolitos, sin embargo en el caso de obtención de metabolitos por fermentación es necesario un paso previo: la fermentación, ya que en el caso de plantas no hacemos ningún proceso para que la planta los produzca, a menos que sea por crecimiento in-vitro. Es por esta razón que es importante introducir la fermentación como método de obtención de metabolitos que va de la mano con los métodos extractivos.

*Fermentación* se interpreta como cualquier proceso para la producción de un producto por el cultivo en masa de microorganismos. (El-Mansi *et al* 2006).

La aplicación de la fermentación microbiana es amplia; se pueden clasificar en los siguientes grupos: (Stanbury *et al*. 1995).

- (a) las que producen células microbianas (biomasa) como el producto.
- (b) Las que producen metabolitos microbianos.
- (c) Los que producen enzimas microbianas.
- (d) Los que modifican un compuesto que se añade a la fermentación los procesos de transformación,
- (e) Los que producen productos recombinantes.

Se debe tener en cuenta la capacidad de los cultivos para la producción durante las diversas fases, porque, aunque el metabolismo de las células en fase estacionaria sea

considerablemente diferente de la de los logarítmicos, es de ninguna manera estacionaria.

Bu'Lock (1996) propuso una terminología descriptiva del comportamiento de las células microbianas que consideran el tipo de metabolismo en lugar de la cinética de crecimiento. *Tropofase* el término fue sugerido para describir la fase logarítmica. Los metabolitos producidos durante la tropofase se conocen como metabolitos primarios. (Tabla 6). Además, sugirió el término *idiofase* para describir la fase de un cultivo en la que los distintos productos de los metabolitos primarios son sintetizados, los productos que no tienen un papel obvio en la celda metabólica. Los metabolitos producidos durante la idiofase se refieren como los metabolitos secundarios.

**Tabla 6.** Ejemplos de metabolitos primarios y su uso comercial<sup>1</sup>

<b>Metabolito Primario</b>	<b>Fuente Microbiana</b>	<b>Uso Comercial</b>
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Antibiótico
Ácido Cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Industria alimentaria
Licina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Saborizante
Polisacáridos	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Aditivo alimentario

<sup>1</sup> Stanbury *et al* 2000

Se observa que los metabolitos secundarios tienden a ser sintetizado a partir de los productos intermedios y productos finales del metabolismo primario. Aunque las principales rutas metabólicas son comunes a la mayoría de los microorganismos, cada metabolito secundario sería sintetizado por taxones microbianos. Además, no todos los taxones microbianos sufren un metabolismo secundario, sino que es una característica común de los hongos filamentosos y bacterias. La gama de productos secundarios producidos es enorme (Tabla 7). Y la tecnología de biorreactores ha logrado *domesticar* las cepas microbianas para el beneficio humano, mediante tipos de

cultivo, variaciones de condiciones para que se produzca le metabolito e inclusive modificarlos genéticamente para que produzcan metabolitos que no pertenecen a si metabolismo.

**Tabla 7.** Algunos ejemplos de metabolitos secundarios microbianos y su uso comercial<sup>1</sup>

Metabolito Secundario	Uso Comercial
Penicilina	Antibiótico
Cefalosporina	Antibiótico
Streptomycina	Antibiótico
Pestatina	Tratamiento de Ulceras
Ciclosporina A	Inmunosupresión
Giberelina	Regulador de Crecimiento de vegetales
Lovastatina	Inhibidor de síntesis de colesterol

<sup>1</sup>Stanbury *et al* 2000

Para el cultivo de microorganismos con el fin de obtener una bioproducción mediante biorreactores, existen tipos de cultivo (Inghan *et al.* 2007):

→ *Cultivo Discontinuo (Batch Culture)*

Un cultivo solo crecerá en un medio de cultivo si contiene todos los nutrientes necesarios en una forma disponible y si son adecuados el resto de los factores ambientales. El método de cultivo más simple es el cultivo discontinuo en el que el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento. En un sistema discontinuo el cultivo pasará por una serie de fases. El crecimiento no comienza inmediatamente después de la inoculación del medio de cultivo, el periodo previo al crecimiento activo se denomina fase de latencia que puede considerarse como un período de adaptación.

→ *Cultivo Discontinuo Alimentado; Batch Alimentado (BA) o Fed Batch*

Describe a un cultivo discontinuo al que se le añade secuencialmente medio fresco sin la eliminación del cultivo crecido. Por lo tanto, aumenta con el tiempo.

Esta técnica se define como un cultivo en batch donde se alimenta continuamente medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) del microorganismo. El BA es particularmente útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante, es decir cuando el rendimiento celular o la productividad de la biomasa o del metabolito buscado se ven afectados. Así, este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa.

#### → *Cultivo Continuo*

De los tres métodos usuales para el cultivo de microorganismos, batch, batch alimentado y continuo, es este último el que ofrece mayores posibilidades de control. Por sus características especiales permite controlar el proceso a un valor de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) prefijado de manera muy simple. Este punto es de suma importancia ya que el comportamiento de la mayoría de los microorganismos se ve afectado por el valor de  $\mu$  al que están creciendo.

Mediante el cultivo continuo es posible estudiar el efecto sobre el proceso de variables como PH, temperatura, concentración de nutrientes, etc., manteniendo constante el valor de  $\mu$ , o bien, fijadas las anteriores, analizar el efecto de  $\mu$  sobre el proceso. De este modo es posible separar los distintos efectos y obtener información valiosa para la mejora del proceso. Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo batch y en un momento dado, normalmente cuando se agota el sustrato limitante, se comienza a alimentar el biorreactor con medio de cultivo fresco a un caudal

#### → *Cultivo Superficial.*

La fermentación en cultivo superficial, se caracteriza porque las bacterias se encuentran en contacto directo con oxígeno gaseoso, o situadas en la interfase líquido-

gas, como es el caso del método Orleans o bien, fijadas a soportes de materiales tales como virutas de madera.

Este sistema constituye el primer paso hacia la industrialización del proceso de fabricación de vinagre y es también precursor de las bacterias inmovilizadas. A pesar del avance tecnológico, éste método presenta desventajas, como la pérdida de sustancias volátiles por evaporación; el material de soporte, como las virutas de madera, se contamina fácilmente y es preciso reemplazarlo cada año; además es un proceso lento, por lo que se ha optado por el proceso de fermentación sumergida.

#### → *Cultivo Sumergido.*

La fermentación en cultivo sumergido ha sido descrita por Ebner (1993 y 1999) los cuales sugieren una fermentación discontinua y continua.

En los cultivos sumergidos los nutrientes se encuentran forma líquida y los microorganismos se desarrollan flotando libremente en el volumen de medio de cultivo o formando agregados más o menos esféricos (pellets) en el caso de los cultivos de hongos

### **2.7. Métodos de Identificación por TLC y HPLC**

En el análisis de alcaloides, la cromatografía en capa fina (TLC) ha sido ampliamente empleada más que cualquier otra técnica cromatográfica, evidenciado por la gran variedad de *papers* científicos publicados. Las técnicas de cromatografía permiten tomar ventaja del hecho de que diferentes sustancias se parten de forma diferente entre dos fases, una fase móvil y una fase estacionaria. En cromatografía de capa fina, o TLC, la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es un sólido absorbente. (U. Wisconsin *et al.* 2012). Para poder sintetizar el fundamento de TLC, existe una mezcla (A+B) que debe ser separada es disuelta en un solvente y la solución resultante se encuentra plasmada en manchas en una placa por la acción de capilaridad (Baerheim *et al.* 1983). Un solvente o una mezcla de solventes denominada fase móvil, tiene la capacidad de ascender por la placa por capilaridad; por lo tanto la mezcla correrá junto con la fase móvil; pero debido a que una sustancia es fuertemente absorbida (A) ésta

tendrá mayor fracción de sus moléculas adsorbidas y por lo tanto esta molécula pasará más tiempo estacionada y correrá menos.

En cambio, una sustancia de adsorción débil (B) tendrá menos de sus moléculas adsorbidas por la capa de TLC y pasará más tiempo moviendo a más velocidad. (Tabla 8)

La fase estacionaria; ya que para realizar la cromatografía en capa fina es necesaria una placa donde colocar el material a separar; ésta placa posee una fina capa (0.25mm aprox.) de muchos materiales diferentes que son capaces de retener ambos disolventes y solutos. Los dos más comúnmente usados como fase estacionaria (adsorbente) son gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

Ambos compuestos se suministran con pulverizados finamente y en condiciones estériles. Los centros activos en la superficie de los adsorbentes no poseen el mismo poder de adsorción. Esto es una consecuencia de la especial orientación, el carácter químico y la conformación de los lugares de adsorción (Kruiswijk *et al.* 2005).

**Tabla 8.** Disposición de compuestos de acuerdo a su polaridad y su velocidad de corrido, es decir orden de elución en la placa de cromatografía de capa fina.<sup>1</sup>

POLARIDAD	ORDEN DE ELUCIÓN	TIPO DE COMPUESTO
Menor	Menor Retención	Alcanos Alquenos
		Éteres
		Derivados Halogenados
		Aldehídos Y Cetonas
		Esteres
		Aminas
		Alcoholes
		Fenoles
Mayor	Mayor Retención	Ácidos Carboxílicos

<sup>1</sup>Wall *et al* 2005

La silica gel es el adsorbente empleado en TLC para análisis de alcaloides. Debido a que los grupos silanol no poseen fuertes propiedades ácidas (pH 1-5), es posible la quimio-adsorción de compuestos básicos. El fenómeno de quimio-adsorción sucede empleando una fase móvil o impregnando la silica con buffers básicos o minerales básicos. Los alcaloides pueden ser “cromatografados” en forma de sales, usando fases móviles polares y ácidas.

Sin embargo al elección de un solvente apropiado para la muestra se encuentra determinada por la polaridad del alcaloide (ácido o base) ; el caso del cloroformo es el solvente de mayor elección ya que es donador de protones, se puede agregar etanol metanol para compuestos más polares. (Baerheim *et al.* 1983).

Hay muchos factores que determinan la eficiencia de la separación por cromatografía. El adsorbente debe demostrar una selectividad máxima para la sustancia que está siendo separada y los componentes de la fase móvil también deben mostrar elevada selectividad en su habilidad para disolver las sustancias que están siendo separadas. El hecho de que una sustancia es relativamente soluble en un disolvente puede dar lugar a su elución más rápida que otra sustancia.

El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. La fase móvil puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En el siguiente recuadro se recoge por orden creciente de fuerza eluyente los disolventes más comúnmente empleados.

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada. La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de

soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil.

**Tabla 9.** Listado de clasificación de compuestos para fase móvil de acuerdo a su capacidad de movilidad en la placa <sup>1</sup>

<b>Menor</b>	<p>éter de petróleo (hexano, pentano)                      ciclohexano tetracloruro de carbono                      benceno diclorometano                      cloroformo Éter (anhidro)                      Acetato de etilo (anhidro)                      Acetona (anhidro)                      etanol                      metanol                      agua                      piridina</p>
<b>Mayor</b>	<p>ácidos orgánicos</p>

<sup>1</sup>Wall *et al* 2005

Existen factores que determinan la retención de los compuestos tales como la polaridad del compuesto (Tabla 9), que están determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad. Luego naturaleza del disolvente. Así, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.

Para TLC la velocidad a la cual la fase móvil o el solvente eluyente corren es muy importante. El coeficiente de velocidad es “ $\kappa$ ”, un valor elevado indica un tiempo de análisis más corto (Tabla 10). La velocidad de corrido no es constante, esta crece y decrece con el peso del solvente. Es por eso importante determinar  $\kappa$  a una cierta distancia.

Con respecto a la técnica de aplicación de la muestra en la placa; la muestra a separar se aplica generalmente como un punto pequeño (1 a 2 mm de diámetro) de la solución aproximadamente 1 cm del extremo de la placa opuesto al mango (Skoog *et al* 2008).

La adición se puede hacer con una micropipeta preparado por calentamiento y extraer un punto de fusión capilar. Como una pequeña muestra de lo posible se debe utilizar, ya que esto reducirá al mínimo de asimetría y la superposición de manchas; el límite inferior es la capacidad de visualizar las manchas en la desarrollado cromatograma (Kruijwij *et al* 2005).

**Tabla 10.** Listado de compuestos de acuerdo a su adsorividad hacia la palca silica gel<sup>1</sup>

<b>MENOR</b>	<p>hidrocarburos saturados; haluros de alquilo</p> <p>Hidrocarburos no saturados; alkenyl haluros</p> <p>Hidrocarburos aromáticos; haluros de arilo</p> <p>hidrocarburos polihalogenados</p> <p>Éteres</p> <p>Los ésteres</p> <p>Los aldehídos y cetonas</p> <p>Alcoholes</p>
<b>MAYOR</b>	<p>Ácidos más fuertemente adsorbido y bases (aminas</p>

<sup>1</sup>Wall *et al* 2005

Es necesario para el proceso de corrido, tener una cámara cromatográfica o la manera más económica es con un beaker y una luna reloj. Sin embargo, es recomendable el uso de una cámara profesional con tapa esmerilada, ya que las fases móviles poseen compuesto volátiles útiles para la corrida a lo largo de la fase estacionaria de sílice. (Wall *et al.* 2005).

Una vez que el cromatograma es realizado, es muy usual que la mayoría de compuestos, por ejemplo alcaloides no poseen un color a observar. Muchos de los compuestos absorben la luz UV o exhiben fluorescencia cuando son excitados por la luz visible o UV, pero la mayoría y en especial los alcaloides necesitan un revelador.

**Tabla 11.** Ecuación del coeficiente de velocidad “k” y sus respectivos símbolos indicados a la derecha de la tabla.<sup>1</sup>

Ecuación	Términos
$k = \frac{(x_f + x_s)^2}{t_f + t_s}$	<p><math>x_f</math> = distancia entre la situación basal y frontal</p> <p><math>x_s</math> = distancia entre la superficie y la línea base solvente</p> <p><math>t_f</math> = tiempo de funcionamiento entre la situación basal y frontal</p> <p><math>t_s</math> = tiempo de funcionamiento entre la superficie y la línea base solvente</p>

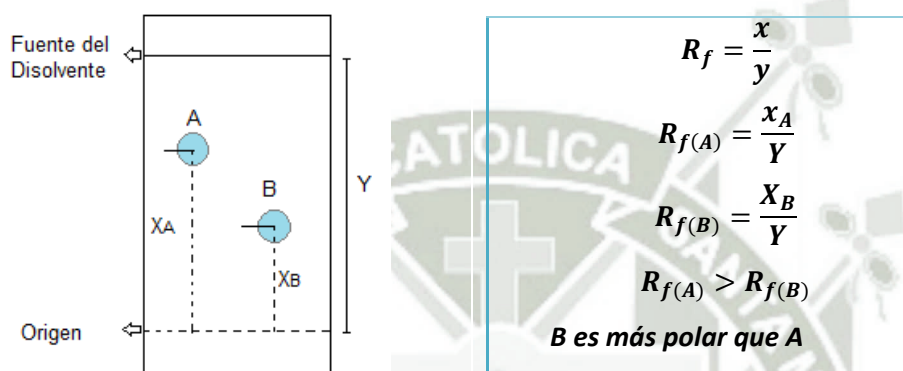
<sup>1</sup>Kruiswijk *et al* (2005)

Por lo tanto, muchos compuestos se han desarrollado para provocar reacciones con el corrido cromatográfico basándose en las reacciones químicas. La lista de reveladores para TLC es amplia, reflejando la versatilidad de las técnicas de detección. (Wall *et al* 2005). Algunos reactivos son reveladores universales, ya que con ellos se puede visualizar una amplia gama de compuestos, en este grupo están las soluciones ácidas y vapores, vapor de amonio, fluorescina, diclorofluoresceína y yodo. Algunos reactivos provocan una desnaturalización de los compuestos en las placas cromatográficas dejando atrás un rastro. Otros emplean reacciones termoquímicas. La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como  $R_f$ , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.).

Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa.

En TLC, con el fin de obtener una evaluación cuantitativa del comportamiento de un compuesto en TLC, se utiliza  $R_f$ , que es una escala relativa de la distancia que el compuesto se movió.

**Figura 9.** Esquema de la placa cromatográfica TLC, para poder determinar el valor  $R_f$  <sup>1</sup>



<sup>1</sup>Wall *et al* 2005

$R_f$  se define como la distancia del compuesto movido dividido por la distancia del disolvente movido (de donde el compuesto fue descubierto) (Figura 9). Así, la escala es lineal, con  $R_f = 0$  correspondiente a un punto que no se mueve, y  $R_f = 1$  correspondiente a un punto que se movía con el disolvente hasta el fondo de la placa (Skoog *et al* 2008). Cada compuesto tiene su propio  $R_f$ .

En cuanto a la *Cromatografía Líquida de Alto Performance HPLC* se clasifica dentro de la técnica cromatográfica de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido que es la columna (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases.

Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

Hay tipos de HPLC:

*La cromatografía de fase normal* : Se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria.

La fuerza de absorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

*Cromatografía de fase reversa*: Consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

*Cromatografía de exclusión molecular*: La cromatografía de exclusión molecular, también conocida como cromatografía por filtración en gel, separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas.

*La cromatografía de filtración molecular* es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente, según su radio de Stokes. En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, la columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados.

En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.

*Cromatografía de intercambio iónico:* la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Algunos tipos de intercambiadores iónicos son: i) Resinas de poliestireno, ii) intercambiadores iónicos de celulosa y dextranos (geles) y iii) Silica porosa o vidrio de tamaño de poro controlado

*Cromatografía basada en bioafinidad:* Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.

En cromatografía de líquidos, es posible trabajar en dos modalidades; isocrático, cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución y en gradiente, cuando la composición de la fase móvil cambia según una función dependiente del tiempo. Las partes de un HPLC se encuentran en la Figura 10.

**Figura 10.** Partes del equipo de HPLC<sup>1</sup>



1 Agilent Technologies (2012) *Fundamentals of High Performance Liquid Chromatography* Ed. HPLC basics.

Cualquier propiedad física o química que se pueda medir en la disolución podría usarse como método de detección, los detectores en HPLC no son destructivos. Se pueden clasificar en: detectores que miden una propiedad de la fase móvil y detectores que miden una propiedad de los solutos. Los principales detectores son: ultravioleta o visible, fotodiodos, índice de refracción, fluorescencia, conductividad eléctrica, dispersión de luz, espectrometría de masas, técnicas electroquímicas, y un último detector destructivo: detector evaporador de dispersión de luz (ELD), en la que el efluente de la columna es continuamente evaporada y la luz del vapor es medida; válido para aquellos solutos que sean claramente menos volátiles que la fase móvil, el eluyente es evaporado con una corriente de nitrógeno dejando una nube de finas partículas sólidas que entran en la zona de detección de las partículas se detectan por la luz que procede de un diodo láser y llega al fotodetector por dispersión.

Se han reportado análisis ensayos de análisis para *Swainsonina* incluyendo cromatografía en capa fina, cromatografía de gas capilar, LC-MS/MS método. La espectroscopia de masas es considerada como específica y de detección universal método, pero el elevado precio del ensayo, limita su uso como en análisis de rutina. La cromatografía de gases capilar brinda una excelente separación de la *Swainsonina* e información estructural sobre la no-combinación de *Swainsonina* con espectroscopia de masas (GC-MS), pero requiere que las muestras sean derivatizadas con trimetilsilyl (TMS) antes de análisis (Molyneux *et al.* 2002). El tratamiento previo requiere mucho tiempo en la preparación de la muestra y complicaciones en la reacción del tratamiento previo.

Con el fin de lograr el tratamiento previo reproducible, las condiciones de reacción son muy complicadas. La cromatografía líquida será sin duda la mayor área de crecimiento y desarrollo al respecto. La habilidad de analizar la *Swainsonina* sin tratamiento previo conferirá una ventaja particular para la técnica de análisis del alcaloide.

La *Swainsonina* posee una estructura altamente soluble en agua y ligeramente insoluble en solventes no-hidrofílicos, por lo tanto el aislamiento y análisis por cromatografía significa una dificultad clara.

Se encuentran registrados protocolos para análisis de *Swainsonina* mediante HPLC, sin embargo según Yang (2012), quien desarrolla una técnica para determinación de *Swainsonina* por HPLC con el detector evaporador de dispersión de luz (ELD), registrando que mediante este método se pudo analizar satisfactoriamente en alcaloide así como información de ensayos no satisfactorios como el uso de la columna C18 no se obtuvo una separación clara de la muestra, de esta manera queda registrado que el método con este tipo de detector es el ideal.

## 2.8. Perspectivas Futuras

La exploración de la biodiversidad del Perú es esencial para el avance tecnológico y científico del País, ya que es primordial buscar fuentes naturales que posean bioactivos con fines farmacéuticos. Los alcaloides, son uno de estos metabolitos secundarios importantes de diferentes fuentes, ya sea vegetal, animal o microbiano; ya que poseen gran interés para la medicina e industria farmacéutica.

La especie vegetal *Astragalus arequipensis* comúnmente llamada “garbancillo”, es una hierba encontrada en Huambo - Cotahuasi de la provincia de La Unión, Arequipa; es considerada una amenaza, sin embargo debido a su contenido fitoquímico, tiene el potencial para convertirse en una legumbre valorada por sus diversas propiedades documentadas por otras especies, y por su posible contenido de alcaloide. Y la exploración de actividad fúngica endófitica de la misma planta, brinda la posibilidad de determinar una relación planta-microorganismos de cooperación para la producción de *Swainsonina*.

La demostración de que *Astragalus arequipensis* (garbancillo) sea una leguminosa insumo para la producción de un metabolito de importancia: *Swainsonina*, dejaría de ser vista sólo como un peligro para el ganado y hierba mala a ser valorada por sus propiedades. Así como se establecería una biomasa fungal nativa que produce el mismo metabolito. Si los hongos endófitos de *Astragalus arequipensis* (garbancillo) resultan ser capaces de producir *Swainsonina*, se consideraría un aporte para futuras investigaciones sobre la bioproducción de éste alcaloide por medios fermentativos empleando esta especie fúngica y los métodos extractivos establecidos en la presente investigación, siendo ésta opción más económica de obtención en sentido de tiempo.

El desarrollo de una técnica por HPLC para la determinación cuantitativa de *Swainsonina* permite facilitar la detección del alcaloide para futuros ensayos ya sea en extractos vegetales o de sangre, en caso de tratamientos.

La comprobación de la existencia de *Swainsonina* en *Astragalus arequipensis*, que tiene diversos fines medicinales, se daría mayor importancia a las zonas rurales de Cotahuasi, así como también se daría pie a estudios aplicativos del alcaloide a partir de un vegetal y biomasa nativa.

## CAPÍTULO III

# MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Lugar de Ejecución

El trabajo de tesis fue ejecutado en los laboratorios H-101, H-403 y H 203 (*Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio*) de la Universidad Católica de Santa María.

### 3.2. Materiales

#### MATERIAL BIOLÓGICO

- *Astragalus arequipensis* de Huambo - Cotahuasi, provincia de La Unión-Arequipa
- Avena entera natural (QUAKER)
- *Solanum tuberosum* (Papa)

#### MATERIAL DE VIDRIO

- Asa de Dibrasky
- Asa de siembra
- Bagueta de vidrio
- Balón 500 mL
- Beakers: 50 mL, 100 mL, 500 mL
- Fiolas de 5 mL, 10 0mL y 500 mL
- Láminas portaobjetos
- Matraces: 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL.
- Peras de decantación: 250 mL
- Pipetas: 1 mL, 5 mL, 10 mL
- Probetas: 100 mL, 1000 mL
- Placas Petri: 50 x 9 mm
- Refrigerante para reflujo
- Tubos de ensayo: 13x100 mm, 16x150 mm

## REACTIVOS

- Acetato de etilo (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)
- Acetato de Sodio (NaCH<sub>3</sub>COO)
- Acetonitrilo HPLC (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>CN) MERCK
- Ácido acético 1% (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)
- Ácido Bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl)
- Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)
- Ácido sulfúrico 5% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Agar-agar
- agua ultra pura (H<sub>2</sub>O)
- Carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>)
- Cloroformo HPLC (CHCl<sub>3</sub>) MERCK
- Cloroformo *lab grade* (CHCl<sub>3</sub>) MERCK
- Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)
- Cloruro de cobre
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>)
- Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)
- D-L-Lisina (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Dextrosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)
- Estándar de *Swainsonina* Sigma-Aldrich (St. Louis MO)
- Etanol 96° (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)
- Extracto de levadura
- fosfato ácido de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) MERCK
- Fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH)
- Hidróxido de Potasio (0.40%) (KOH)
- Hipoclorito de sodio 2.5% MERCK (NaClO)
- Metanol (grado HPLC) (CH<sub>3</sub>-OH) MERCK

- Molibdato de Amonio  $((\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4)$
- P-Dimetil-amino benzaldehído (DMBA)
- Peptona
- Sacarosa  $(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$
- Sulfato de amonio  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$
- Sulfato de calcio  $(\text{CaSO}_4)$
- Sulfato de magnesio  $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$
- Sulfato de Zinc  $(\text{ZnSO}_4)$
- Sulfato ferroso  $(\text{FeSO}_4)$

### EQUIPOS

- Agitador orbital J.P SELECTA ROTATERM
- Autoclave vertical a vapor FRAVILL
- Balanza analítica electrónica OHAUS AR 2140
- Balanza analítica electrónica OHAUS Pioneer®PA214
- Cámara de flujo laminar horizontal C4 FLOW 180H
- Cámara de Luz UV CAMAG
- Estufa de secado y esterilización J.P SELECTA CONTERM
- Sistema HPLC LaChrom con los módulos:
  - Detector: MERCK HITACHI UV L-7400
  - Bomba: MERCK HITACHI L-7100
  - Interface: MERCK HITACHI D-7000
  - Doble Columna: Chromolith®Performance RP-18e(100\*4.6MM)
  - Software: EZChrom Elite
- Microscopio binocular CARL ZEISS PRIMOSTAR
- Sonicador J.P SELECTA 3006813
- Incubadora J.P. SELECTA

### OTROS

- Asa de siembra
- Bolsas de papel

- Bolsas de polipropileno
- Equipo de disección
- Filtro DE JERINGA DE 100mm 0.22um ANOTOP/PURADISC
- Filtro Membrana Nylon 47mm WHATMAN
- Foco de 20 Watts PHILIPS
- Jeringa de 100uL para inyección HPLC
- Micropipeta automática de 200-1000uL, BRAND
- Placas de Silica aluminio Gel 60 F<sub>254</sub> de 20x20cm
- Tamiz
- Tubos Eppendorf
- Vasos estériles

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Obtención de los Extractos Alcaloideos de Las Hojas, Tallos y Raíz de *Astragalus arequipensis* Recolectada de la Región Arequipa.

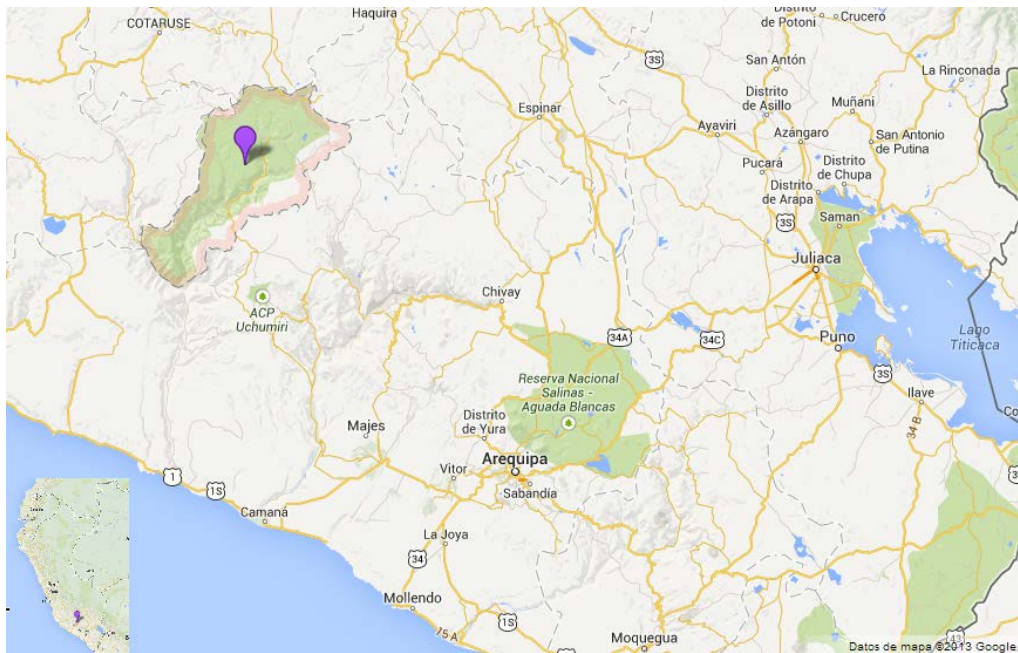
##### 3.3.1.1. Recolección de Muestras Biológicas.

Se recolectó un total de 9 plantas con las características determinadas por bibliografía sobre *Astragalus arequipensis*, en el poblado de Huambo- Cotahuasi, capital de la provincia de La Unión de Arequipa-Perú, que se encuentra a 380 Km. de la ciudad de Arequipa (Figura 11) y a una altitud de 3800-4000 m.s.n.m. El acceso fue por medio terrestre, Huambo se encuentra entre la ciudad de Arequipa y la ciudad de Cotahuasi, 45 minutos antes de llegar a dicha ciudad.

Se midió la altura y ancho cuando la planta aún se encontraba instalada en el suelo, el ancho se midió tomando en cuenta la zona intermedia del arbusto Las primeras 9 plantas fueron recolectadas en el mes de Agosto, sin embargo se pudieron recolectar 3 muestras más de la misma planta en el mes de enero para poder determinar el color de la flor

Al momento de llegar a la zona (Figura 12), se tomó la planta completa desde raíz, haciendo un hoyo, luego se extrajo la planta y se colocó en una bolsa herméticamente cerrada y se transportó envuelta intentando aislarla de altas temperaturas.

**Figura 11.** Ubicación geográfica del Lugar de Recolección de *Astragalus arequipensis*.



La señalización violeta muestra el lugar, se sitúa en el sur del Perú

Para el transporte se almacenó en frío. Se seleccionaron las plantas que se encuentran en mejor estado.

**Figura 12.** Recolección de las plantas.<sup>1</sup>



a



b

(a)muestra a la planta en su hábitat natural, es un arbusto frondoso (b) excavado en la base de la planta

Todos los datos observados fueron reportados mediante fotografías y anotaciones.

Además, de cada planta, se midió; la altura, longitud de hojas, de tallos, de semillas, color de la planta y estado vegetativo. Luego se recolectó una planta en estado de florecimiento cinco meses después de la primera recolección para tener registro de características de las flores como el color, tamaño, forma de foliolos, del cáliz, de brácteas y órganos sexuales propios de la leguminosa.

Para la selección de material, se separó una parte para el cultivo de microorganismo y otra para la extracción. Se seleccionaron pequeñas porciones de cada parte de la planta (raíz y tallos) destinadas para el cultivo de células y se almacenaron a 4°C en envases estériles. El resto del material se reservó para el proceso de extracción de *Swainsonina* a partir de fuente vegetal.

### **3.3.1.2. Determinación de la Especie de *Astragalus* Recolectada;**

La planta recolectada fue llevada al laboratorio Herbología de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín con la información del lugar en donde fue recolectada. La muestra entregada fue evaluada de acuerdo a la zona de crecimiento, y sus características por un especialista del laboratorio ya mencionado.

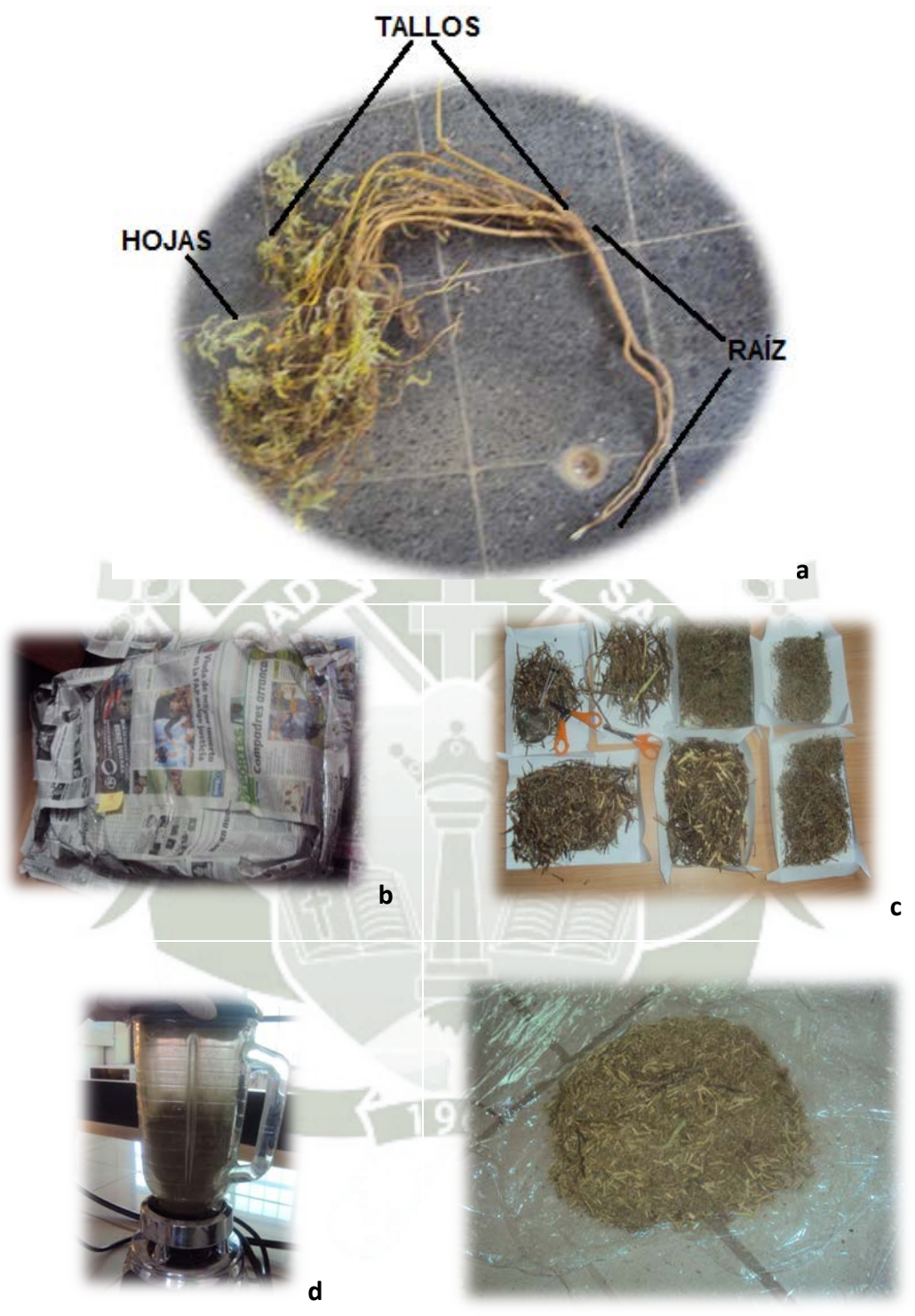
### **3.3.1.3. Extracción de *Swainsonina* a partir de *Astragalus arequipensis***

Se empleó el método de extracción ácido-base para alcaloides en general, en la que se trabajó con el comportamiento de los alcaloides a las variaciones de pH y su solubilidad, ya que en medios básicos son hidrofóbicos y en medios ácidos son hidrofílicos.

Primeramente, el material recolectado se dejó secar durante 10 días, envueltas en papel a 19 °C bajo techo; una vez que la planta se encontraba seca, se seleccionaron las partes y se cortaron en pedazos pequeños para su posterior pulverizado, en una licuadora, sin añadir agua. (Figura 13)

Una vez pulverizado el material vegetal, se procedió a pesar 50 g de hojas, tallos y raíz; respectivamente. Se añadieron 2 mL de hidróxido de amonio con 50 mL de cloroformo a cada una de las partes pulverizadas y pesadas.

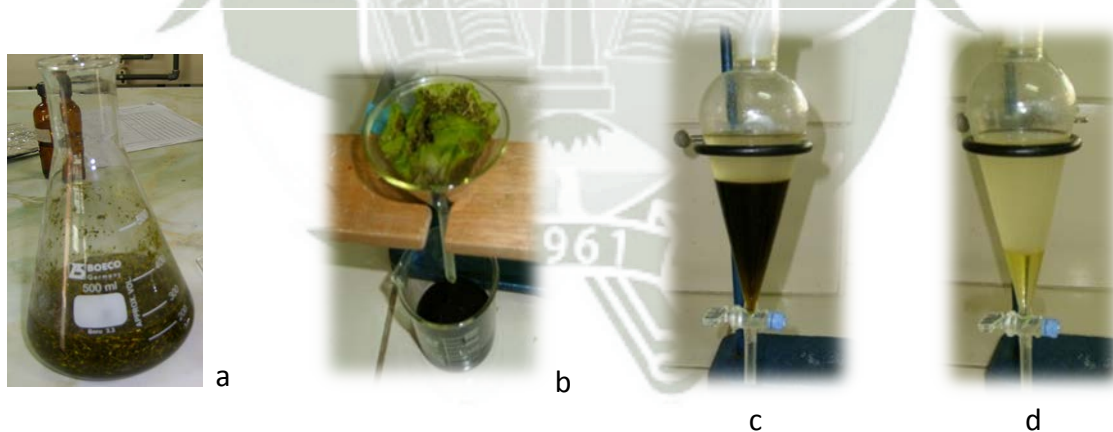
**Figura 13.** Preparación de material vegetal para extracción sólido líquido.



(a) *Astragalus arequipensis* completa, donde se señalan las tres partes que se separaron de la planta para su extracción. (b) estado en que el material vegetal se dejó deshidratar (c) Separación del material en grupos de hojas, tallos y raíz (d) proceso de pulverización del material vegetal. (e) material vegetal pulveriza, tamizado y vuelto a pulverizar, y almacenado en bolsas.

Enseguida, la mezcla se llevó al equipo de reflujo (Figura 14a), en baño maría por 15 min desde que empieza el hervor del cloroformo, ya estando frío se realizó la filtración (Figura 14b), eliminando la torta que es el material vegetal y recuperando el filtrado, se realizó un lavado con 10 mL de cloroformo al envase para asegurarse de recuperar todo lo posible. Luego se realizó la acidificación con 50 mL de ácido sulfúrico 5 % para cada tratamiento, en una pera de decantación de 250 mL en la fase acuosa (superior) hay ácido sulfúrico, agua y los alcaloides y en la fase orgánica (inferior) cloroformo (Figura 14c). Se realizó doble extracción con este paso, para luego realizar la extracción básica (Figura 14d), se lleva la fase acuosa a pH 9-10 con hidróxido de amonio y se añadieron 30 mL de cloroformo, se dejó decantar y esta vez en la fase acuosa se tiene agua y ácido sulfúrico y en la fase orgánica cloroformo con el extracto alcaloideo, se le añadió sulfato de sodio para desecar el agua. Se concentraron los extractos de cloroformo empleando volatilización para tener la muestra más concentrada. Se concentraron a 5 mL para mayor concentración de *Swainsonina*. Se almacenó a 4 °C en un frasco acaramelado para posteriores ensayos.

**Figura 14.** Obtención del extracto alcaloideo por método sólido líquido.



#### 3.3.1.4. Evaluación Cualitativa de Swainsonina por TLC

Para poder determinar la producción de *Swainsonina* por parte de *Astragalus arequipensis*, y el órgano de la planta que posee mayor concentración del alcaloide, se realizó una técnica cualitativa que es la cromatografía en capa fina (TLC).

Pero previamente se realizó una prueba para determinar que revelador se iba a emplear de manera estándar a lo largo del trabajo experimental para la determinación cuantitativa de *Swainsonina*, ensayando con tres diferentes reveladores, siendo esto los vapores de yodo, y dos preparaciones distintas del Reactivo de Ehrlich: (0.5 g *p*-dimetil aminobenzaldehído, 10 mL ácido clorhídrico concentrado, 10 mL etanol absoluto) y (0.5 g *p*-dimetil amino benzaldehído, 12.5 mL metanol, 12.5 mL ácido ortofosfórico).

Se tomó como muestra el extracto alcaloideo de las hojas pulverizadas, una decisión debido a que las hojas pulverizadas es lo que se encuentra en mayor cantidad de la planta. Se sembraron en línea en tres diferentes placas de silica gel G60, se corrieron en cámaras de cromatografía esmeriladas con fase móvil de cloroformo: metanol: amonio: agua (7,0: 2,6: 0,2: 0,2), una vez alcanzada la distancia debida que es de 1 cm a 0.5 cm antes de llegar al borde de la palca silica gel, se extrajo y se dejaron secar para luego revelarlas con los tres diferentes reveladores ya mencionados tanto por vapor de yodo y dos Reactivos de Ehrlich.,

Para realizar el revelado mediante vapores de yodo, se pesaron 0.5 g de yodo y se colocaron en el interior de un frasco cerrado junto con el cromatograma de forma vertical, luego se calentó el frasco a 40°C en hot plate durante 5-10 minutos (figura 15.b) y los compuestos del cromatograma fueron visibles en líneas de color marrón de los compuestos.

Para el revelado con los dos reactivos de Ehrlich, se emplearon 10 mL de cada reactivo en un atomizador de vidrio (Figura 15.a) que funciona con aire comprimido, se aplicó uniformemente sobre el cromatograma (si inhalar porque es toxico) una vez aplicado, se llevaron a la estufa (80 °C) por 3 minutos. El revelador es específico para los alcaloides indolizidínicos como la *Swainsonina* al reaccionar muestra un color violeta

Se evaluaron los  $R_f$  aplicando la Ecuación 1, ya que *Swainsonina* tiene un  $R_f = 0.55$

$$R_F = \frac{\text{Distancia de la muestra desde el origen}}{\text{Distancia del eluyente desde el origen}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

**Fig. 15.** Revelado de la placa cromatográfica para determinación de *Swainsonina*



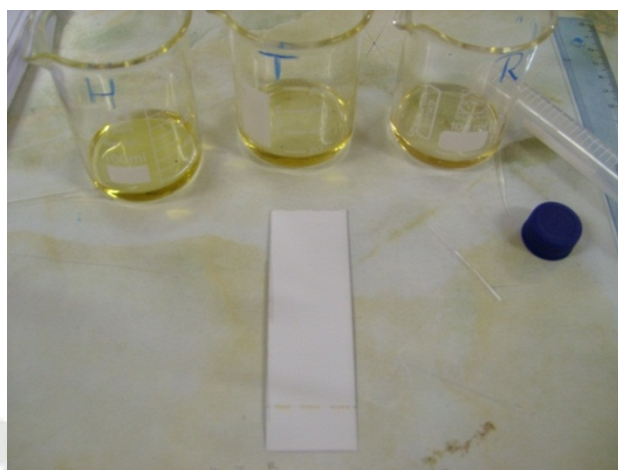
(a) Atomizador para aplicar el revelador reactivo de Ehrlich a las placas cromatográficas, el sistema funciona con aire comprimido (b) cromatograma en el interior de un frasco a 40°C con cristales de yodo para revelado del cromatograma.

Una vez estandarizado el procedimiento de cromatografía en capa fina para detección de swainsonina y la existencia de este alcaloide en por lo menos las hojas de la planta, se determinó que órgano de ésta es la que provee de mayores concentraciones de swainsonina de manera cualitativa mediante TLC.

Por lo tanto, se realizó la corrida cromatográfica colocando tres muestras paralelas H (hojas), T (tallos) y R (raíz), en una placa sílica gel G60. La fase móvil fue de cloroformo: metanol: amonio: agua (7,0: 2,6: 0,2: 0,2). Empleando una cámara cromatográfica esmerilada, ya que la fase móvil es bastante volátil. Las muestras fueron sembradas empleando un capilar delgado, ya que se encontraban embebidas en cloroformo, ya que a medida que el solvente es menos denso, el capilar debe ser más delgado.

La siembra se realizó de manera lineal y no de punto, como se aprecia en la Figura 16, para poder obtener las marcas claras y se realizó la siembra por 5 veces repetitivas, dejando secar la muestra entre siembra y siembra. Un centímetro aproximadamente antes de que llegue el solvente al extremo superior, se extrajo la placa de la cámara cromatográfica y se marcó el lugar hasta donde llegó el solvente.

**Figura 16.** Siembra de muestras en placa sílica gel G60 de forma lineal<sup>1</sup>.



<sup>1</sup>De izquierda a derecha los extractos alcaloideos de hojas, talos y raíz. Se pueden observar las manchas de siembra lineal.

Antes de la aplicación del revelado se llevó a la cámara UV para visualizar los compuestos. Luego aplicó el revelador, se llevó a caliente y finalmente se evaluaron los Rf para determinar cuál de los órganos de la planta es el de mayor concentración de *Swainsonina* de acuerdo a la intensidad de color.

### **3.3.2. Aislamiento e Identificación de Hongos Endófitos de los Tallos, Raíz y Rizósfera de *Astragalus arequipensis*.**

#### **3.3.2.1. Aislamiento de Hongos Endófitos a partir de *Astragalus arequipensis***

Se tomó una parte de la raíz (Figura 17) y se colocó en un vaso estéril, así como es suelo proveniente de alrededores de la raíz se tomaron un aproximado de 100 g de en un vaso estéril y se rotuló con letras del abecedario (A, B, C).

Para poder obtener los hongos endófitos de *Astragalus arequipensis*, todo el método (Figura 18) fue realizado en cámara de flujo laminar. Para lo que fue necesario esterilizar bisturí, pinzas, papel filtro, agua destilada.

Primero se tomó tallos y raíces de la planta que se encontraban almacenados en vasos estériles (*Astragalus arequipensis*), Seguidamente, se lavó el material vegetal con agua destilada estéril.

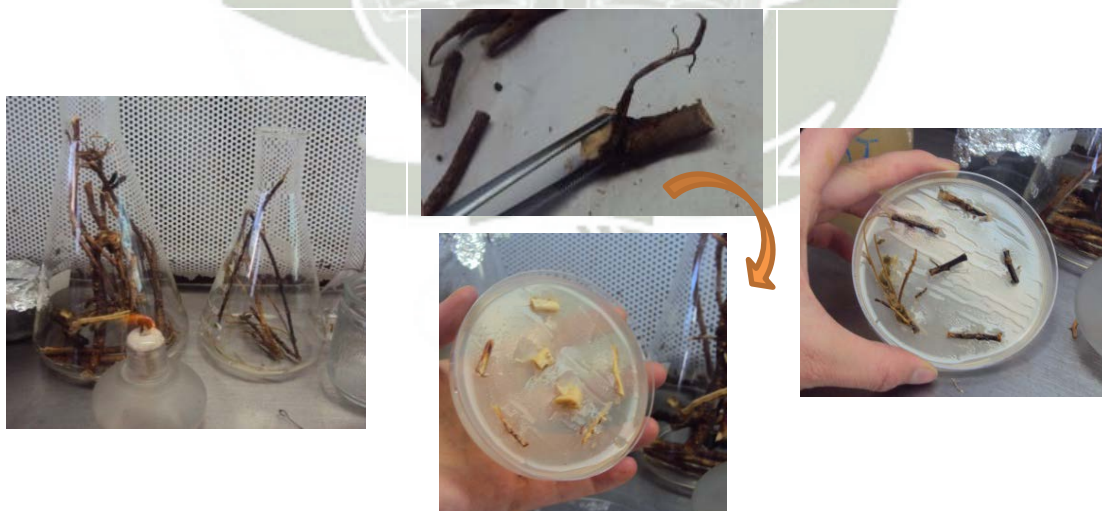
**Figura 17.** Recolección de muestras de rizósfera



(a) zona de la raíz de la planta, de donde se tomó el suelo (b) recolección de suelo en condiciones estériles.

Luego se procedió según Hao Lu (2012) con 75 % de alcohol durante 1 min, y se realizó el enjuague por tres veces con agua estéril, siguiendo por un lavado con hipoclorito de sodio por 30 seg. Finalmente se lavó el tejido con 0.1 % de cloruro de mercurio durante 1 min, y se enjuagó. Se tomaron los tallos con una pinza y un bisturí para comenzar a quitar la corteza de los tallos y raíz.

**Figura 18.** Aislamiento de hongos endófitos de *Astragalus arequipensis*



(a) Las raíces (izq.) y los tallos (der.) fueron lavados de acuerdo al protocolo (b) El material tanto raíz en esta figura, como tallos fueron primero pelados y luego sembrados en PDA (c) Siembra de tallos, se observan seis muestras para cada placa.

Los tallos y raíz fueron cortados en pedazos de 1-1.5 cm y se sembraron en PDA cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias, se realizaron 2 placas de 6 muestras para cada una de las tres plantas elegidas y sus tres diferentes órganos de *Astragalus arequipensis*, siendo estas de raíz, tallos y hojas. (Tabla13). Las placas fueron incubadas durante más de 15 días a temperatura 19-22 °C en la oscuridad, de forma invertida (con la tapa hacia abajo).

**Tabla 13.** Tabla detallada de cultivos repetidos para cada estructura vegetal (tallo, raíz) rizósfera y control.

MUESTRAS				
	A <sup>1</sup>	B <sup>1</sup>	C <sup>1</sup>	
<b>1<sup>2</sup></b>	1A	1B	1C	Tallo
<b>2<sup>2</sup></b>	2A	2B	2C	
<b>1<sup>2</sup></b>	1A	1B	1C	Raíz
<b>2<sup>2</sup></b>	2A	2B	2C	
<b>1<sup>3</sup></b>	1A	1B	1C	Rizósfera
<b>2<sup>3</sup></b>	2A	2B	2C	
<b>3<sup>3</sup></b>	3A	3B	3C	
<b>C</b>	CA	CB	CC	Control

<sup>1</sup>Muestras, tres *Astragalus arequipensis*, de las que se tomó tallo y raíz

<sup>2</sup>número de placas, es decir en la placa 1 entra el doble de cada uno de las muestras 1A, 1B, 1C

<sup>3</sup>Son las diluciones respectivas del suelo tomado, 1=10<sup>-1</sup>, 2=10<sup>-2</sup>, 3=10<sup>-3</sup>

Para aislar los hongos de la rizósfera recolectados, se sembraron las muestras de suelo que fueron obtenidas en medios estériles, se diluyó 1 g de suelo en 10 mL de agua, luego se hicieron diluciones de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> en tubos de ensayo estériles, finalmente se sembraron 200 µL de las diluciones en placas con PDA y se extendieron con un asa Dibrasky estéril por triplicado, ya que se sacaron tres muestras diferentes de rizósfera de tres leguminosas.

Las placas fueron incubadas durante más de 15 días a temperatura 19-22°C en la oscuridad, de forma invertida

Junto a cada grupo de placas (tallos, raíz y rizósfera) se incubó una placa de PDA cloranfenicol, no sembrada como control negativo, en caso de que exista contaminación.

Cuando el tejido empezó a crecer se realizó la transferencia de los microorganismos crecientes a otras placas de PDA, hasta que se obtuviera cada cepa aislada, luego se almacenaron a frío para su conservación.

### **3.3.2.2. Identificación de Hongos Endófitos Aislados**

Las colonias del hongo crecieron lentamente en PDA y se incubaron a la temperatura y condiciones determinadas de acuerdo a los resultados del método anterior, durante 4 semanas. Los discos entonces se hicieron con un perforador de corcho 4,5 mm desde los márgenes de colonias, y uno de los discos se transfirió a placas de PDA, (90 mm de diámetro). Las placas se sellaron, se incubaron a 22 °C. Las características de las colonias se observaron macroscópicamente, y al microscopio; las características de morfologías fueron observadas bajo un microscopio de luz. Las células se montaron en hidróxido de potasio 40 % impregnadas en cinta adhesiva, para visualizar a 40X. Los datos recolectados de las características morfológicas de los hongos aislados tales como presencia de esporas, características de las hifas, entre otras estructuras características de cada género fungal, y luego fueron comparados con la bibliografía de Watanabe (2002) y Koneman (2006)

### **3.3.3. Obtención de los Extractos Alcaloides de la Fermentación en Cultivo Sumergido Discontinuo de los Hongos Endófitos Aislados con Tres Diferentes Medios Selectivos**

#### **3.3.3.1. Fermentación de Hongos Endófitos en Sustrato Sumergido Discontinuo**

Se realizó la fermentación en sistema batch durante 25 días, En los tres medios seleccionados según referencia bibliográfica de mejor eficacia para producción de *Swainsonina* por hongos endófitos, siendo estos medios los de la tabla 14.

**Tabla 14.** Composición de los medios de fermentación empleados para producción de *Swainsonina* por hongos endófitos

**MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE SWAINSONINA<sup>1</sup>**

	[M1] <sup>2</sup>	[M2] <sup>3</sup>	[M3] <sup>4</sup>	
<b>CARBONO<sup>5</sup></b>	30 g/L Sacarosa	50 g/L Glucosa	10 g/L glucosa	
<b>NITRÓGENO<sup>5</sup></b>	3 g/L Nitrato de Sodio	20 g/L Extracto de levadura	20 g/L Avena	20 g/L Avena
			1.8 g/L D-L-Lisina	
<b>SALES<sup>5</sup></b>	0.5 g/L Sulfato de Magnesio	10 g/L Acetato de sodio		
	1 g/L Fosfato de Dipotasio	5 g/L sulfato de amonio		
	0.5 g/L Cloruro de Potasio	2 g/L fosfato de dipotasio		
	10 mg/L Sulfato Ferroso	10 mL/L trazas:		
		• 1 g Sulfato ferroso		
		• 1 g Sulfato de magnesio		
		• 25 mg Cloruro de cobre		
	• 100 mg Cloruro de calcio			
	• 56 mg Ácido bórico			
	• 19 mg Molibdato de amonio			
	• 200 mg Sulfato de zinc			
<b>pH<sup>6</sup></b>	7±0.5	5±0.5	5±0.5	

Caldos en los que se fermentaron cada uno de los hongos endófitos aislados durante 25 días <sup>2</sup> Medio Czapek <sup>3</sup> Medio Avena <sup>4</sup>Medio Avena-Lisina <sup>5</sup>Fuentes de carbono, nitrógeno y sales que contienen cada medio <sup>6</sup> pH indicado por la bibliografía como óptimo para producción de *Swainsonina*, regulados al pH indicado con y ácido cítrico

Se inoculó cada frasco matraz de 250 mL de medio; de la placa madre de cada hongo aislado, se tomó un disco realizado con la base de la pipeta Pasteur estéril, se pasó a cada caldo.

Este procedimiento se repitió con cada cepa para cada uno de los medios, cada matraz que contenía 250 mL cada medio y se cerraron con un tapón. Se incubaron a temperaturas entre 19 y 22°C.

Los frascos fueron incubados a temperatura entre 19°C-22°C durante 25 días, esta temperatura se logró incubando los cultivos en una caja de tecnopor con un foco de 25 watts para que mantenga la temperatura entre estos números, en cultivo sumergido – discontinuo.

El pH fue monitoreado tres veces; al inicio, a los 14 días y al final de periodo de fermentación. El cultivo no se sometió a aireación

### **3.3.3.2. Extracción *Swainsonina* a partir de la Fermentación de Hongos Endófitos**

Se realizó la extracción del fermentado así como del contenido intracelular, todo en un solo procedimiento mediante disrupción celular por sonicación y shock ácido-base provocado por el mismo proceso.

Se añadió 2 mL de hidróxido de amonio al cada 250 mL de fermentado y se sonicó durante 20 min, luego se añadió 200 mL cloroformo, se sonicó por 10 min se mezcló bien y filtró para separar el micelio.

Luego se realizó la extracción ácido-base, de la misma forma que con el material vegetal, primero se añadió 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% para cada tratamiento, se realizó la separación en una pera de decantación, obteniendo en la fase acuosa (superior) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, agua y los alcaloides y en la fase orgánica (inferior) cloroformo.

Se realizó doble extracción con este paso, para luego realizar la extracción básica, se lleva la fase acuosa a pH 9-10 con NH<sub>4</sub>OH y se añadieron 50 mL de cloroformo, se dejó decantar y esta vez en la fase acuosa se tiene agua y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y en la fase orgánica cloroformo con el extracto alcaloideo, se le añadió sulfato de sodio para secar el agua.

### 3.3.3.3. Evaluación de Bioproducción de *Swainsonina* por Método Fermentativo mediante Cromatografía en Capa Fina.

Se empleó cromatografía de capa fina, en una placa sílica gel G60 de dimensiones 31 mm x 100 mm. La fase móvil fue de cloroformo: metanol: amonio: agua (7.0: 2.6: 0.2: 0.2). Empleando una cámara cromatográfica esmerilada, ya que la fase móvil es bastante volátil. Las muestras fueron sembradas empleando un capilar delgado, ya que se encontraban embebidas en cloroformo, y a medida que el solvente es menos denso, el capilar debe ser más delgado. La siembra se realizó de manera lineal y no de punto, como fue realizada en el método de fuente vegetal, la siembra del extracto se realizó en repetición de 20 dejando secar la muestra entre siembra y siembra y sin dañar la sílica. Una vez que la fase móvil alcanza una distancia considerable se marcó la distancia con un lápiz y se dejó secar el cromatograma.

El revelador, reactivo de Ehrlich se aplicó con un atomizador, con cuidado, ya que el reactivo es peligroso. El revelador es específico para los alcaloides indolizidínicos como la *Swainsonina* al reaccionar muestra un color violeta. Se evaluó el  $R_f$  en comparación a la *Swainsonina* estándar. Cierta  $R_f$  debería ser de 0.55. Se aplicó la Ecuación. (1)

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación cualitativa en Cromatografía en Capa Fina, se seleccionaron los hongos productores de *Swainsonina* así como el medio en el que producían una mayor concentración del alcaloide. Para su reproducción y análisis en HPLC y determinación de rendimiento. La selección se realizó de manera cualitativa por intensidad de color al momento de revelar la placa cromatográfica del ensayo en TLC. Se seleccionaron los extractos con mayor intensidad de color en el  $R_f = 0.55$ . De esta manera reducir descarta a los hongos endófitos no capaces de producir *Swainsonina* o producción muy baja.

### 3.3.3.4. Determinación de Cinética de los Hongo(s) Endófito(s) y Medio(S) de Fermentación Seleccionados

Una vez seleccionados los microorganismos y medios más eficaces de producción de *Swainsonina*, se determinó la cinética microbiana en peso seco durante los 25 días de incubación a 19 °C-22 °C en los caldos elegidos, con un inóculo determinado. (Tabla 15)

**Tabla 15.** Hongos endófitos, medios seleccionados y condiciones para producción de *Swainsonina*

<b>Hongos endófitos de <i>Astragalus arequipensis</i></b>	<i>Fusarium spp</i> <i>Ulocladium spp.</i>
<b>Medios de cultivo</b>	Medio Avena [M2] Medio Avena-Lisina [M3]
<b>Tipo de fermentación</b>	Cultivo sumergido discontinuo
<b>Temperatura de Incubación</b>	19-22°C
<b>Tiempo de incubación</b>	25 días

Con el fin de obtener la cinética de crecimiento y determinar cuál es la velocidad de crecimiento específica para cada uno de los dos hongos productores de *Swainsonina* en los medios seleccionados, se realizó la incubación de ellos en 10 mL de medio en matraces de 100 mL en las condiciones de la tabla 20.

El inóculo se tomó del radio de 0.5 mm en mezcla continua. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL en medio estéril cada 12 horas durante todo el periodo de incubación así como el control de temperatura de incubación. Las alícuotas fueron centrifugadas a 10000 rpm por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante, se secaron las células y se pesaron.

Para determinar la velocidad de crecimiento microbiana (g células/hora) se aplicó la siguiente ecuación donde  $\mu$ = velocidad de crecimiento t tiempo en horas,  $X_f$ = concentración final (g)  $X_0$  = concentración inicial (g)

$$X_f = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

### **3.3.4. Desarrollo de una Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para Evaluar las Concentraciones de *Swainsonina* de los Extractos Alcaloideos Obtenidos a partir de *Astragalus arequipensis* y su(s) Hongo(s) Endófito(s)**

#### **3.3.4.1. Evaluación Cualitativamente DE Extractos Alcaloideos Obtenidos a partir de *Astragalus arequipensis* y su Biomasa Fungal Endófito, Individualmente, por Cromatografía en Capa Fina (TLC)**

Se realizó una corrida en cromatografía en capa fina de los extractos alcaloideos obtenidos a partir de fuente vegetal y Fungal seleccionados como eficaces para determinar cualitativamente la cantidad de producción de cada fuente.

#### **3.3.4.2. Desarrollo de Técnica HPLC-UV para Cuantificación de *Swainsonina*.**

El sistema cromatográfico consistió en un sistema Merck Hitachi HPLC con un detector UV-visible (UVL-7400). La separación se logró con doble columna C-18 Performance RP-18 (10mm x4.6 mm ID) obtenida de Chromolith. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL/min y consistió en una mezcla de fosfato ácido de potasio a pH 7.5 y concentración 0.025 M-acetonitrilo (60:40, v/v).

Cada solvente de la fase móvil se desgasificó con una membrana de nylon de 47mm de diámetro. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L y la longitud de onda para la detección se estableció en 205 nm (Luz UV)

Para realizar la curva de calibración, se preparó una solución stock de 24.48  $\mu$ g/mL de *Swainsonina* disolviendo 0.1 mg del estándar en 4.08 mL de metanol.

Las soluciones estándar se prepararon haciendo diluciones de la solución stock en metanol para las concentraciones de 0.5, 1, 2, 4, 6  $\mu$ g/mL.

Se realizaron inyecciones de 100  $\mu$ l en triplicado para cada concentración y se corrieron por el HPLC en las condiciones ya expuestas. La regresión fue obtenida ploteando concentraciones versus área integrada del pico.

Se tomaron los datos de área y tiempo de retención del pico de *Swainsonina* obtenido en el cromatograma para luego determinar la desviación estándar relativa.

A partir de los datos de la curva de calibración se obtuvieron la ecuación por regresión lineal, la que permitió determinar las concentraciones de las muestras a partir de su área integrada proporcionada por el HPLC. Una vez realizada la curva de calibración, se corrieron las muestras de origen vegetal como Fungal; para lo cual, se pulverizaron 500 g de hojas secas de *Astragalus arequipensis.*, se llevaron al sistema reflujo con cloroformo e hidróxido de amonio (pH 9, 10 min, 90°C), luego el filtrado se acidificó con ácido sulfúrico 5 %, en una pera de decantación se recupera la fase acuosa, esta última se llevó a pH 9 con hidróxido de amonio, luego con cloroformo para recuperar el alcaloide en la fase orgánica.

Finalmente se evaporó totalmente el cloroformo. Las muestras fueron enrazadas a 5mL en acetonitrilo, centrifugadas para desechar cualquier impureza para el ensayo y filtradas a través de un filtro 0.22  $\mu\text{m}$  de 10 mm antes de ser inyectados al HPLC. Se trató de la misma forma la 20 g. de hojas pulverizadas.

Se emplearon 3 muestras: extracto de 20 g. de hojas, el segundo y tercero son diluciones del extracto de 500 g. una 1:9 y la otra 2:8. Estas diluciones se hicieron debido a que las concentraciones de la muestra de 500 g de hojas pulverizadas se encontraban muy concentradas. Las muestras de origen fungal, se obtuvieron a partir del fermentado de dos hongos aislados a partir de la planta, aparentemente *Fusarium spp.* y *Ulocladium spp.*, de acuerdo a sus características microscópicas y macroscópicas. Fueron cultivados en 500mL de dos caldos: medio Avena 6% (20 g/L glucosa, 20 g/L extracto de levadura, 10 g/L acetato de sodio, 5 g/L Sulfato de amonio, 2 g/L fosfato de potasio, pH~5) y medio Avena-Lisina (20 g/L avena, 10 g/L glucosa, 1.8 g/L D-L- lisina) durante 25 días a temperatura 19°C-20°C.

Para la extracción de *Swainsonina* y la obtención de las cuatro muestras de extracto alcaloideo, se trataron 500 mL de cada fermentado. Se añadió hidróxido de amonio y se sonicó durante 20 min, luego se añadió cloroformo, se sonicó por 10 min se mezcló bien y filtró, luego se añadió el ácido sulfúrico 5% al filtrado en una pera de decantación, se recuperó la fase acuosa para llevarla a pH 9 con hidróxido de amonio y se mezcló con cloroformo en una pera, la fase orgánica es, el cloroformo fue evaporado.

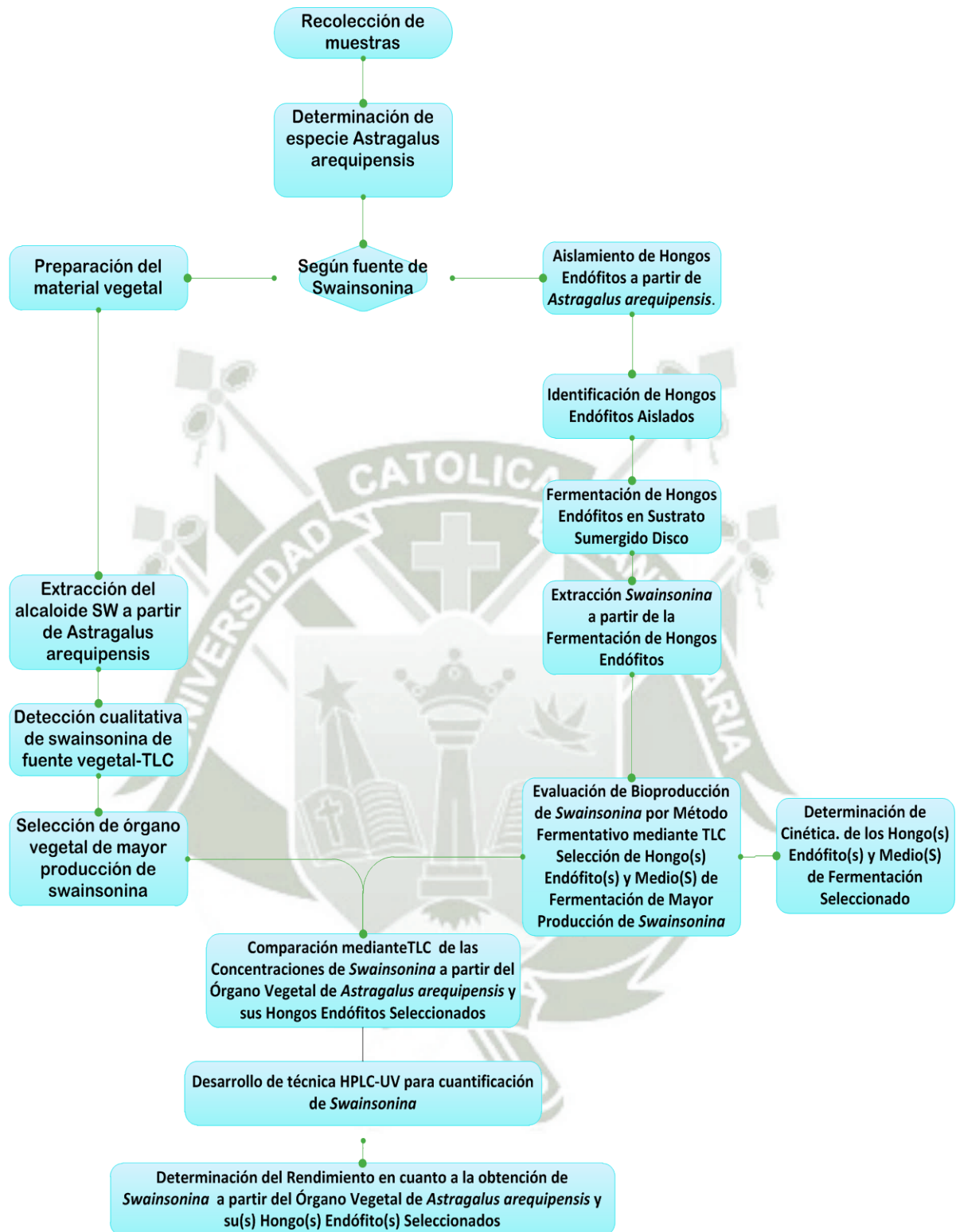
Las muestras fueron enraizadas a 5 mL en acetonitrilo, centrifugadas para desechar cualquier impureza para el ensayo y filtradas a través de un filtro 0.22  $\mu\text{m}$  de 10 mm antes de ser inyectados al HPLC. Por lo tanto se tuvo 4 muestras de origen fungal y tres muestras de origen vegetal.

#### **3.3.4.3. Determinación de Concentraciones en Cuanto a la Obtención de *Swainsonina* a partir del Órgano Vegetal de *Astragalus arequipensis* y su(s) Hongo(s) Endófito(s) Seleccionados**

A partir de los datos obtenidos por el método de HPLC-UV desarrollado, se determinó la concentración en  $\mu\text{g}$  de *Swainsonina* obtenido por gramo de hojas pulverizadas de *Astragalus arequipensis* ( $\mu\text{g SW/g}$ ). Así como de los hongos elegidos  $\mu\text{g}$  de *Swainsonina* por gramos de células peso seco ( $\mu\text{g SW/g}$ ) y de acuerdo al fermentado en  $\mu\text{g}$  de *Swainsonina* por litro de medio ( $\mu\text{g SW/L}$ ).

Para luego realizar una comparación y finalmente determinar si el método extractivo o el método fermentativo es la mayor fuente de obtención de *Swainsonina*.

### 3.4. Flujograma De Actividades



# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Obtención y Evaluación por TLC de los Extractos Alcaloideos de las Hojas, Tallos y Raíz de *Astragalus arequipensis* Recolectada de la Región Arequipa

#### 4.1.1. Recolección de Muestras.

El terreno donde se encontró la leguminosa fue lleno de pastizales (Figura 19) y cuya temperatura ambiental oscilaba alrededor de los 13°C.

**Figura 19.** Fotografía del hábitat natural de la planta recolectada en el poblado de Huambo-Cotahuasi, Arequipa. <sup>1</sup>



Las plantas recolectadas fueron arbustos y tuvieron las características morfológicas presentadas en la Tabla 16 la cual también muestra en estado vegetativo en que se encontraban las plantas recolectadas. Se encuentran en estado inicial de florecencia, presentaron flores amarillentas y con una altura promedio de 0.5 a 1 cm de altura, con objetivo de obtener mayor información acerca de la especie exacta obtenida.

De acuerdo con los datos presentados en la tabla anterior se observa que la altura y ancho promedio de las muestras obtenidas fueron de 53.08 cm y 29.20 cm, respectivamente observando que su ciclo vegetativo fue de estado recesivo en el periodo muestreado.

**Tabla 16.** Características de cada Planta recolectada

Muestra	Altura (cm)	Ancho (cm)	Ciclo Vegetativo
1	50.00	32.00	Estado recesivo <sup>1</sup>
2	66.00	28.00	Estado recesivo
3	75.00	47.00	Estado recesivo
4	30.00	09.00	Estado recesivo
5	50.00	30.00	Estado recesivo
6	49.00	24.00	Estado recesivo
7	74.00	15.00	Estado recesivo
8	32.00	49.00	Estado recesivo
9	51.00	39.00	Estado recesivo
10	45.00	18.50	Estado Florecimiento
11	65.00	39.00	Estado Florecimiento
12	50.00	20.00	Estado Florecimiento

<sup>1</sup> Hace referencia al estado vegetativo que se encuentra (sin flor)(Agosto)

En la Figura 20 se observa la flor que en el ápice del tallo crecen las flores. (b) vista más amplia de las características de los pétalos, de 9-10 mm de longitud de color amarillento.

**Figura 20.** Morfología de la flor, el cáliz, los tallos menores y las hojas.



a



b

#### 4.1.2. Determinación de Especie de *Astragalus* recolectada.

El laboratorio de Herbológia de la Universidad Nacional de San Agustín determinó la planta recolectada como como *Astragalus arequipensis*. Se realizó un listado de las características etimológicas de plantas. En donde se detallan las características de hoja, tallo, semilla, flor y otras especificaciones (Tabla 17) de la planta recolectada en Huambo – Cotahuasi.

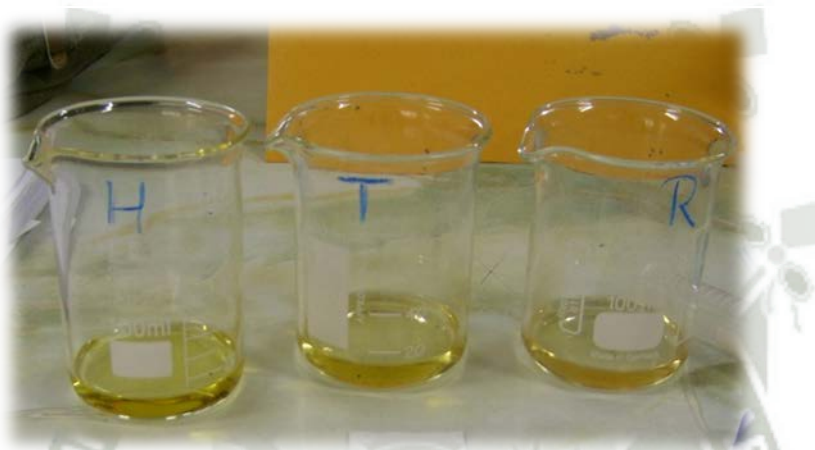
**Tabla 17.** Morfología de la especie obtenida (medidas detalladas en rangos)

ESTRUCTURA	DETALLES
<b>TALLOS</b>	
Longitud (cm) <sup>1</sup>	36-70
<b>HOJAS</b>	
Forma	Elípticas
Largo x Ancho (mm)	5x3
Ápice	Obtuso
Base	Obtusa
Pubescencia	Blanco-Sérica
Pelos Glandulares	En la base de los folíolos
<b>FLORES<sup>2</sup></b>	
Número	5
Longitud (mm)	9-10
Color	Amarillo
<b>CÁLIZ<sup>3</sup></b>	
Tubo, longitud (mm)	3.5
Dientes, longitud (mm)	1.5
Superficie Interna	Glabra
<b>LEGUMBRE</b>	
Invaginación	Sólo en la base
Valvas	Subcoriáceas
Ápice	Apiculado (1mm)

#### 4.1.3. Extracción de Swainsonina a partir de *Astragalus arequipensis*

El extracto de la planta es inicialmente verde claro, cuando se acidifica, torna verde oscuro y cuando se regula a pH 9-10, vira hacia un color amarillo. El extracto alcaloideo en cloroformo posee un color amarillo translúcido (Figura 21).

**Figura 21.** Extractos alcaloideos de *Astragalus arequipensis*.



Extractos alcaloideos de izquierda a derecha se observan de hojas, tallos y raíz..

#### 4.1.4. Evaluación Cualitativa de Presencia de *Swainsonina* mediante TLC

El revelado que se realizó con los vapores de yodo resultaron confusos ya que revela también otros compuestos que se encuentran en el extracto alcaloideo y no se puede distinguir exactamente cuál es la *Swainsonina*, porque el yodo tiene afinidad por casi todos los compuestos, luego resulta tóxico y el otro inconveniente es que el revelado se desvanece rápidamente con el tiempo (Figura 22.a).

El revelado con el Reactivo de Ehrlich <sup>[1]</sup> con la preparación de 0.5 g *p*-dimetil aminobenzaldehído, 10 mL de ácido clorhídrico concentrado, 10 mL de etanol absoluto, no resultó efectiva, ya que al momento de observar algún rastro del alcaloide no se detectó nada, la reacción parece ser muy fuerte para la sílica ya que la mancha toda. (Figura 22.b)

Por lo tanto, se eligió como revelador al Reactivo de Ehrlich <sup>[2]</sup> con la preparación 0.5 g *p*-dimetil amino benzaldehído, 10 mL metanol, 10 mL ácido fosfórico; para todos los ensayos de la experimentación de determinación cualitativa de *Swainsonina*, debido a que se visualiza una línea característica del alcaloide de color violeta según bibliografía de manera nítida al  $R_f \approx 0.55$ . Es preciso indicar que una vez revelado, a la luz UV el alcaloide resulta ser mucho más fosforescente que los demás compuestos (Figura 22.c).

**Figura 22.** Placas cromatográficas con los tres Reveladores

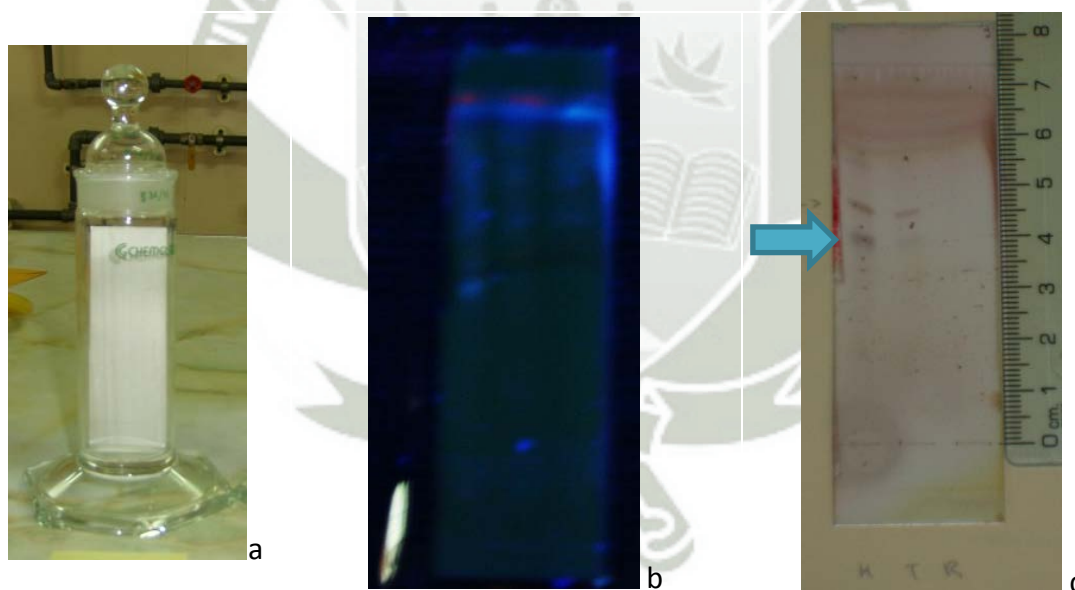


(a) Corrida cromatográfica del extracto alcaloideo revelado con vapores de yodo, *Swainsonina* a los 4.1 cm y distancia de fase móvil de 7.5 cm,  $R_f=0.546$  (b) Revelado Corrida cromatográfica del extracto alcaloideo revelado con Reactivo de Ehrlich <sup>[1]</sup>. (c) Corrida cromatográfica del extracto alcaloideo revelado con Reactivo de Ehrlich <sup>[2]</sup>, *Swainsonina* a los 4.2 cm y distancia de fase móvil de 7.7 cm,  $R_f=0.545$

Una vez estandarizado el procedimiento de cromatografía en capa fina para detección de *Swainsonina* y la existencia de este alcaloide en por lo menos las hojas de la planta, se determinó que órgano de ésta es la que provee de mayores concentraciones de *Swainsonina* de manera cualitativa mediante TLC. Por lo tanto, se realizó la corrida cromatográfica colocando tres muestras paralelas H (hojas), T (tallos) y R (raíz), y se reveló con el Reactivo de Ehrlich <sup>[2]</sup> (*p*-dimetil amino benzaldehído, metanol y ácido orto fosfórico)

La figura 23b muestra la placa cromatográfica bajo la luz UV y se observan líneas a diferentes medidas, midiendo a partir de la línea de partida de las muestras. Luego se realizó el revelado con el reactivo de Ehrlich de mayor efectividad (Figura 23c) (0.5 g *p*-dimetil aminobenzaldehido, 12.5 mL metanol, 12.5 mL ácido. orto fosfórico). Se observó que comienzan a aparecen manchas lilas de diferente intensidad.

**Figura 23.** Placa cromatográfica revelada con Ehrlich de los extractos alcaloideos de hojas, raíz y tallo de *Astragalus arequipensis*.



(a) Placa cromatográfica en cámara cromatográfica esmerilada. (b) revelado del cromatograma al UV, se observan en el primer carril de hojas 3 manchas clara, en el segundo carril de tallos, tres manchas superiores tenues y el carril de raíz posee dos rayas. (c) El revelado con el Reactivo de Ehrlich muestra dos líneas para las hojas, de las que es violeta la primera con un  $R_f=0.54$ , el segundo carril posee las mismas líneas pero mucho más tenues y finalmente la raíz no posee ninguna evidencia.

Ya que el reactivo de Ehrlich sólo reconoce anillos pirrólicos de indolizidínicos como la *Swainsonina*, los torna violetas. El Rf de referencia para la *Swainsonina* se encuentra entre los 0.53 y 0.55; por lo tanto las manchas azules-violetas en el cromatograma, pertenecen a la *Swainsonina*.

La franja de color violeta con Rf = 0.54 se encuentra pertenece a las hojas y una más tenue la del tallo, sin embargo la raíz no posee ninguna mancha visible a este Rf. Es entonces la presencia de *Swainsonina* en el extracto alcaloideo es mayor en las hojas que en los tallos, encontrándose ausente o no detectable en las raíces, ya que es posible que haya pero no en cantidades detectables al TLC.

#### **4.2. Aislamiento e Identificación de los Hongos Endófitos de los Tallos, Raíz y Rizósfera de *Astragalus arequipensis***

##### **4.2.1. Aislamiento de Hongos Endófitos a partir de *Astragalus arequipensis***

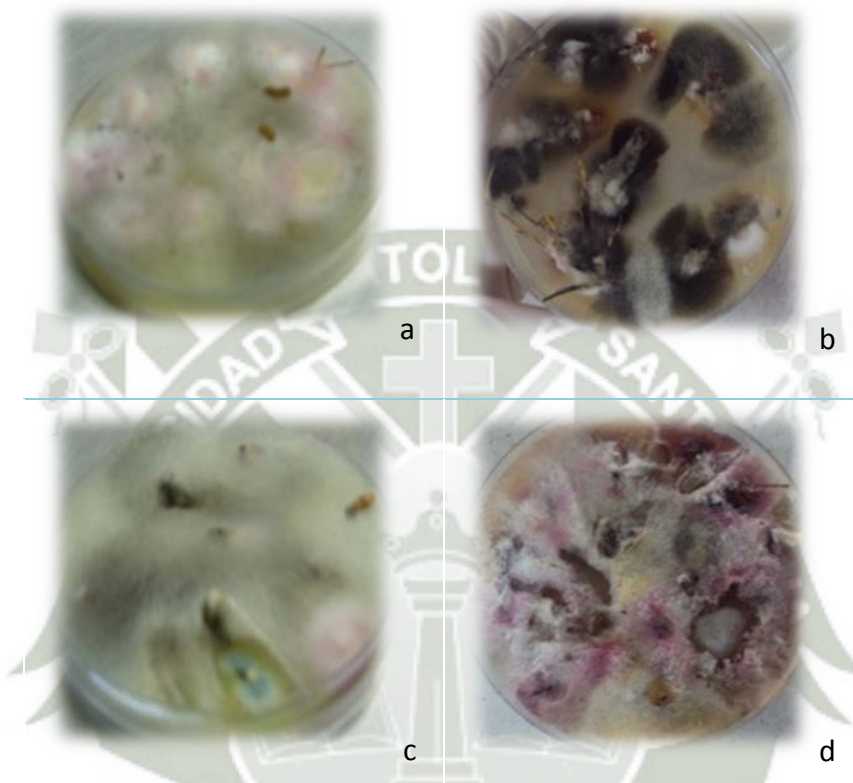
Se determinó el crecimiento de más de una colonia de hongos en cada muestra, proporción, tiempo de crecimiento, y características macroscópicas de las colonias que crecieron en PDA de cada grupo de muestra., ya sea de su color y textura de micelio como el viraje de color por parte de las placas debido al crecimiento de su micelio vegetativo.

No se determinó crecimiento de contaminación a lo largo del procedimiento de aislamiento de hongos endófitos de *Astragalus arequipensis*; por lo tanto, se determina que todos los hongos aislados son naturalmente de la planta tomada como muestra.

Cuando el tejido empezó a crecer se realizó la transferencia de los microorganismos crecientes a otras placas de PDA. Se realizó el repique para purificación de microorganismos durante 12 semanas, una vez determinados los microorganismos, se almacenaron cada uno en agar PCA y conservar a 4 °C, la placa madre. Se tuvo placas con los mismos medios durante cada proceso incubando al igual que las muestras como control para verificar contaminación.

La Figura 24 muestra el crecimiento que hubo de la siembra de cada una de las partes de *Astragalus arequipensis*, se pueden distinguir al menos unos 5 a 6 colonias diferentes.

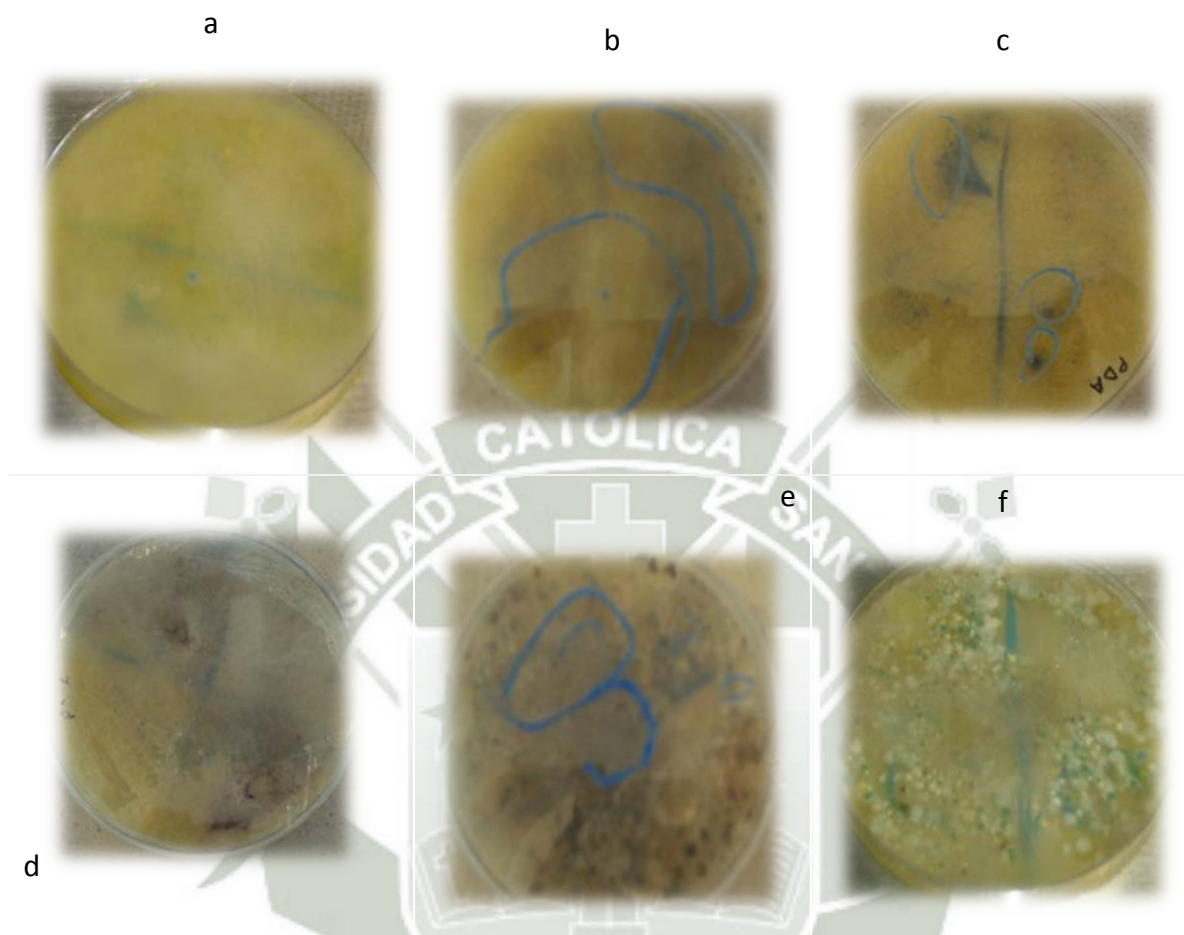
**Figura 24.** Placas PDA de crecimiento de hongos endófitos de tallos y raíz de *Astragalus arequipensis*, a los 28 días de incubación a 19-22°C.



(a) Placa 1 de tallos, contiene muestras 1A, 1B y 1C, (b) Placa 2 de tallo, contiene muestras 2A, 2B y 2C, (c) Placa 1 de raíz, contiene muestras 1A, 1B y 1C. (d) Placa 2 de raíz, contiene muestras 2A, 2B y 2C.

La figura 20 muestra las placas de PDA a temperatura entre 19 °C y 22 °C, con crecimiento de las muestras de rizósfera a las tres diluciones, se observa que en común hay tres colonias, una de micelio aéreo blanco y reverso amarillo, otra de micelio bajo verde con borde blanco y finalmente otro micelio de color gris-negro, que más parece una etapa de maduración del micelio blanco con reverso amarillo. Esto también determina que no hubo contaminación externa, ya que las colonias de hongos que crecieron de la rizósfera son en común en las 6 placas

**Figura 25.** Placas PDA de crecimiento de hongos endófitos de *Astragalus arequipensis*, a los 28 días de incubación a 23°C de la muestras de rizósfera en tres diluciones ( $1=10^1$ ,  $2=10^2$ ,  $3=10^3$ )



(a) Muestra 1A Y 1B (b) placa de las muestra 1C (c) placa de la muestra 2A y 2B (d) placa de cultivo de la muestra 2C (e) placa de cultivo de las muestra 3A y 3B (f) Placa de cultivo de la muestra 3C.

#### 4.2.2. Identificación de Hongos Endófitos Aislados

Los hongos endófitos aislados a partir de tallos, raíz y rizósfera, fueron identificados mediante la velocidad de crecimiento, características macroscópicas de la colonia, viraje de color del medio, micelio aéreo y finalmente características microscópicas como hifas, presencia y forma de conidios, conidióforos, macroconidios, macroconidios, esporangiosporos, fiálides, clamidoconidios.

Los detalles de las características macroscópicas de las colonias de hongos endófitos obtenidas en cada placa de PDA, se encuentran mencionadas por grupo de muestra en las tablas 18 y 19.

De acuerdo a estos resultados, el número de hongos endófitos encontrados en los tallos de *Astragalus arequipensis* es de 4 diferentes colonias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ); los encontrados en la raíz son los mismos más 1, es decir 5 diferentes colonias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Al tener las mismas colonias de las muestra de una misma planta, quiere decir que no hubo contaminación, así como confirmarán las placas control que no tuvieron algún crecimiento).

Las características microscópicas fueron observadas al microscopio a 40X, por impregnación de las células en cinta adhesiva con hidróxido de potasio (40%) en un portaobjetos. Resulta un método bastante efectivo para visualizar a los hongos.

Se lograron obtener cinco diferentes hongos seleccionados, después de 12 semanas de repicado. Cada uno de los hongos se sembró en una sola placa PDA a 19-22°C durante 15 días después de ser purificadas y se realizaron las vistas al microscopio.

**Tabla 18.** Características macroscópicas de los hongos endófitos aislados de tallos.

<b>CULTIVO DE TALLOS DE <i>Astragalus arequipensis</i> EN PDA<sup>1</sup></b>								
<b>N° PLACA</b>		<b>1</b>				<b>2</b>		
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b><math>\alpha^2</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>\gamma</math></b>	<b><math>\delta</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\gamma</math></b>
<b>MACROSCÓPICAS</b>	<b>Crecimiento<sup>3</sup></b>	Lento	Medio	Lento	Rápido	Medio	Lento	Lento
	<b>Color (micelio vegetativo)</b>	Rosa	Beige	Amarillo	Negro	Beige	Rosa	Amarillo
	<b>Color (micelio)</b>	Blanco-Rosa	Blanco	Blanco-Gris	Negro	Blanco	Blanco-rosa	Blanco-Gris
	<b>Micelio-Tamaño<sup>4</sup></b>	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo
		++	+	+++	+	+	++	+++

<sup>1</sup>Tiempo de Incubación: 28 días

<sup>2</sup>cada una de las colonias han sido nombradas por alfabeto griego, para luego identificarlos con su nombre propio.

<sup>3</sup>Hace referencia al total del tiempo que estuvo la placa incubando, si su crecimiento fue rápido, mediano o lento en comparación entre las colonias.

<sup>4</sup>Los Micelios son aéreos, pero unos más altos que otros, es por eso que se valoran de + a +++.

**Tabla 19.** Características macroscópicas de los hongos endófitos aislados de la raíz.

CULTIVO DE RAÍZ DE <i>Astragalus arequipensis</i> EN PDA <sup>1</sup>								
N° PLACA		1			2			
CARACTERÍSTICAS		$\alpha$ 2	$\beta$	$\gamma$	$\epsilon$	$\beta$	$\alpha$	$\gamma$
MACROSCÓPICAS	<b>Crecimiento</b> <sup>3</sup>	Lento	Medio	Lento	Rápido	Medio	Lento	Lento
	<b>Color (micelio vegetativo)</b>	Rosa	Beige	Amarillo	Verde	Beige	Rosa /blanco	Amarillo
	<b>Color (micelio)</b>	Blanco-rosa	Blanco	Blanco-Gris	Verde	Blanco	Rosa	Blanco-Gris
	<b>Micelio-Tamaño</b> <sup>4</sup>	Aéreo ++	Aéreo +	Aéreo +++	Aéreo +	Aéreo +	Aéreo ++	Aéreo +++

<sup>1</sup>Tiempo de Incubación: 28 días

<sup>2</sup>cada una de las colonias han sido nombradas por alfabeto griego, para luego identificarlos con su nombre propio.

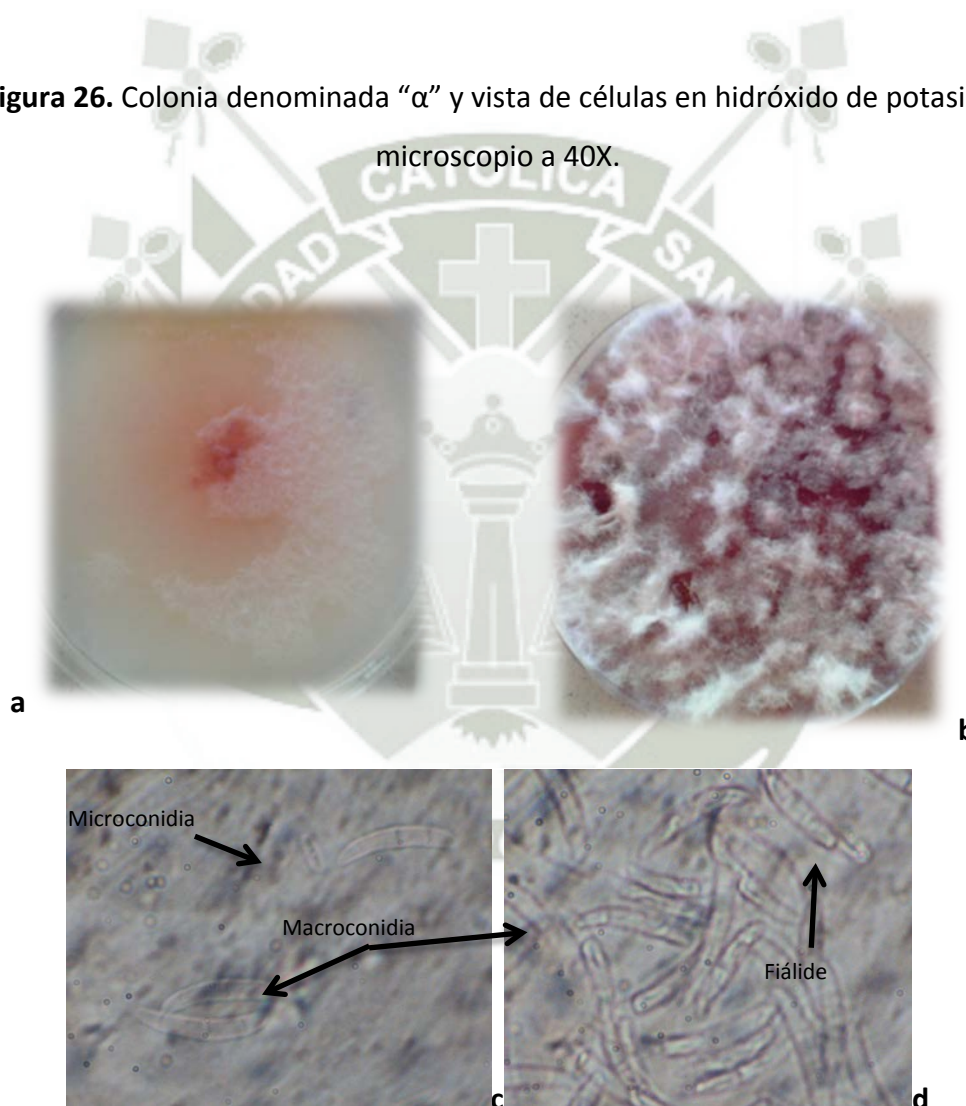
<sup>3</sup>Hace referencia al total del tiempo que estuvo la placa incubando, si su crecimiento fue rápido, medio o lento en comparación entre las colonias.

<sup>4</sup>Los Micelios son aéreos, pero unos más altos que otros, es por eso que se valoran de + a +++.

La colonia denominada “ $\alpha$ ” con micelio aéreo algodonoso blanco y micelio vegetativo rosa (Figura 26). La apariencia algodonosa apareció a partir de los 12-15 días de incubación en PDA a temperatura de 19°C-22°C

En cuanto al examen microscópico, se observaron estructuras hialinas; macroconidias multicelulares largas, con forma de media luna u hoz cuyas células se encontraban separadas por tabiques y además se observó la presencia microconidias. Las hifas o conidióforos son septadas con fiálides en la base apical de las macroconidias.

**Figura 26.** Colonia denominada “ $\alpha$ ” y vista de células en hidróxido de potasio al microscopio a 40X.

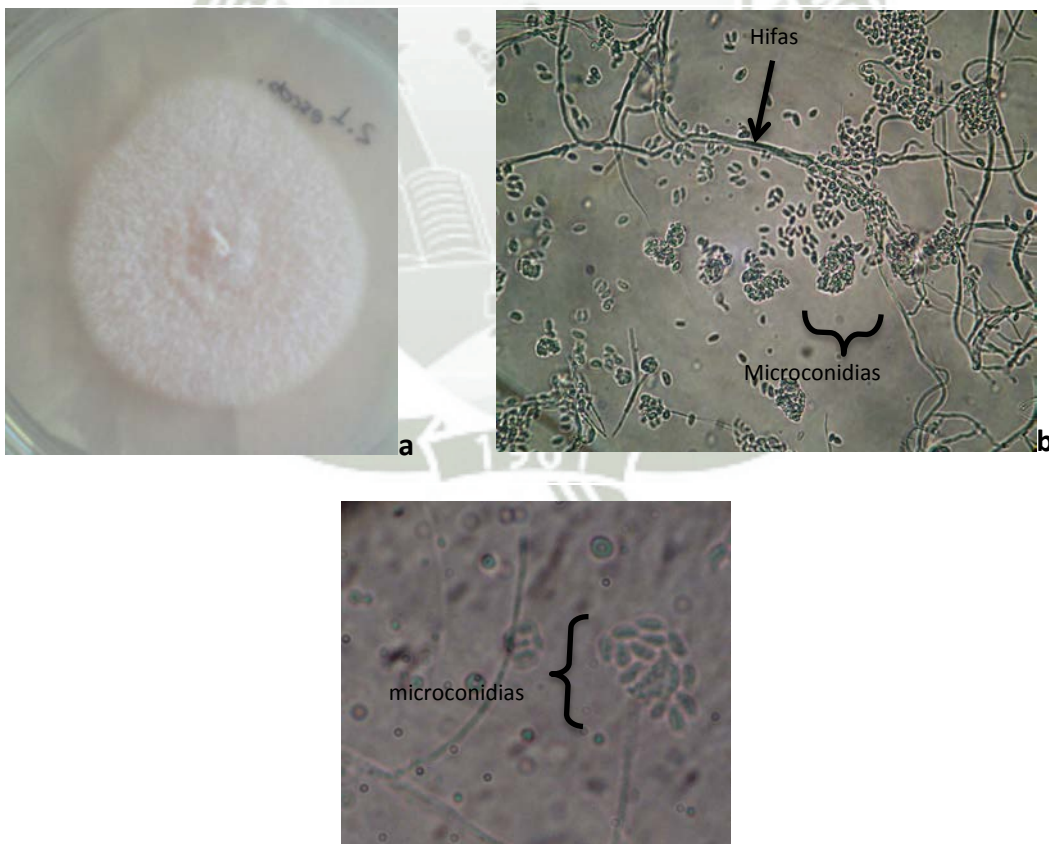


(a) Colonia “ $\alpha$ ” a los 7 días de incubación en PDA (b) colonia “ $\alpha$ ” a los 15 días de incubación en PDA (c,d) vista al microscopio de macroconidias, microconidias y fiálides.

La colonia denominada “ $\beta$ ” (Figura 27) con crecimiento moderadamente rápido en comparación al resto de las colonias aisladas ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Alcanza un diámetro de la colonia de 1-3 cm a los 7 días de incubación en PDA a 19-22°C La colonia es de color blanco-perla y el micelio vegetativo es beige. La textura de la colonia es compacta, plana, y elevada en el centro, es glabra (no peluda).

En el examen microscópico se observaron hifas hialinas septadas, con fiálides que forman directamente las puntas de hifas. Las fiálides se encontraron separadas de las hifas por un tabique. En los vértices de las fiálides hay microconidias hialinas que se encuentran en grupos aparentemente sostenidos por alguna sustancia, en esferas frágiles, son fusiformes con una ligera curva, parecidos a una media luna superficial.

**Figura 27.** Colonia denominada “ $\beta$ ” y vista de células en hidróxido de potasio al microscopio a 40X.

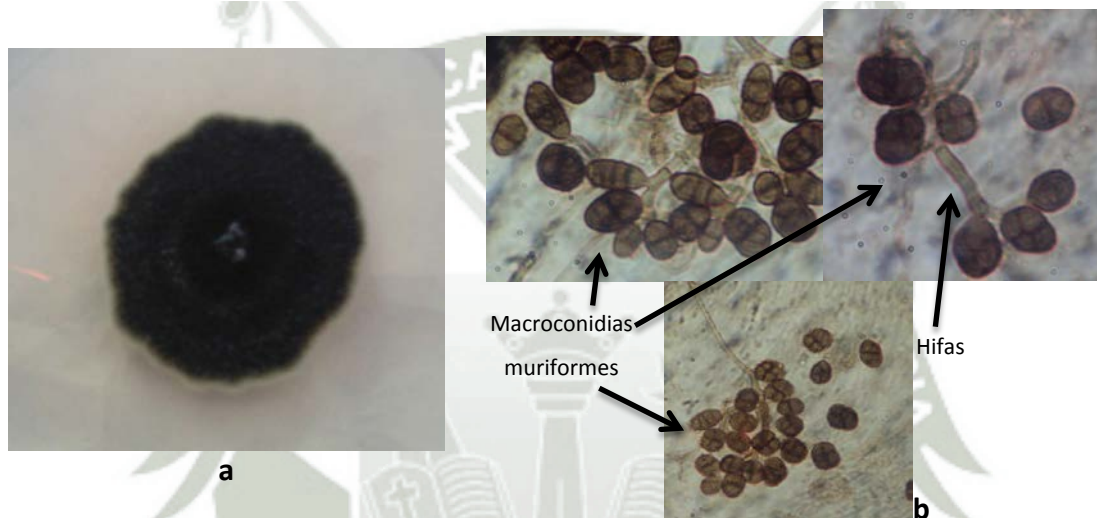


(a) Colonia “ $\beta$ ” a los 7 días de incubación en PDA (b) vista al microscopio (c) microconidias septados.

La colonia denominada  $\delta$  (Figura 28) con micelio aéreo de color azul oliva a negro de textura aterciopelada y micelio vegetativo, de color marrón a negro, característico de los hongos demateaceos; con un tiempo de crecimiento de 5 días en PDA a 19 - 22 °C.

En cuanto a la vista microscópica, se observaron hifas de color marrón con tabiques, macroconidias grandes multicelulares separadas por tabiques transversales y longitudinales (Muriformes) no forman cadenas y nacen de hifas cortas.

**Figura 28.** Colonia denominada  $\delta$  y vista de células en KOH al microscopio a 40X.

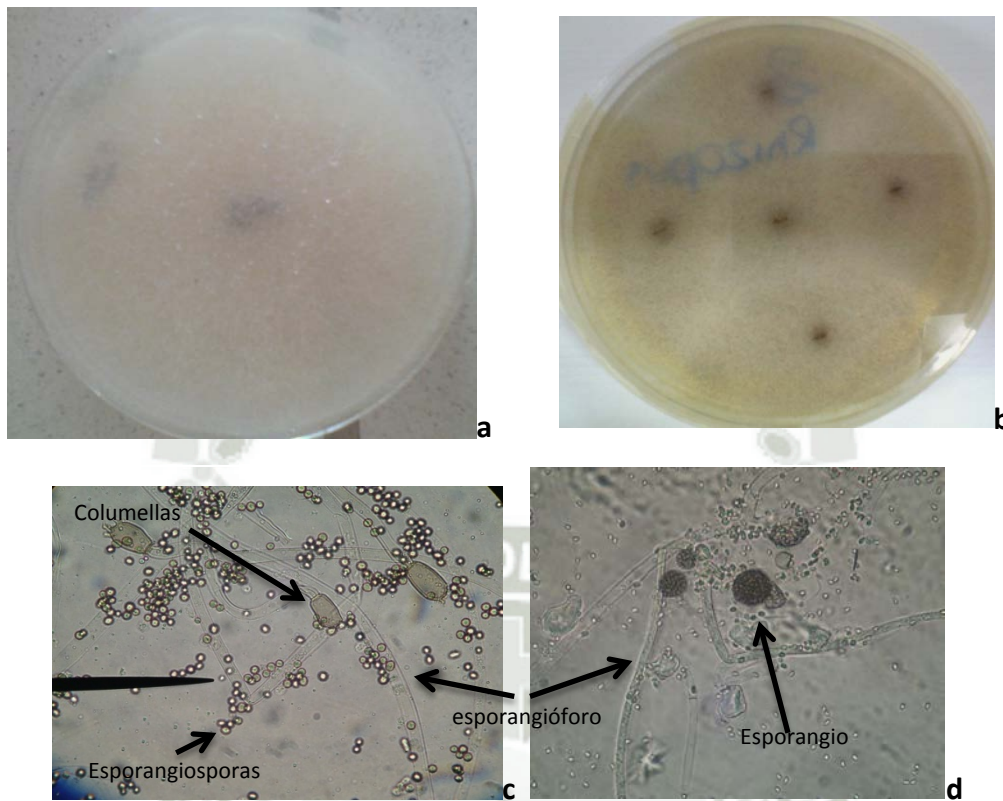


(a) Colonia “ $\delta$ ” a los 10 días de incubación en PDA (b) vista al microscopio.

Colonia denominada “ $\gamma$ ” (Figura 29) de micelio aéreo vellosito de color blanco al inicio y luego se torna gris, al cabo de 18 días de incubación el micelio vegetativo se torna amarillo y sobre el micelio aéreo aparecen puntos negros (esporangios).

El examen microscópico reveló hifas de color castaño de tamaño irregular desprovistas de tabiques No posee rizoides por eso se descarta de que sea otra especie zigmoidea como *Rhizopus* o *Absidia* Los esporangióforos se originaron individualmente del micelio ramificado. Cada esporangióforo acababa en un columella ligeramente bulbosa que se extendía dentro de un esporangio esférico de pared lisa. Las esporangiosporas eran esféricas con ligera pigmentación parda, marrón claro.

**Figura 29.** Colonia denominada “ $\gamma$ ” vista en hidróxido de potasio al microscopio a 40X.



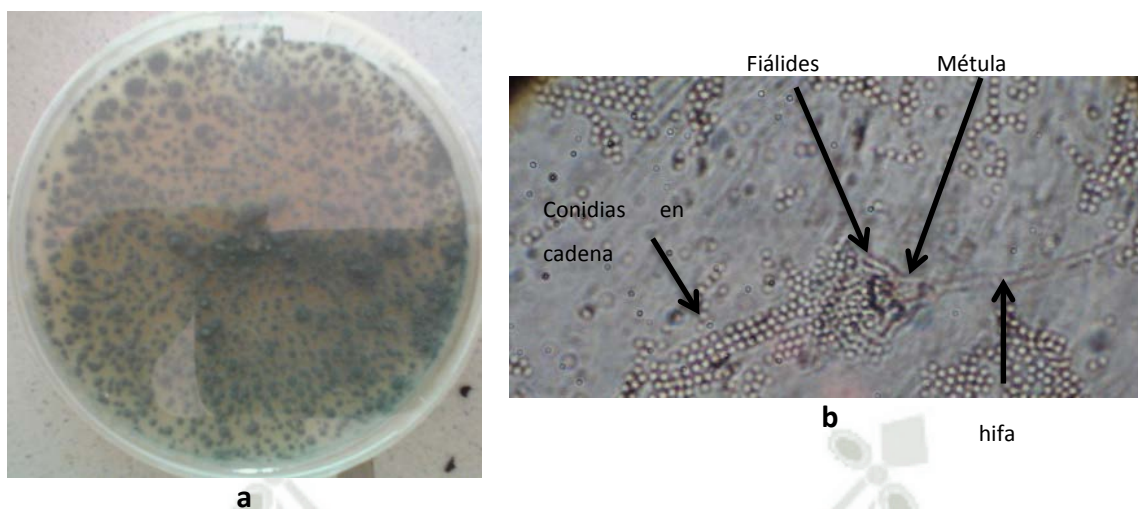
(a) Colonia “ $\gamma$ ” a los 7 días de incubación en PDA (b) Colonia “ $\gamma$ ” a los 12 días de incubación en PDA (c, d) vista al microscopio a 40X.

La colonia denominada “ $\epsilon$ ” (Figura 30) tiene crecimiento rápido de 5 a 10 días, con un crecimiento a los 5 días de las colonias dispersas verdes polvoriento.

El examen microscópico muestra la hifa (conidióforo) hialino con métulas y fiálides a partir de cuyos extremos se originan cadenas de conidios. Los conidios son esféricos, de tamaño regular ordenados en cadenas.

Por lo tanto, la identificación de los hongos endófitos aislados mediante los métodos descritos, en continuo repique durante 12 semanas, se realizó comparando los resultados observados descritos anteriormente con la bibliografía, tomando como fuente bibliográfica principal a Watanabe (2002) y Koneman (2008). Los géneros determinados para cada hongo endófito se encuentran en la Tabla 17.

**Figura 30.** Colonia denominada “ε” y vista de células en KOH al microscopio a 40X.



(a) Colonia “ε” a los 7 días de incubación en PDA (b) vista al microscopio 40X.

**Tabla 20.** Denominación de los hongos endófitos aislados a partir de *Astragalus arequipensis*.

**DENOMINACIÓN ALFA GRIEGA DE CADA COLONIA**

	α	β	δ	γ	ε
<b>Especie</b>	<i>Fusarium spp</i>	<i>Acremonium spp.</i>	<i>Ulocladium spp.</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>
<b>Género</b>	Fusarium	Acremonium	Ulocladium	Mucor	Penicillium
<b>Familia</b>	Nectriaceae	Hypocreaceae	Pleosporaceae	Mucoraceae	Trichocomaceae
<b>Orden</b>	Hypocreales	Hypocreales	Pleosporales	Mucorales	Eurotiales
<b>Clase</b>	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Dothideomycetes	Zygomycetes	Eurotiomycetes
<b>Filo</b>	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota	zygomycota	Ascomycota

#### 4.3. Obtención de Extractos Alcaloides de la Fermentación en Cultivo Sumergido Discontinuo de los Hongos Endófitos Aislados en Tres Diferentes Medios Selectivos

##### 4.3.1. Fermentación de Hongos Endófitos en Cultivo Sumergido Discontinuo

Habiendo aislado e identificado 5 hongos endófitos de *Astragalus arequipensis*, se prepararon tres medios distintos para poder determinar la producción de *Swainsonina* por parte de estos hongos en cultivo sumergido, el primero es el Czapek [M1], el segundo es Avena [M2] (Figura 31) y el tercero es Avena-Lisina [M3] (Figura 32).

**Figura 31.** Matraces de fermentación en medio Avena [M2].



Cultivo sumergido discontinuo (de izquierda a derecha) con *Fusarium spp*, *Ulocladium spp*, *Mucor spp*, *Acremonium spp* y *Penicillium spp*.

**Figura 32.** Matraces de fermentación en medio Avena-Lisina [M3].



Cultivo sumergido discontinuo (de izquierda a derecha) con *Fusarium spp*, *Ulocladium spp*, *Mucor spp*, *Acremonium spp* y *Penicillium spP*.

Los gráficos de la figura 33 muestran el comportamiento de los hongos endófitos en cada medio de acuerdo a pH, estos valores se encuentran entre 4 y 8 siendo este último el valor más básico encontrado en el medio Czapek's por la fermentación de *Fusarium spp.* Los valores en común que se tiene en todos los medios y por todos los hongos es que al cabo de los 28 días, los pH se encuentran entre 4 y 8, indicando que el medio torna más ácido conforme realiza la posible producción de *Swainsonina*. Cuando se midió el pH segundo a los 14 días, tuvo tendencia a elevarse hasta llegar a pH 8 en el medio Czapek (Figura 33).

Por lo tanto, se determina que la fermentación se realizó en medios neutros a ácidos de acuerdo al control de pH que se ha realizado.

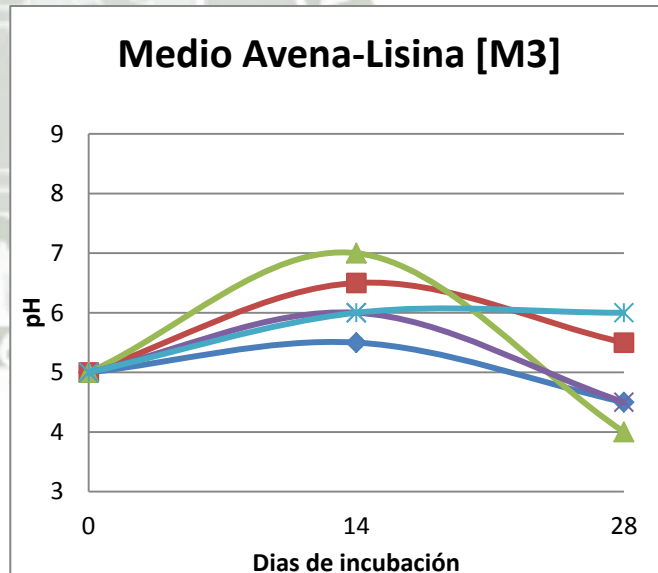
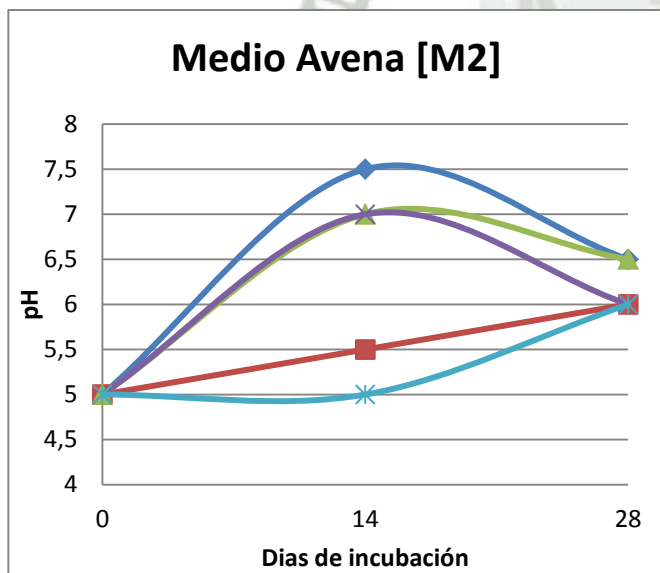
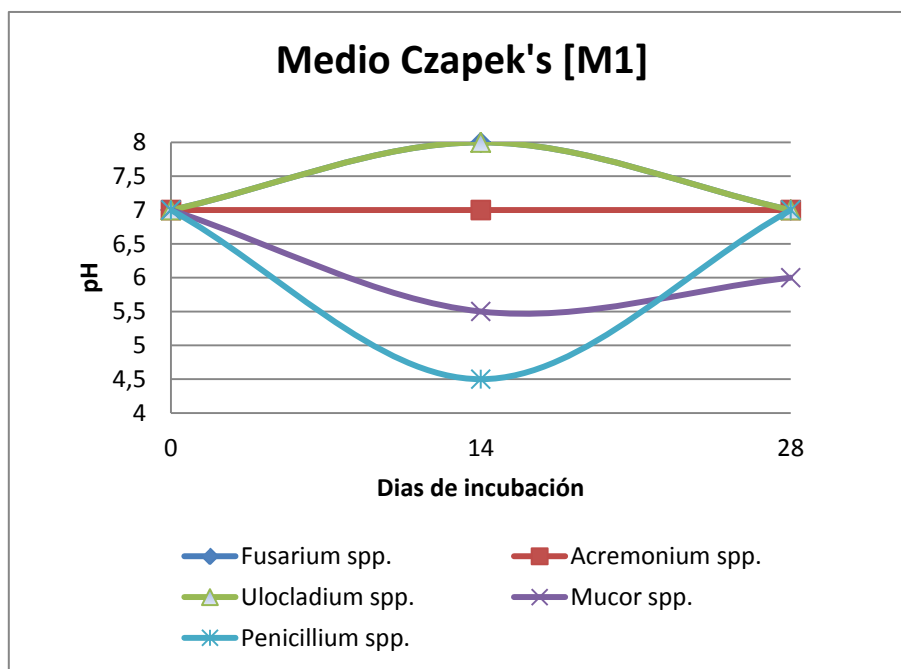
Según Tamerler (1998) en el estudio de la influencia del pH en un hongo endófito productor de *Swainsonina*, indica que no es necesaria la nivelación de pH durante el periodo de incubación. Indica que los valores de pH viran entre 6.5 y 3.8 con una producción de 43.4 µg/L de *Swainsonina*. Por lo tanto, durante el periodo de incubación no se modificaron los pH, sólo se hicieron tres controles de pH.

Los medios poseen diferentes fuentes carbonadas y en diferentes concentraciones; la composición del medio Czapek [M1] es un medio básico, y los otros dos medios resultan más complejos, ya que ambos poseen avena en la misma concentración que es considerada una fuente compleja ya que es una fuente carbonada como nitrogenada e inclusive sales.

En adición ambos poseen dos fuentes nitrogenadas por excelencia que es el extracto de levadura en el caso del medio Avena [M2] y la D-L lisina en el medio Avena-Lisina [M3]. En cuanto a la cantidad del aminoácido, según un estudio del 2004 en la Universidad Estatal de Dickinson reveló que 100 g de avena entera contienen alrededor de 400 mg de lisina; por lo tanto el medio Avena [M2] poseería 0.8 g/L de lisina y el medio Avena-Lisina [M3] esta cantidad adicional a la ya agregada.

Es importante determinar que la lisina es un compuesto que juega un rol importante en el medio ya que es el aminoácido precursor en la ruta metabólica de la producción de *Swainsonina* como un alcaloide de núcleo indolizidínicos.

**Figura 33.** Gráficos de control de pH de los fermentados días de incubación versus pH de cada hongo en cada uno de los medios



Los gráficos muestran los pH determinados en tres tiempos de fermentación, uno inicial, luego a la mitad de la fermentación y al final.

Los reactivos cumplen la función de estabilizar el pH actuando como buffers, el ácido bórico al estar en tan bajas concentraciones no cumple una función antibacteriana leve. En el caso de los compuestos nitrogenados también aportan una fuente de nitrógeno a la fermentación fúngica. Es de importancia el análisis de los componentes ya que para una optimización para la bioproducción de *Swainsonina* se debe variar todas las variables posibles, en este caso de concentración de las fuentes nitrogenadas, carbonadas, las sales y los compuestos que trabajan como buffers de la reacción fermentativa. Así como los niveles de pH, es posible que en medios más ácidos se produzcan mayores concentraciones de *Swainsonina* o con otras fuentes de Lisina, como fue el caso de la avena. También se varía la temperatura, es probable que a mayores o menores temperaturas la producción cambie.

#### **4.3.2. Extracción de *Swainsonina* a partir de la Fermentación de Hongos Endófitos**

Una vez cumplidos los 25 días de incubación y monitoreo de los medios en batch, se realizó la extracción del alcaloide a partir de la fermentación microbiana llevada a cabo. Una vez realizado el proceso de extracción para los 15 fermentados, se obtuvieron los extractos alcaloideos de cada uno:

A diferencia del extracto alcaloide vegetal, no posee un color amarillo, sino traslúcido que al concentrarlo se torna un color melón en el caso del extracto obtenido del medio Avena. [M2]Se concentraron los extractos de cloroformo por volatilización, para tener la muestra más concentrada de 3 mL. Los extractos alcaloideos en cloroformo fueron almacenados a bajas temperaturas en la congeladora en un frasco acaramelado para posteriores ensayos y de esta manera evitar su inactividad o deterioro a causa de la temperatura.

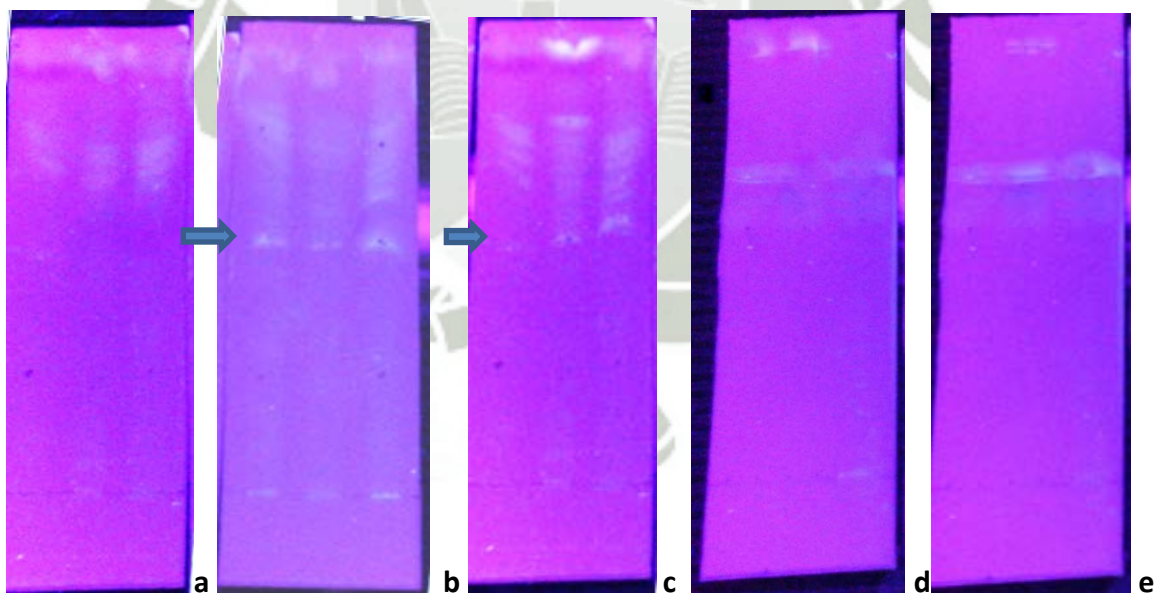
#### **4.3.3. Evaluación de Bioproducción de *Swainsonina* por Método Fermentativo mediante TLC**

Después del tiempo de fermentación de 25 días de los cinco hongos identificados en los medios [M1], [M2] y [M3] y realizada la extracción de cada fermentado, se obtuvieron 15 extractos alcaloideos el cloroformo con el mismo volumen en cloroformo (3 mL).

Para poder determinar si los hongos endófitos aislados son capaces de producir *Swainsonina*, se realizó cromatografía en capa fina, utilizando la misma fase móvil y revelada que dio buenos resultados en el método de identificación de *Swainsonina* de fuente vegetal.

Las placas cromatográficas fueron observadas a la cámara UV antes de ser revelados con reactivo de Ehrlich. Se obtuvieron cinco placas cromatográficas en total, ya que encada una se colocaron 3 muestras. En la figura 34 se muestran las fotografías de los cinco placas cromatográficas con las 15 muestras, se puede observar las líneas en rosa fosforescente, siendo las placas cromatográficas b y c los que poseen mayores compuestos y con el compuesto en el Rf de *Swainsonina* igual a 0.55. La vista a la luz UV ayuda a determinar cuántos compuestos se pueden observar, así como la verificación de que había en el Rf = 0.55 compuesto en ciertas placas cromatográficas.

**Figura 34.** Placas cromatográficas los extractos alcaloideos obtenidos de la fermentación, vista a luz UV antes de ser reveladas

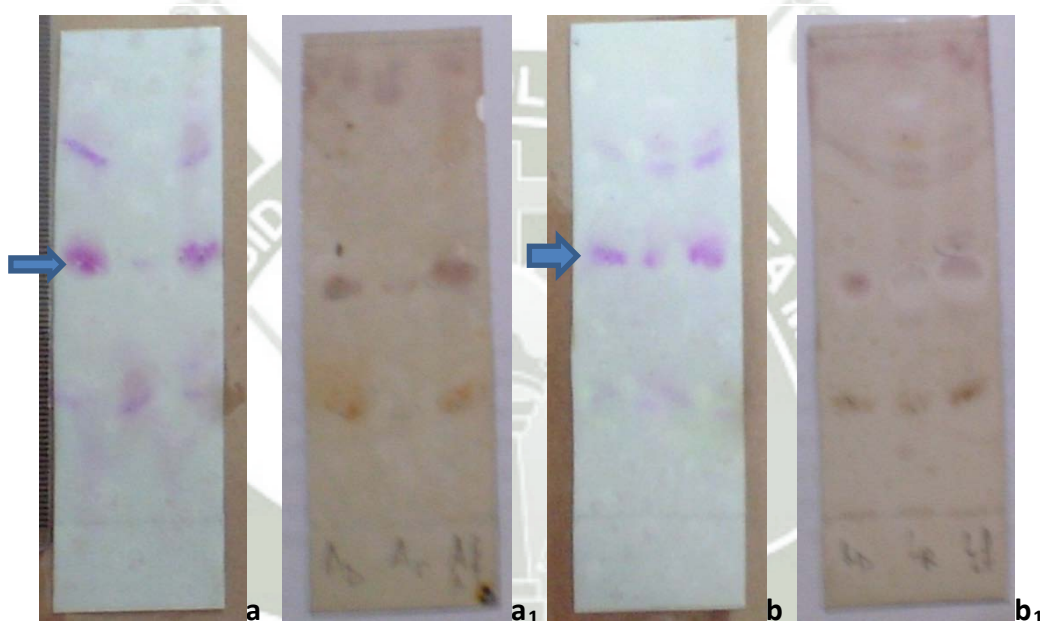


Cada placa contiene tres muestras en orden de izquierda a derecha de manera (hongo) [Medio]

- (a) (*Ulocladium spp.*)[M1], (*Mucor spp.*)[M1], (*Fusarium spp.*)[M1]
- (b) (*Ulocladium spp.*)[M2], (*Mucor spp.*)[M2], (*Fusarium spp.*)[M2]
- (c) (*Ulocladium spp.*)[M3], (*Mucor spp.*)[M3], (*Fusarium spp.*)[M3]
- (d) (*Penicillium spp.*)[M1], (*Penicillium spp.*)[M2], (*Penicillium spp.*)[M3]
- (e) (*Acremonium spp.*)[M1], (*Acremonium spp.*)[M2], (*Acremonium spp.*)[M3]

El revelado con el reactivo de Ehrlich confirmó de manera definitiva la existencia de *Swainsonina* en el extracto alcaloideo de los fermentados (Figura 35) con un tono violeta intenso a la altura del  $R_f=0.55$ . Además, que ciertos de los hongos aislados son capaces de producir *Swainsonina* en el medio de fermentación durante 25 días a temperaturas 19°C y 22°C.

**Figura 35.** Cromatogramas de las 6 muestras que poseen *Swainsonina* con  $R_f$  0.55 después de haber sido reveladas con reactivo de Erlich



Cada placa contiene tres muestras en orden de izquierda a derecha de manera (hongo) [Medio] (a) (*Ulocladium spp.*)[M2], (*Mucor spp.*)[M2], (*Fusarium spp.*)[M2] y  $a_1$  es la misma placa pero después de haber sido sometida a calor (b) (*Ulocladium spp.*)[M3], (*Mucor spp.*)[M3], (*Fusarium spp.*)[M3] y  $b_1$  es la misma placa después de haber sido sometida a calor

En el caso del cromatograma (a- $a_1$ ) las manchas se encuentran a una altura de 4.7 cm con un recorrido de la fase móvil de 8.5cm aplicando la Ec.1 se tiene un  $R_f= 0.55$  y el segundo cromatograma tiene la mancha a la altura de 44 cm y con una recorrido de la fase móvil de 8 cm, aplicando la Ec.1 se tiene un  $R_f$  de 0.55. Coincidiendo con la referencia bibliográfica.

Las placas cromatográficas restantes no se muestran ya que no poseen un Rf que indique la producción de *Swainsonina*, es probable que el medio Czapek también se pueda producir *Swainsonina*, sin embargo no en cantidades que el TLC pueda detectarlo, por lo tanto no posee niveles de producción significantes para este ensayo.

Se determinaron como hongos productores de *Swainsonina* a *Fusarium spp.* y a *Ulocladium spp.*, comprobando que existe antecedentes como productores de *Swainsonina* de este género fungico. Los medios en los que produce son el medio Avena y lisina, debido a la lisina y a la avena, siendo ambos ingredientes del medio importante precursores de la ruta metabólica para la formación de *Swainsonina*.

De manera cualitativa se puede observar que hay un color mas intenso en las muestras del extracto proveniente del medio Avena y del hongo *Fusarium spp.* mas que el *Ulocladium spp.*

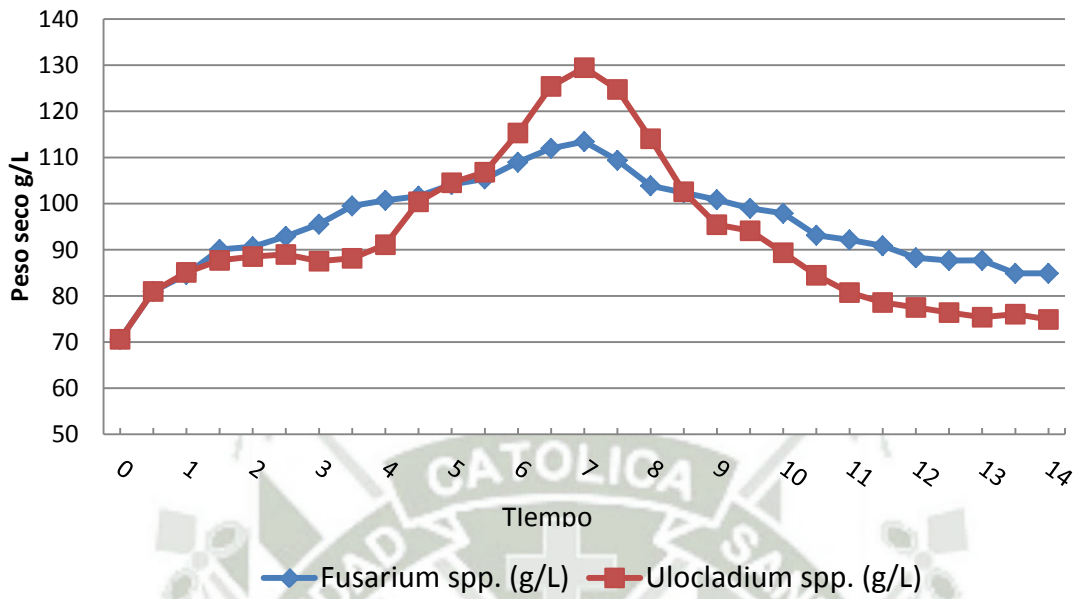
#### **4.3.4. Determinación de Cinética de Crecimiento de Hongo(s) en Medio(s) Seleccionados como Productores de *Swainsonina***

La curva de crecimiento se obtuvo al platear el tiempo de incubación versus el peso en seco de las células fúngicas para poder tener el gráfico del crecimiento de cada hongo en cada medio seleccionado, las figuras 36 y 37 muestran las curvas de crecimiento determinadas experimentalmente.

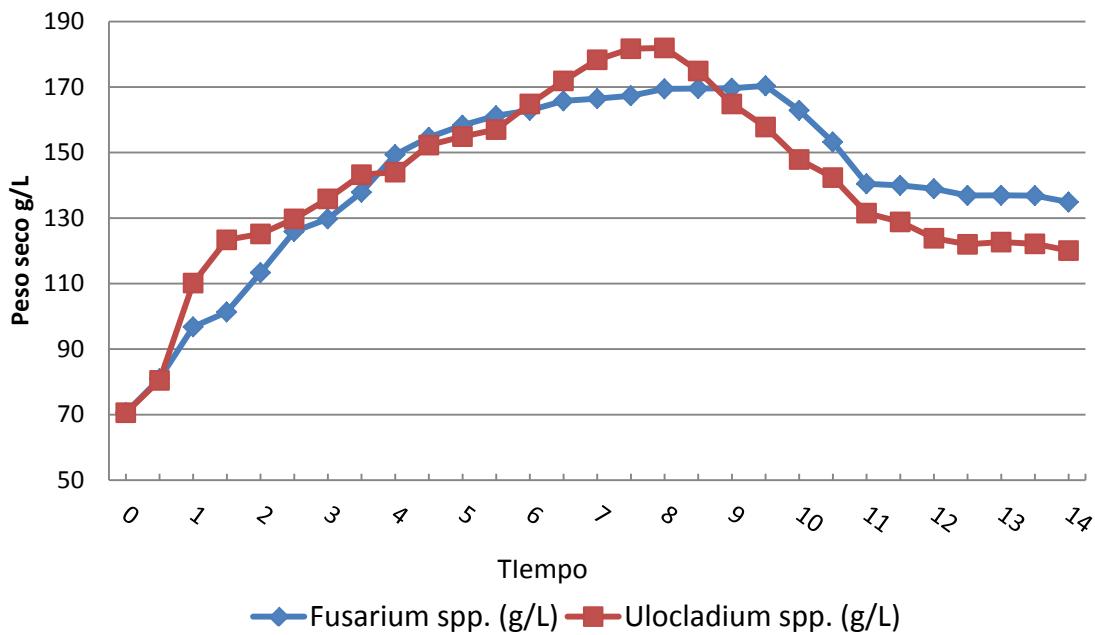
Los gráficos comprenden la cinética de crecimiento durante los primeros 14 días ya que es resto de días, los niveles de biomasa se mantienen constantes, al parecer estos son los días en los que la *Swainsonina* se produce, ya que tiene relación con la acidificación el pH del medio. El probable que durante este periodo de crecimiento, la biomasa no crezca, sino su producción de *Swainsonina* como metabolito secundario.

Las cantidades de biomasa inicial es de 70.6 g/L y las cantidades finales de biomasa de en (gramos de células por litro de medio); *Fusarium spp* en [M2]= 84.885 g/L, *Ulocladium spp.* en [M2] = 74.9, *Fusarium spp* en [M3] = 134.9 y *Ulocladium pp.* en [M3] = 120.1

**Figura 36.** Gráfico de curva de crecimiento de *Fusarium spp* y *Ulocladium spp* en medio Avena [M2] durante 25 días de incubación a Temperatura 19-22°C.



**Figura 37.** Gráfico de curva de crecimiento de *Fusarium spp* y *Ulocladium spp* en medio Avena [M2] durante 25 días de incubación a Temperatura 19-22°C.



En los cuatro tratamientos se percibe que el crecimiento exponencial se realizó entre los días 6 y 8, teniendo los mayores niveles de biomasa el [M3] en el caso de *Ulocladium spp.* que alcanza 185.915 g/L.

Para la determinación de velocidad de crecimiento (g células seca/hora) se aplicó la Ecuación 2  $X_f = X_o \times e^{\mu \cdot t}$ . Despejando  $\mu$  se determinó la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) *Fusarium spp.* y *Ulocladium spp.* en los medios [M2] y [M3]. (Tabla 18)

El mejor medio para el mayor desarrollo de biomasa fúngica endófito es en el medio Avena-Lisina [M3], dada la situación e producción de biomasa endófito, sería óptimo realizar el cultivo en el medio [M3]. Sin embargo, no se puede determinar si el crecimiento es un factor proporcional a la producción de *Swainsonina*.

**Tabla 21.** Valores de velocidad de crecimiento para *Fusarium spp.* y *Ulocladium spp.* en los medios [M2] y [M3]

Microorganismo	Medios	
	Avena [M2]	Lisina [M3]
<i>Fusarium spp.</i>	48.81 <sup>1</sup>	121.31
<i>Ulocladium spp.</i>	38.99	113.64

<sup>1</sup> Los valores se encuentran en g/hora, es decir gramos de células peso en seco por horas de incubación en el medio seleccionado.

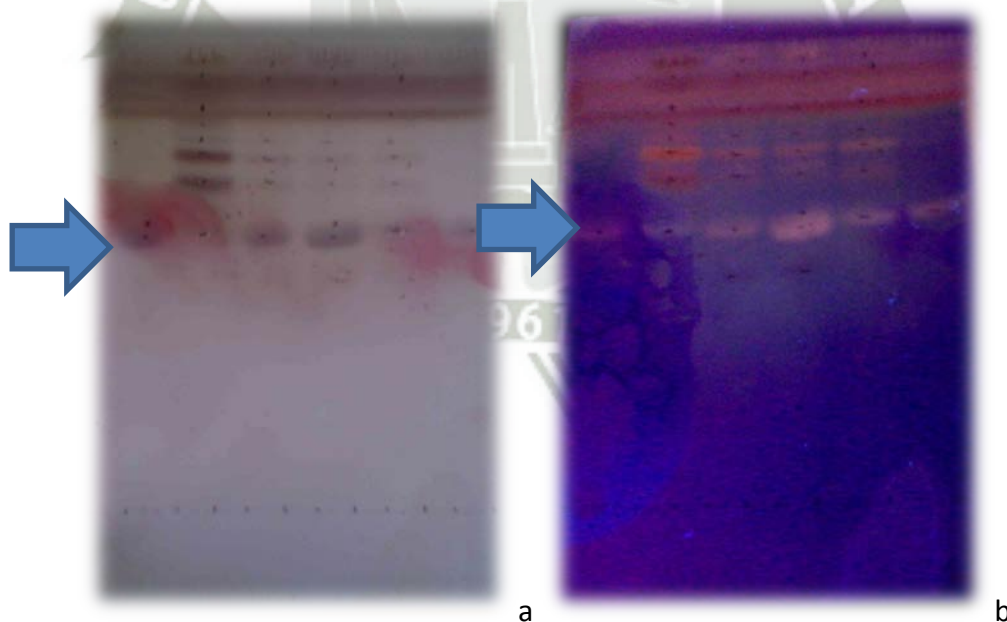
#### 4.4. Desarrollo de una Técnica por -HPLC para Evaluar las Concentraciones de *Swainsonina* en los Extractos Alcaloideos obtenidos a partir de *Astragalus arequipensis* y su(s) Hongo(s) Endófito(s).

##### 4.4.1. Evaluación Cualitativa de Extractos Alcaloideos Obtenidos a partir de *Astragalus arequipensis* y su Biomasa Fungal Endófito, Individualmente, por Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Una vez determinada la leguminosa nativa *Astragalus arequipensis* como fuente vegetal del alcaloide de gran importancia, *Swainsonina* y aislado, identificado y determinado a *Fusarium spp* y *Ulocladium spp* cepas nativas productoras de *Swainsonina* en los medios Avena [M2] y Lisina [M3]; se realizó una cromatografía cualitativa de comparación de concentraciones mediante la intensidad de color en el cromatograma de las cinco muestras de *Swainsonina* de ambas fuentes en comparación con el estándar a concentración de 6 µg/mL.

Se corrieron 6 muestras en la placa silica gel (Figura 38), siendo el primer carril el estándar de *Swainsonina*, el segundo carril la muestra vegetal de 20 g de hojas pulverizadas, el tercer carril es la muestra de *Fusarium spp.* en [M2], el cuarto carril es de *Fusarium spp.* en [M3], el quinto carril es de *Fusarium spp.* en [M2] y el último de *Ulocladium spp.* en [M2], *Mucor spp.* en [M2].

**Figura 38.** Fotografías de la placa cromatográfica para determinación de *Swainsonina* a partir de fuente vegetal Fungal, en comparación al estándar.



(a) Placa cromatográfica revelada con reactivo de Ehrlich (b) el mismo visto a la luz UV. Se observan las líneas de *Swainsonina* a la misma altura de 4.4cm de altura al mismo nivel que la línea del estándar de *Swainsonina*, con una distancia de recorrido de la fase móvil de 7.9cm.

Se observaron los resultados a la luz UV, una vez aplicado el reactivo de Ehrlich y de nuevo a la cámara UV, en este último procedimiento se observan claramente las líneas *Swainsonina* a  $R_f=0.559$ . Es probable que se haya movido ligeramente el  $R_f$  ya que el extracto se encontraba en metanol a diferencia de los TLC anteriormente realizados.

Ya que hasta este punto solo se encuentra determinada la concentración del estándar se determina que las muestras poseen mayores concentraciones de *Swainsonina* debido a la intensidad de color, también es posible que *Fusarium spp.* produzca más *Swainsonina* en [M2] medio Avena debido a que es cuarto carril y posee una línea más pronunciada. Se concluye que la fuente fungal posee mayores concentraciones de *Swainsonina* que la fuente vegetal de 20 g de hojas pulverizadas.

#### **4.4.2. Desarrollo de Técnica por HPLC-UV para Determinación Cuantitativa de *Swainsonina***

Con el objetivo de determinar las concentraciones de los extractos alcaloides y el rendimiento de las diferentes fuentes de producción de *Swainsonina*, se desarrolló un método en HPLC para su determinación.

Algunas de las pruebas necesarias para validar el método no se realizaron debido a la poca disponibilidad de estándar, siendo un producto de escasa adquisición. Las muestras fueron enraizadas a 5 mL en acetonitrilo y luego centrifugadas para desechar cualquier impureza para el ensayo. Por lo tanto se tiene 4 muestras de origen fungal y el mismo procedimiento con la muestra de origen vegetal una de 20 g de hojas pulverizadas y otra de 500 g de hojas pulverizadas en dos diluciones.

En este estudio, los gráficos de calibración fueron construidos empleando 5 diferentes concentraciones entre los 0.5  $\mu\text{g/mL}$  y 6  $\mu\text{g/mL}$ . Cada concentración fue por triplicado. El ensayo fue llevado de acuerdo a las condiciones experimentales previamente descritas. Después de plotear las concentraciones versus áreas, los datos mostraron la siguiente ecuación  $Y=A+BX$ , donde Y es el valor del área del pico, X es la concentración de la muestra ( $\mu\text{g/mL}$ ), A es el intercepto, y B en la pendiente. La ecuación de regresión fue  $Y= -257588.35+2576410X$  y el coeficiente r fue  $r=0.9987$ .

La precisión fue evaluada por inyección repetida de las muestras por triplicado. El valor de la desviación estándar (RSD) del área del pico y el tiempo de retención son aceptable, se muestra en la tabla 22.

La curva de calibración (Figura 39) y la ecuación lineal permitieron determinar las concentraciones de las muestras de cuerdo a los resultados de área integrada que brinda el equipo de HPLC.

La curva de calibración se hizo entre las concentraciones de 0.5 µg/mL y 6 µg/mL porque se realizaron una corridas no registradas para determinar entre que áreas variaban las muestras.

Además, la bibliografía registra que un método en HPLC-UV detecta mínimo 10 µg de *Swainsonina*/mL, siendo éste dato la prueba que el método desarrollado en el presente posee un mínimo detectable muchísimo menor.

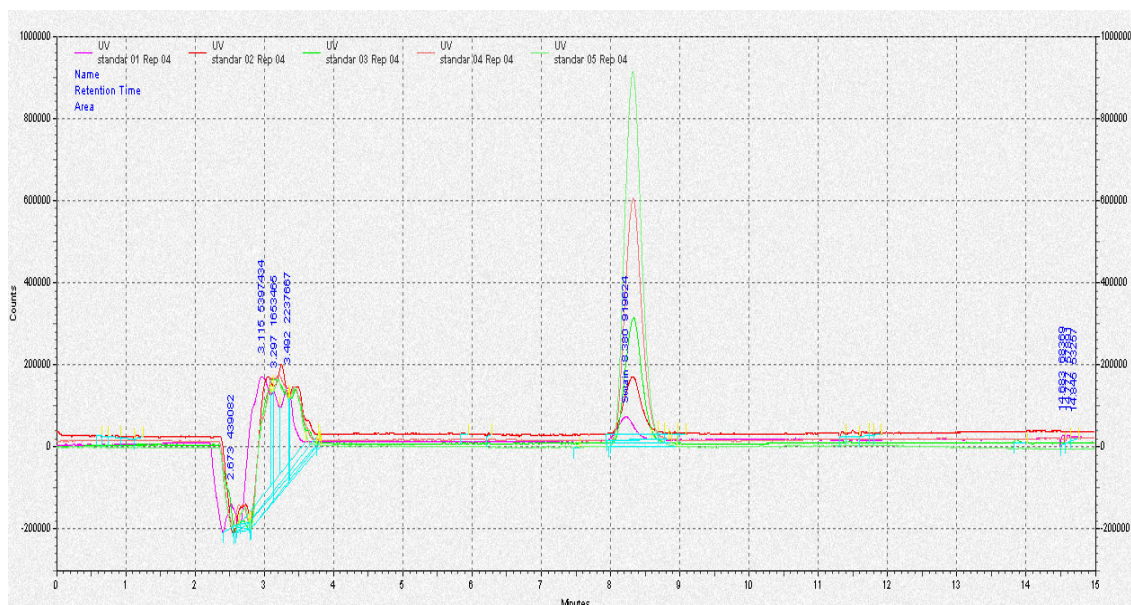
**Tabla 22.** Valores de RSD para los estándares de *Swainsonina*.

Estándar	Concentración (µg/mL)	Promedio Área	RSD(*) (%)
1	0.5	937687	2.86
2	1	2432684	0.87
3	2	5143099	1.37
4	4	9989884	0.58
5	6	15356907	6.44

\*RSD (desviación estándar/concentración media) x100.

Las muestras fueron corridas en triplicado, se determinó la repetitividad mediante la inyección de un mismo analista, el mismo día y el mismo instrumento y la reproducibilidad diferente día de inyección. Las desviaciones estándar relativa de las muestras es menor a 2.9 %. Tabla 23.

**Figura 39.** Cromatograma de la curva de calibración de *Swainsonina* en HPLC-UV



A partir de los resultados de concentraciones se determinaron las concentraciones de las muestras diluidas que fueron la fuente de 500g de hojas y de la *Swainsonina* obtenida a partir del fermentado del hongo *fusarium spp.* en medio Avena.

Y de la misma manera se determinó el rendimiento de la fuente vegetal en  $\mu\text{g}$  de *Swainsonina* por gramo de hojas de *Astragalus arequipensis* y la fuente Fungal en  $\mu\text{g}$  de *Swainsonina* por litro de medio y  $\mu\text{g}$  de *Swainsonina* por gramo de células fungales (peso seco). Tabla 20.

Por lo tanto, se ha desarrollado un método isocrático de HPLC con detección UV, para la cuantificación de *Swainsonina* a partir de *Astragalus arequipensis* y biomasa fungal endófito; la cual permite la introducción de las muestras resultado de una extracción ácido-base. Este método ha sido aplicado a la identificación y cuantificación de muestras con contenido de *Swainsonina* reales.

**Tabla 23.** Muestras de fuente vegetal y Fungal

Fuente	Muestra*	Área	Promedio T <sub>r</sub>	Promedio Área	RSD (%)
Vegetal	1*	0.821	8.090	1904758.33	1.498
	2*	2.649	8.096	6640826	2.243
	3*	5.147	8.160	13108320	0.894
Fungal	4*	2.855	8.172	7172927	2.604
	5*	1.984	8.299	4918630	2.419
	6*	1.200	8.230	2888102	0.205
	7*	2.259	8.173	5631205	0.871

**RSD** (desviación estándar/concentración media)x100, **Muestras:** **1\*:** 20g de hojas, **2\*:** 500g de hojas diluida (1:9), **3\*:** 500g de hojas diluida (2:8), **4\*:** 500mL de fermentado de *Fusarium spp* en medio Avena-Lisina, **5\*:** 500mL de fermentado de *Fusarium spp* en medio Avena, **6\*:** 500mL de fermentado de *Ulocladium spp* en medio Avena-Lisina, **7\*:** 500mL de fermentado de *Ulocladium spp* en medio Avena.

#### 4.4.3. Determinación de Concentraciones en cuanto a la Obtención de *Swainsonina* a partir del Órgano Vegetal de *Astragalus arequipensis* y su(s) Hongo(s) Endófito(s) Seleccionados

Se ha determinado las concentraciones (Tabla 24) de *Swainsonina* en cada fuente tanto de *Astragalus arequipensis* como de los hongos endófitos nativos aislados a partir de la misma planta, habiendo elegido por TLC a *Fusarium spp* y *Ulocladium spp*. como hongos endófitos capaces de producir *Swainsonina*, por esta razón solo se determinó por HPLC la producción de ambos en medio Avena [M2] y medio Avena-Lisina [M3].

El hongo endófito nativo *Fusarium spp.* de *Astragalus arequipensis* posee gran capacidad de producción de *Swainsonina* en medio Avena con el valor de 87.670  $\mu\text{g}$  de *Swainsonina* por gramo de microorganismos. Por lo tanto, se considera una producción de *Swainsonina* de origen microbiológico mediante fermentación en medio Avena como método con mayor rendimiento. Hao Lu (2012), registra que el hongo endófito genero *Fusarium* obtenido a partir de *Astragalus variabilis* tiene una capacidad de producción de 111 $\mu\text{g/g}$  en medio Czapek a 24°C por 14 días de incubación, en este caso la temperatura es mayor y el tiempo de incubación también es menor, sin embargo se eligió incubar 25 días debido al tiempo en que desarrollaron los hongos en medio sólido y a la comparación bibliográfica que registra desde 5 días hasta 45 días de incubación para la producción del alcaloide deseado, *Swainsonina*.

**Tabla 24.** Determinación de concentración de *Swainsonina* obtenida de cada una de las fuentes tanto vegetal como fúngica.

Fuente	Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\frac{\mu\text{g SW}}{\text{g H}}$	$\frac{\mu\text{g SW}}{\text{L}}$	$\frac{\mu\text{g}}{\text{g F}}$
Vegetal	1*	0.821	0.205 <sup>a</sup>	---	---
	2*	2.649	0.268 <sup>b</sup>	---	---
	3*	5.147	0.257 <sup>c</sup>	---	---
	<b>Promedio de producción</b>			0.243	
Fungal	4*	2.855	---	28.548	0.209
	5*	1.984	---	793.725	87.670
	6*	1.200	---	12.002	0.098
	7*	2.259	---	22.595	0.295

**Muestras:**1\*: 20 g de hojas, 2\*: 500g de hojas diluida 1:9, 3\*: 500 g de hojas diluida 2:8, 4\*: 500 mL de fermentado de *Fusarium spp.* en medio Avena-Lisina, 5\*: 500 mL de fermentado de *Fusarium spp.* en medio Avena, 6\*: 500 mL de fermentado de *Ulocladium spp* en medio Avena-Lisina, 7\*: 500 mL de fermentado de *Ulocladium spp* en medio Avena. **SW**= *Swainsonina*, **H**= hojas pulverizadas, **L**= Litro de medio de cultivo, **F**=de células fúngicas (peso seco)

La comparación entre la fuente vegetal y fungal es clara, definitivamente la Fungal es la ideal. Teniendo en segundo puesto de productor al otro hongo *Ulocladium spp* en medio Avena. En conclusión ambos son buenos productores y el medio ideal de producción del alcaloide es el medio Avena.

El método fermentativo en comparación a método de extractivo a partir de la fuente vegetal posee mayor capacidad de producción de *Swainsonina* debido a que claramente se comprueba que los hongos endófitos de la planta son los responsables de las concentraciones de este alcaloide en ella debido a las condiciones en las que se fermento. El hongo endófito *Fusarium spp.* en medio Avena a temperatura 19-22°C durante 25 días es el mejor productor de *Swainsonina* con una bio-producción de 793.725 ug/L (87.67 µg/g) en comparación al método extractivo de fuente vegetal con una producción de *Swainsonina* de 0.243 µg/g. Por lo tanto el método fermentativo es el de mayor rendimiento para la obtención de *Swainsonina*.

La tabla 25 indica que los niveles de *Swainsonina* producidos por *Astragalus Arequipensis* se encuentran muy por debajo de las especies estudiadas, y con referencia a las concentraciones de *Swainsonina* producidos por los hongos endófitos, la cepa aislada de *Fusarium spp.* en el presente trabajo es capaz de producir mayores cantidades del alcaloide que las cepas del cuadro.

**Tabla 25.** Concentraciones de *Swainsonina* en el género *Astragalus* y sus hongos endófitos de investigaciones realizadas

Organismo	Concentración	Autor (año)
<i>Fusarium de Astragalus variabilis</i>	111 µg/g en medio Czapek	Hao Lu 2012
<i>Oxitropus Glabra</i>	48.50 µg/g de planta	Hao Lu 2012
<i>Schizophyllum spp.</i>	773 µg/g en medio Czapek	Hao Lu 2012
<i>Astragalus lentiginosus</i>	1.25 mg /g peso húmedo	Pfister 2003
<i>Oxytropus. kansuensis</i>	148 mg/g	Li 2012
<i>Astragalus hamiensis</i>	44 mg/g	Li 2012
<i>Astragalus hamiensis(flores)</i>	162 mg/g	Li 2012

## CONCLUSIONES

- **PRIMERO.** El extracto alcaloideo obtenido mediante la extracción sólido-líquido de las hojas pulverizadas de *Astragalus arequipensis* que fue recolectada del poblado de Huambo, en Cotahuasi, capital de la provincia de La Unión en el Departamento de Arequipa-Perú, entre los 3800 y 4000 msnm, a una temperatura de 13°C, posee mayor concentración de *Swainsonina* determinado de manera cualitativa por poseer un  $R_f = 0.55$  con mayor intensidad de color en la placa cromatográfica de TLC en comparación al extracto de los tallos y no encontrándose algún rastro detectable mediante este método del extracto de las raíces
- **SEGUNDO.** Los cinco hongos endófitos obtenidos a partir de *Astragalus arequipensis* y su rizósfera fueron *Fusarium spp*, *Ulocladium spp*, *Mucor spp*, *Penicillium spp*. y *Acremonium spp*.
- **TERCERO.** Los hongos *Fusarium spp* y *Ulocladium spp* son capaces de producir *Swainsonina* en medio Avena [M2] y medio Avena-Lisina [M3] por fermentación el cultivo sumergido discontinuo, ya que la intensidad del color en la placa cromatográfica de TLC es mayor que el resto de los fermentados a un  $R_f = 0.55$
- **CUARTO.** Se desarrolló una técnica de HPLC que de acuerdo a su linealidad y sensibilidad es capaz de identificar *Swainsonina* por lo que se determinaron las cantidades de producción de *Swainsonina* por *Fusarium spp* en medio Avena [M2] es el mayor productor con un valor de 793.7  $\mu\text{g SW/L}$  de medio y 87.67  $\mu\text{g SW/g}$  de células en peso seco, el mismo hongo en medio Avena-Lisina [M3] produce 28.5  $\mu\text{g SW/L}$  y 0.209  $\mu\text{g SW/g}$ , *Ulocladium spp*. en medio Avena [M2] produce 22.60  $\mu\text{g SW/L}$  y 0.295  $\mu\text{g SW/g}$  y en medio Avena-Lisina [M3] se 12.0  $\mu\text{g SW/L}$  y 0.098  $\mu\text{g SW/g}$ . Finalmente, a partir de las hojas de *Astragalus arequipensis* se obtuvo la menor concentración de 0.243  $\mu\text{g SW/g}$  de hojas secas.

## RECOMENDACIONES

Al finalizar este trabajo experimental y bajo las condiciones que se desarrollaron todos los métodos, se recomienda:

- Determinar la cantidad de alcaloide que poseen las flores en la etapa de florecimiento de la leguminosa *Astragalus arequipensis* e incluirla a la comparación de concentración entre los diferentes órganos de la planta.
- Estudiar el contenido de otros compuestos que posee *Astragalus arequipensis*.
- Optimizar la producción de *Swainsonina* a partir del hongo endófito obtenido *Fusarium spp.* en cuanto a las condiciones de temperatura, pH y tiempo de incubación y posible diseño de un biorreactor para la bioproducción de *Swainsonina*.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Amici AM, Minghetti A, Scotti T, Spalla C and Tognoli L (1969). *Production of Peptide Ergot Alkaloids in Submerged Culture by Three Isolates of Claviceps purpurea*. Applied Microbiol., 18(3): 464-468.
2. Amici AM, Minghetti A, Scotti T, Spalla C and Tognoli L (1967). *Ergotamine production in submerged culture and physiology of Claviceps purpurea*. Appl. Microbiol., 15: 597-602
3. Arango C. J.(2008) *Alcaloides y compuestos Nitrogenados*. Universidad de Antioquilla. Medellín (19-78)
4. Amstrong J., Hollyman K, (2011). *General, Organic and Biochemistry: An Applied Approach*. Ed. Cengage Learning. pp. 450-570
5. Atkins P. (2007) *Las moléculas*. Springer. USA
6. Baerheim-Svendsen A., Verpoorte R. (1983) *Chromatography of Alkaloids: Thin-Layer Chromatography*. Ed Elsevier. Pp 9-11
7. Braun, K., J. Romero, Liddell D., Creamer R.. (2003). *Production of Swainsonine by Fungal Endophytes of Locoweed*. Mycology Research 107:980-988.
8. Bruneto J. (1991) *Alcaloides: Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Traducido por Ángel Villar del Fresno. Zaragoza: Acribia. Pp 55-366
9. Cassiano N. M. (2010) *Alkaloids: Properties, Applications and Pharmacological Effects*. 3<sup>rd</sup> Ed. Biochemistry Research Trends
10. Christensen M.J., Leuchtman A., Rowan D.D., Tapper B.A., 1993. *Taxonomy of Acremonium Endophytes of Tall Fescue (Festuca Arundinacea), Meadow Fescue (F. Pratensis) and Perennial Ryegrass (Lolium Perenne)*. Mycol. Res. 97, 1083-1092.
11. Clay K., (1986). *Grass Endophytes: Microbiology of the Phyllosphere*. Fokkema, N.J., Van Den Heuvel, J. Ed. Cambridge University Press, London, Pp. 188-204.
12. Clay K., (1987). *Effects of Fungal Endophytes on the Seed and Seedling Biology of Lolium Perenne and Festuca Arundinacea*. Oecología. 73, 358-362.
13. Comunicación personal vía electrónica con Montero F.(envío de tesis electrónica)

14. Cuvi N. (2011). *Ciencia e imperialismo en América Latina: la Misión de Cinchona y las estaciones agrícolas cooperativas*. Saarbrucken: Editorial Académica Española,
15. Daviña J.R.; Gomez-Sosa E. (1993). *Cariotipo de siete especies del Género Astragalus(Leguminosae) de la Argentina*. Instituto de Botánica Darwinion (CONICET,ANCEF),Buenos Aires-Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina Botánica 29:197-201.
16. Dawn D. (1984) *Isolation and Characterization of Swainsonine from Texas Locoweed (Astragalus Emoryanus)*. University of Texas Health Science Center, Texas.USA.
17. Demain AL (1999) *Metabolites, primary and secondary*. In: Flickinger MC, Drew SC (eds) *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Wiley, New York, pp 1713–1732
18. Djilani A.; Legseir B., Soulimani R., Dicko A., Younos C. (2006) *New Extraction Technique for Alkaloids*. Annaba University,Algeria & Univerdité de Metz, France. J. Braz. Chem. Soc. 17(3) (<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000300013>)(4/10/2012)
19. Duoc N.(2012) *General Methods of Extraction and Isolation of Alkaloids*. Pharmacognosy. <http://www.epharmacognosy.com/> (consultado 9/10/2012)
20. Ebere O.D.; Chintua I.E.(2009) *Isolation, characterization and antibacterial activity of alkaloid from Datura metel Linn leaves*.Michael Okpera University of Agriculture. Abia State, Nigeria. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 3(5): 277-281
21. Egon Stahl (Editor), M.R.F. Ashworth (Translator) Springer, 1969.
22. Espinoza, J.; San Martín F.; Holgado D.; Suarez F. (1991). *Intoxicación por plantas venenosas que afectan a la ganadería peruana. Investigaciones sobre pastos y forrajes* de Texas Tech University. Perú. Vol V:83-96
23. Zhao B.Y., Tong D.W. (2003). *Extraction and fractionation and identification of swainsonine on structure from Oxytropis glabra*. Chinese Agricultural Science Bulletin 19:1-4.

24. Gomez E. (2004). *Species of the South American Astragalus garbancillo (leguminosae-papilionoideae) complex*. Instituto de Botánica Darwinion. Argentina.
25. Gomez E. (2010). *Nueva especie del Género Astragalus (Leguminosae, Galegeae) para Perú*. Instituto de Botánica Darwinion. Argentina
26. Gomez-Sosa E. (1979). *Las Especies Sudamericanas del Género Astragalus L. Las especies patagónicas Argentinas*. Instituto de Botánica Darwinson (CONICET, ANCEF), Buenos Aires-Argentina. Darwiniana 22:313-376
27. Gomez-Sosa E. (1986). *Astragalus Neobarnebyyanus (leguminosae): a new species from Peru*. Instituto de Botánica Darwinson, Buenos Aires-Argentina. Brottonia 38:427-429
28. Gomez-Sosa E. (2003). *El Género Astragalus (Leguminosae) en la República Oriental del Uruguay*. Buenos Aires-Argentina. Hickenia 3:161-162
29. Gomez-Sosa, E. (2001). *Astragalus garbancillo Cav. Conservation as proposed is recommended*. Taxon 50: 563.
30. Gomez-Sosa, E. (2004). *Species of the South American Astragalus garbancillo (Leguminosae-Papilionoideae) complex*. Arnaldoa 11(2):43-66.
31. Gomez-Sosa, E. (2005). *Taxonomic Novelties in Astragalus (Leguminosae) for South America*. Novon 15: 542-547.
32. Gomez-Sosa, E. (2010). *Astragalus minimus (Leguminosae, Galegeae) complex and a new species from Argentina and Chile*. Novon 20:157-162.
33. Gonzales F. M.; Arriagada E.M.(2008). *Manual de Biología Celular para la Carrera de Enfermería*. Texto de apoyo de docencia. Universidad Concepción. Chile. pag 59-107
34. Goss P.E.(1995). *Inhibitors of carbohydrate processing: A new Class of Anti-cancer Agents*. Clinical Cancer Reasear. USA
35. Goss P.E.; Baptiste J.; Fernandes B.; Baker M.; Dennis J.W.(1994). *A Phase I Study of Swainsonine in Patients with Advanced Malignancies*. Toronto, Ontario. Cancer Research 54: 1450-1457
36. Hao Lu(2012) *Isolation and Identification of Swainsonine- Producing Fungi Found in locoweeds and their rhizosphere soil*. A&F University. China.

37. Harrington P.J. (1999). *Pharmaceutical Process Chemistry for Synthesis: Rethinking the Routes to Scale-up*. Ed John Wiley & Sons pp70-100
38. Hattenschwiler S., Vitousek P. (2000). *The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling*. *Trend in Ecology and Evolution* 15, 238-243
39. Herbert D.N.; Garman S.C.; Molinari M. (2005). *Trends in Cell Biology*. 15(7):364-370
40. Huo, X.H., Zhao B.Y., Wang J.J. (2008) *Preliminary chemical test of Oxytropis falcata Bunge and alkaloids analysis by TLC*. *Acta Agriculture Boreali-Occidentalis Sinica* 17:24-28.
41. Inghan J., Duwn I.J., Heinzle E., Pfenosil J. E., Snape J. B. (2007). *Chemical Engineering Dynamics*. Third Edition. Wiley-VCH Verlag Gmbh Co KCA 123-300
42. James L. F.; Panter K. E; Stegelmeier B.L.; Molyneux R.J. (1994). *Effect Of Natural Toxins On Reproduction*. 10 (3): 587-603.
43. James L.F, A. Elbein, R.J. Molyneux, and C.D. Warren, eds., *Swainsonine and Related Glycosidate Inhibitors*, pp. 100-117. Iowa State University Press, Ames, IA.
44. Kelemu, S., J. White Jr., F. Muñoz y Y. Takayama. 2001. *An endophyte of the tropical forage grass Brachiaria brizantha: isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties*. *Canadian Journal Microbiology*. 47:55-62.
45. Kelleher WJ, Kim BK and Schwarting AE (1969). *Production of lysergic acid derivatives in submerged culture. V. Effect of surfactants on alkaloid accumulation*. *Lloydia*. 32(3): 327-333.
46. Knight A.P.; Walter R.G. (2003). *Plant Affecting the Nervous System. A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America*. ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) consultado 24/09/2012
47. Krebs EG, Beavo JA (1979) *Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes*. *Ann Rev Biochem* 48:923–959
48. Kruiswijk E. (2005). *Thin Chromatography, Visualisation Reagents*. pp 10-21
49. Latch G.C.M. (1993) *Physiological Interactions of Endophytic Fungi and Their Hosts. Biotic Stress Tolerance of Endophyte-Infected Grasses*. *Agric. Ecosystems Environ*. 44, 143-156.

50. Lihong H., Yang L., Xiong A., Zhao S.; Wang Z., Hu Z. (2011). *Simultaneous Quantification of four Indole Alkaloids in Catharanthus roseus cell Line C20hi by ULPC-MS*. China. Japan Society for Analytical Chemistry. Analytical Sciences 27:433-439
51. Lila Mary Ann (2006). *The nature-versus-nurture debate on bioactive phytochemicals: the genome versus terroir*. J. Sci. Food Agric. 86: 2510–2515.
52. Liu B.(1998) *Inhibition effect of Swainsonine on the growth and metastasis of gastric cancer in vivo*. Shanghai Secon Medical University. China.
53. Liu, L., Feng Y., Jia Z.H., Zhao B.Y. (2010). *Research progress on development and utilization of locoweed in China*. Acta Ecology and Animal Domestication 31:102- 105
54. Liu, Z.Y., Wang Z.X., Zhao B.Y. (2009) *The study on dynamic variation law of swainsonine from major locoweeds in China*. Proceedings of the Chinese Association of Veterinary Internal Medicine (CAVIM), pp. 556-564. Qingdao, China.
55. Lo Re D. (2008). *Síntesis de Alcaloides Glicomométricos, Enantioméricamente Puros, a partir de Carbohidratos*. Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica. Universidad de Granada.Tesis Doctoral.
56. Lu CH, Shen YM (2004). *Harnessing the potential of chemical defenses from antimicrobial activities*. BioEssays. 26: 808–813.
57. Lu, P., Child D., Zhao M.L. (2009). *Culture and identification of endophytic fungi from Oxytropis grabra DC*. Acta Ecology Sinica 29:53-58
58. Manacorna A.M.; Cuadros D.(2005).*Microbiología Ambiental: Interacciones Microbianas*. Escuela de Educación Ambiental. Universidad de Comahue. Vol(1)
59. Mansi-El E-M-T, Bryce C.F.A, Demain A.L., Allman A.R. (2006) *Fermentation Microbiology and Biotechnology.k second edition*. Taylor & Francis. Review.
60. Michael. J.P. (2007). *Indolizidine and quinolizidine alkaloids*. Natural products Reports. Nature. Prod. Rep. 2007,24,191-222
61. Molyneux R.J.; James L.F. (1982) *Loco Intoxication: Indolizidine Alkaloids of Spotted Locoweed (Astragalus Lentiginosus)*. Science 216: 190-191
62. Molyneux, R.J., L.F. James, K.E. Panter, and M.H. Ralphs. 1989. *The occurrence and detection of swainsonine in locoweeds*. .

63. Molyneux R.J., Gardner D.R., Lynn F. J. Colegate S.M.(2002) *Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis*. J. Chromatogr. A 967 (2002) 57–74
64. Montero, F. G. 2006. *Efecto del Astragalus dillinghamii (J.F. Macbride, 1930) sobre ratones de laboratorio en crecimiento*. Tesis para optar el título de Bióloga. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias. Lima. Perú.
65. Orozco, Marta (2000) *Operaciones Unitarias*. Ed.Limusa. Grupo Noriega Editores. Mexico. Pag 150
66. Orozco, Marta (2000) *Operaciones Unitarias*. Ed.Limusa. Grupo Noriega Editores. Mexico. pp 150-154
67. Partida M. L., Heil M. (2011) *The microbe-free plant: fact or artifact?* Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Irapuato, México Front. Plant Sci
68. Podlech D.(1983). Zur Taxonomie und Nomenklatur der Tragacanthoiden *Astragali* Mitt.Bot. StaatssammL. München 19:12.[=*Astracantha gummifera* (Labill.) Podlech].
69. Pryor B.M., Creamer R., Shoemaker R.A, McLain-Romero J., y Hambleton S. (2009) *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. Published by NRC Research Press. Botany 87: 178–194 (2009)
70. Pryor, B.M., R. Creamer, and R.A. Shoemaker. 2009. *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. Botany 87:178-194.
71. Punt PJ, van Viesen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C (2002) *Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production*. Trends Biotechnol 20:200– 206
72. Ralphs B.; James. (1999). *Locoweed Grazing*. Journal Natural Toxins 8(1):47-51
73. Ralphs, M.H., Creamer R., Baucom D., (2008). *Relationship between the endophyte Embellisia spp. And the toxic alkaloid swainsonine in major locoweed species (Astragalus and Oxytropis)*. Journal of Chemical Ecology 34:32-38.
74. Riahi S.(2010). *Electronic and Geometry Studies on Swainsonine, DNA base Pairs and its Complex*. University of Tehran. Iran

75. Rispali N., Nash R.; Webb K.J.; Márquez A.J. (Editorial Directors)(2005). *Secondary Metabolite Profiling*. Lotus Japonicus Handbook.pp 341-348.
76. Schneider M.J., Ungemach F.S., Broquewst H.P., Harris T.M. (1982). *Biosynthesis of Swainsonina in Rhizoclonia leguminicola. Epirization in ring fusion*. Journal Chem. Soc. 104: 6863-6864
77. Sharp D. H., 'Bioprotein Manufacture-A Critical Assessment', Ellis Horwood, Chichester, 1989, Chapter 4, p. 53.
78. Skoog D.A., Crouch S.R., Holler J.F. (2008) *Principios de Análisis Instrumental*. Ed Cengage Learning. pp 848-960
79. Stanbury P. F., A. Whitaker, S. J. Hall, 'Principles of Fermentation Technology', 2nd Edn, Pergamon Press, Oxford, 1995.
80. Stanbury P.f. (2000). *Fermentation Technology*. Chapter 1. New York. Pp 1-24
81. Tate, R. L. (1995). *Soil Microbiology*. Wiley, J. & Sons, New York.
82. *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*
83. University of Wisconsin (2012). *Hand-book of Thin Layer Chromatography*. USA. pp 01-06
84. Verma A. (2007) *A simplified Procedure for Indole Alkaloid Extraction from Catharanthus roseus Combined with a Semi-synthetic Production Process for Vinblastine*. University of Helsinki. Finlandia.
85. Wall E.P.( 2005) *Thin-Layer Chromatography: A modern Practical Approach*. Ed Royal Society of Chemistry pp. 120-121
86. Waller F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hückelhoven,C. Neumann, D. Wettstein, P. Franken y K. Kogel. (2005). *The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease esistance, and higher yield*. PNAS 102 (38): 13386-13391.
87. Wang Y.; Hu Y, Wang J.; Liu Z.; Yang G.; Geng G. (2010). *Ultrasound-assisted Solvent Extraction of Swainsonine from Oxystropis ochrocephala Bunge*. NorthWest Agriculture and Forestry University. Shaanxi-China. Journal of Medical Plants Research 5(6):890-894
88. Watanabe. (1997) *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Third Edition*

89. Watson, L.; Dallwitz, M. J.. «*Leguminosae*». (2007) *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*.
90. Yu, Y.T. 2009. *Isolation, identification and genetic polymorphism of swainsonine-producing fungal endophytes from locoweeds in China*. Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi, China. Ph.D. thesis.
91. Yu, Y.T., Q.M. Zhao, J.N. Wang, et al. 2011. *Swainsonine-producing fungal endophytes from major locoweed species in China*. *Toxicon* 56:330-338
92. Zhao M.L.; Gao X.; Han B. (2011). *Locoweed Poisoning in the Native Grasslands of China*. *IJPPR*, Vol 1:41-46
93. Zhao Meng-Li, Gao Xinlei, Han Bing. (1999). *Locoweed poisoning in the native grasslands of China*
94. Zhao, B.Y., D.W. Tong, P.B. Ge, et al. (2003). *Locoweed harm investigation in the west grassland of China*. *Chinese Journal of Grassland* 25:65-68.
95. Zhao, B.Y., G.R. Cao, and S.J. Li. (1993). *The separation and analysis of toxic components from Astragalus strictus*. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology* 23:20-21.
96. Zhao, X.H. (2008). *Isolation and identification of swainsonine degrading bacteria and degradation character*. Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi, China. Ph.D. thesis.
97. Zhaocai Li.(2012) *Swainsonine activates mitochondria-mediated apoptotic pathway in human Lun Cancer A549 Cells an Retards the Groth of Lung Cancer Xenografts*. Northeast A&F University. China.

#### **Web-sites.**

1. <file:///D:/Datos%20Epidemiol%C3%B3gicos-Per%C3%BA-INEN.htm> 23/08/2012
2. [www.lubilosa.org/Engl03a.PDF](http://www.lubilosa.org/Engl03a.PDF). Laboratory Techniques. 24/08/2012
3. <http://www.ugr.es/~quioired/pnatu/secundario.htm> QUIORED Tipos de metabolitos secundarios 11/10/2012
4. [www.tumores.com/tumor-reasearch/8156.htm](http://www.tumores.com/tumor-reasearch/8156.htm). 24/08/2012
5. <http://www.inia.cl/link.cgi/suelo/muestras/7689> 30/08/2012
6. <http://www.ugr.es/~quioired/pnatu/secundario.htm> QUIORED Tipos de metabolitos secundarios 11/10/2012

# ANEXOS

## Anexo 1

Carta de identificación de la leguminosa obtenida como *Astragalus arequipensis* del laboratorio de Herbología de la Universidad Nacional de San Agustín

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**LABORATORIO DE TAXONOMÍA VEGETAL**

Arequipa 25 de Setiembre de 2012

Srta. Marcia Alejandra Leyva Salas:

Presente.-

Previo saludo. De acuerdo a lo solicitado el día 7 de setiembre del presente año sobre la identificación taxonómica de su muestra vegetal, a continuación se detalla.

Planta herbácea de la familia de las Papilionáceas, con tallo de cuarenta o cincuenta centímetros de altura en promedio, duro y ramoso; hojas compuestas de hojuelas elípticas y aserradas por el margen; flores blancas, axilares y pedunculadas y fruto en vaina inflada, pilosa, con una o dos semillas amarillentas, de un centímetro aproximadamente de diámetro, gibosa, y con un ápice encorvado.

Familia: Fabaceae  
Nombre Científico: *Astragalus arequipensis*  
Nombre común: Garbancillo, machamacha, kontekonte, algarrobillo.

Por lo tanto, certifico que la muestra vegetal entregada corresponde a la especie descrita anteriormente.



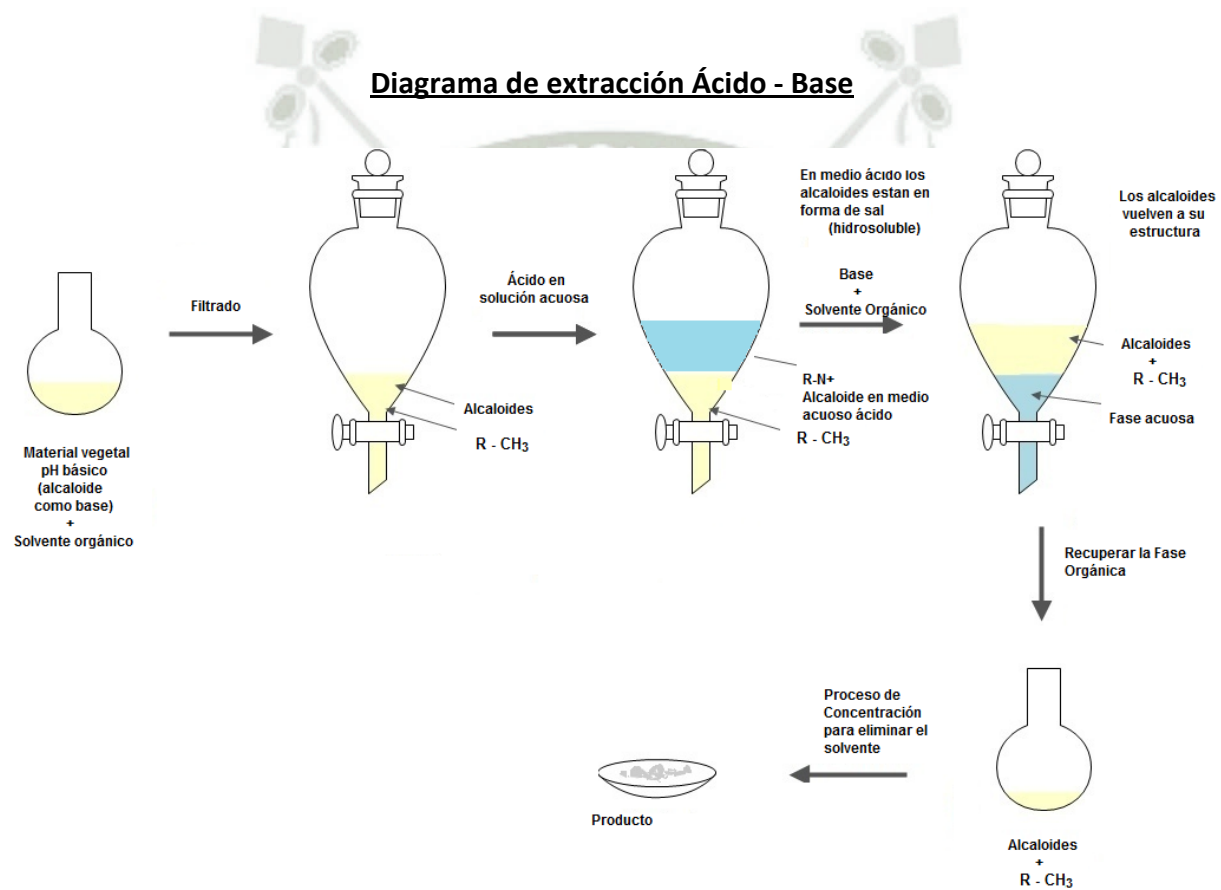
**VÍCTOR QUIPUSCOA SILVESTRE**  
BIÓLOGO C.B.P. Nº 2484

## Anexo 2

Figura de *Astragalus arequipensis* con fisionomía señalada



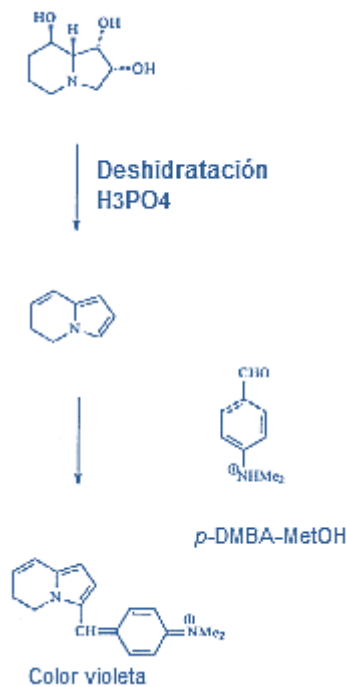
# Anexo 3



## Anexo 4

### Reactivo de Ehrlich (\*)

El ácido orto-fosfórico reacciona con la molécula polihidroxiindolizidínica y ocurre una deshidratación de la molécula para que luego el complejo *p*-dimetilaminobenzaldehído con metanol que es fuertemente electrófilo reacciona con el electrón del carbono  $\alpha$  del anillo indol y después de esta reacción calentando la placa se forma un complejo de color violeta.



### Composición

<i>p</i> - dimetilaminobenzaldehído	1 g
Metanol	25 mL
Ácido orto-Fosfórico	25 mL

### Preparación

Primero disolver el *p*- dimetil amino benzaldehído en el metanol, luego agregar el ácido orto-fosfórico, mezclar y llevarlo al frío porque es una reacción exotérmica.

\*(Russel *et al.* 2002)

## Anexo 5

### Medio Papa Dextrosa Agar PDA

Papa Dextrosa Agar se utiliza para el cultivo de hongos, es un medio de uso general para levaduras y mohos que pueden complementarse con ácido o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. Nutricionalmente es un medio base que estimula la esporulación de mohos y la producción de pigmento en algunos dermatofitos.

#### Composición (para 1 Litro de medio)

Patata	200 g
Dextrosa	20 g
Agar – agar	15 g
Cloranfenicol	500 mg

#### Preparación

Pelar y cortar las patatas en cuadrados de 1 cm, hervir en 1000 mL de agua destilada durante 30 minutos, luego filtrar y recuperar el filtrado en una probeta de 1000 mL enrazar con agua destilada a 1000 mL, agregar la dextrosa y disolver y finalmente agregar el agar-agar y disolver en un balón de vidrio, calentar si es necesario para disolver totalmente el agar- agar. Esterilizar a 121°C, 1.5 bar por 15 minutos luego agregar el cloranfenicol y verter en cada placa. Sellar cada placa y almacenar a al frío

## Anexo 6

### Medio Czapek [M1]

El medio contiene sólo fuentes inorgánicas de nitrógeno y fuentes químicas de carbono. El medio Czapek es útil para una variedad de procedimientos microbiológicos, incluyendo la microbiología suelo y hongos. Este medio garantiza el rendimiento característico micelio y conidios.

La sacarosa es la única fuente natural de carbono, y nitrato de sodio es la única fuente de nitrógeno, el fosfato dipotásico es el agente tampón, y cloruro de potasio contiene iones esenciales. El sulfato de magnesio y sulfato ferroso son fuentes de cationes.

### Composición (para 1 Litro de medio)

Sacarosa	30 g
Nitrato de Sodio	3.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de Potasio	0.5 g
Sulfato Ferroso	0.01 g

### Preparación

Pesar cada uno de los componentes del medio, tomar un balón y verter 1000 mL de agua destilada, agregar la sacarosa y disolver, luego agregar el resto de reactivos, disolver. Calentar si es necesario para su disolución, verter el medio en sus respectivos matraces de fermentación con tapón; esterilizar a 121 °C, 1.5 bar por 15 minutos

## Anexo 7

### Medio Avena [M2]

La avena es una fuente de nitrógeno, carbono, proteínas y nutrientes, el medio promueve el desarrollo de la meiosis de *Ascomycetes*.

#### Composición (para 1 Litro de medio)

Glucosa	50 g
Avena	20 g
Extracto de levadura	20 g
Acetato de sodio	10 g
sulfato de amonio	5 g
fosfato de dipotasio	2 g
Solución Stock	10 mL
↪ Sulfato ferroso	200 mg/ L
↪ Sulfato de magnesio	1 g / L
↪ Cloruro de cobre	1 g / L
↪ Cloruro de calcio	25 mg/ L
↪ Acido bórico	100 mg / L
↪ Molibdato de amonio	56 mg / L
↪ Sulfato de zinc	19 mg / L
pH	5±0.5

#### Preparación

Hervir la avena en 500 mL de agua destilada durante 3 minutos, filtrar y recuperar el filtrado. Agregar la glucosas y disolver, luego en extracto de levadura con los demás reactivos; disolver. Aparte preparar 1000 mL de la solución stock con agua destilada y verter 10 mL a la mezcla anterior, enraizar a 1000 mL y finalmente verter en cada recipiente de fermentación con un tapón. Esterilizar a 121 °C, 1.5 bar por 15 minutos

## Anexo 8

### Medio Avena-Lisina [M3]

La avena es una fuente de nitrógeno, carbono, proteínas y nutrientes, el medio promueve el desarrollo de la meiosis de *Ascomycetes*.

La glucosa funciona como fuente carbonada y la D-lisina es un suplemento que participa en la ruta de formación de swainsonina por lo tanto ayudara a promover la bioproducción de esta.

#### Composición (para 1 Litro de medio)

Glucosa	10 g
Avena	20 g
D-l-lisina	1.8 g
pH	5±0.5

#### Preparación

Suspender la avena en 500 mL de agua destilada hirviendo, calentar durante 3 minutos, filtrar y recuperar el filtrado en un balón una probeta de 1000 mL. No debe pasar el tiempo de ebullición ya que la el líquido comienza a tener un precipitado y ya no es apropiado para el caldo de fermentación.

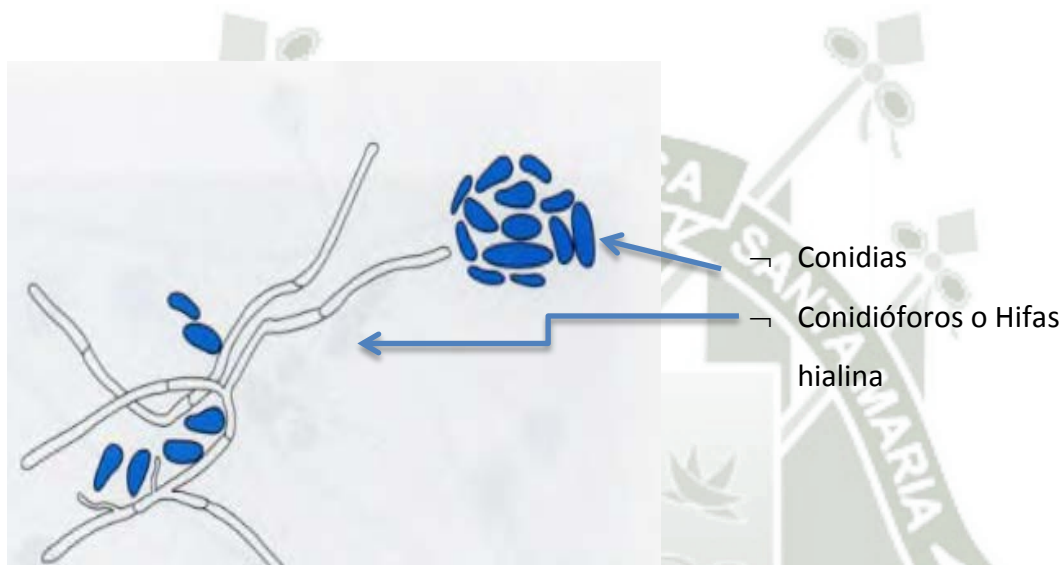
Agregar la glucosas y disolver, luego la D-lisina y finalmente enrazar a 1000 mL en una probeta y verter en cada recipiente de fermentación con un tapón.

Esterilizar a 121 °C, 1.5 bar por 15 minutos

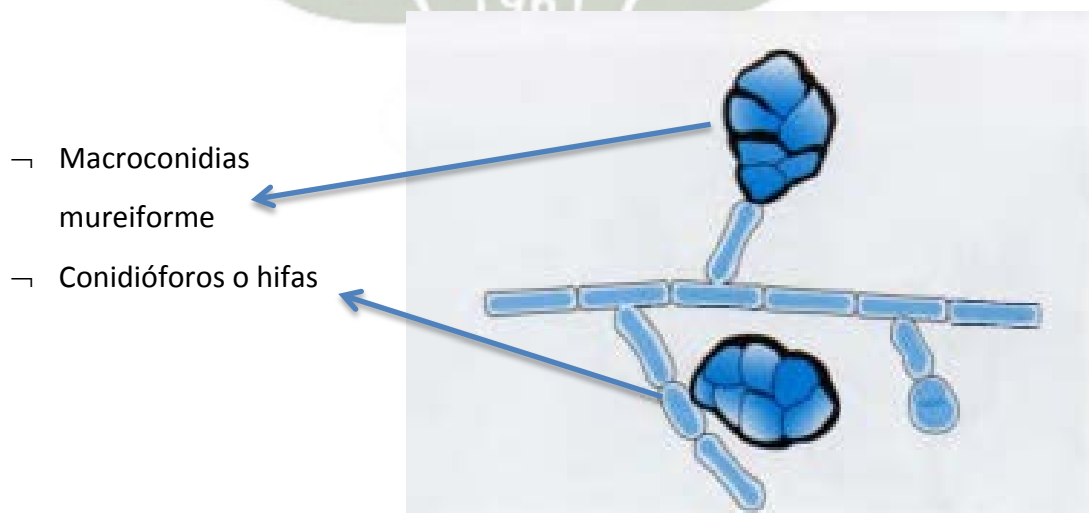
## Anexo 9

### Gráficas de la morfología de los hongos endófitos aislado a partir de *Astragalus arequipensis*

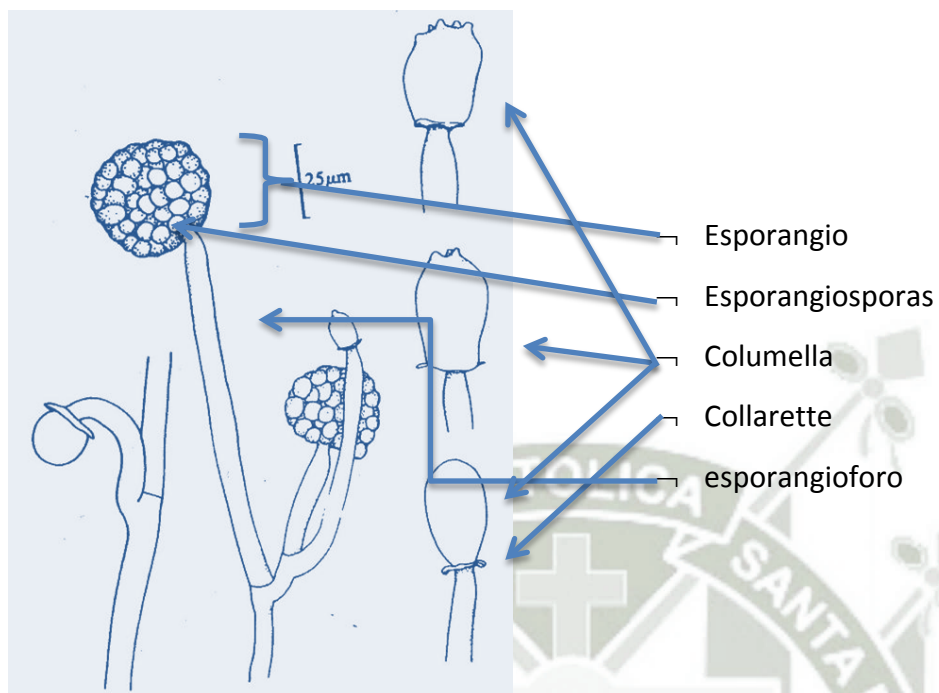
#### Morfología microscópica del género *Acremonium*



#### Morfología microscópica del género *Ulocladium*

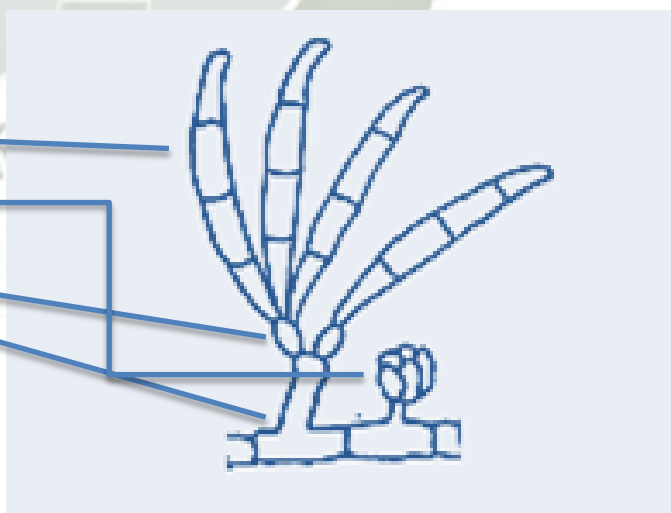


### Morfología microscópica del género *Mucor*

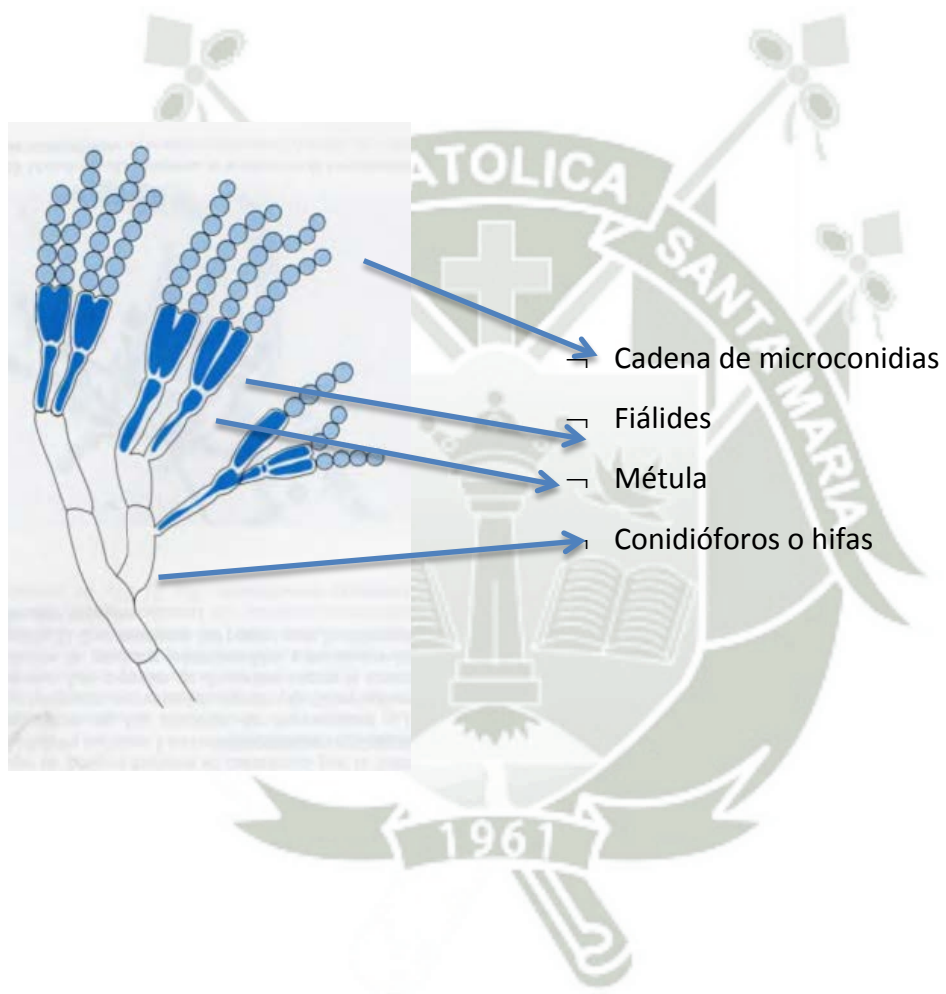


### Morfología microscópica del género *Fusarium*

- Macroconidias
- Microconidias
- Fiálides
- Conidióforo o hifa



### Morfología microscópica del género *Penicillium*



## Anexo 10

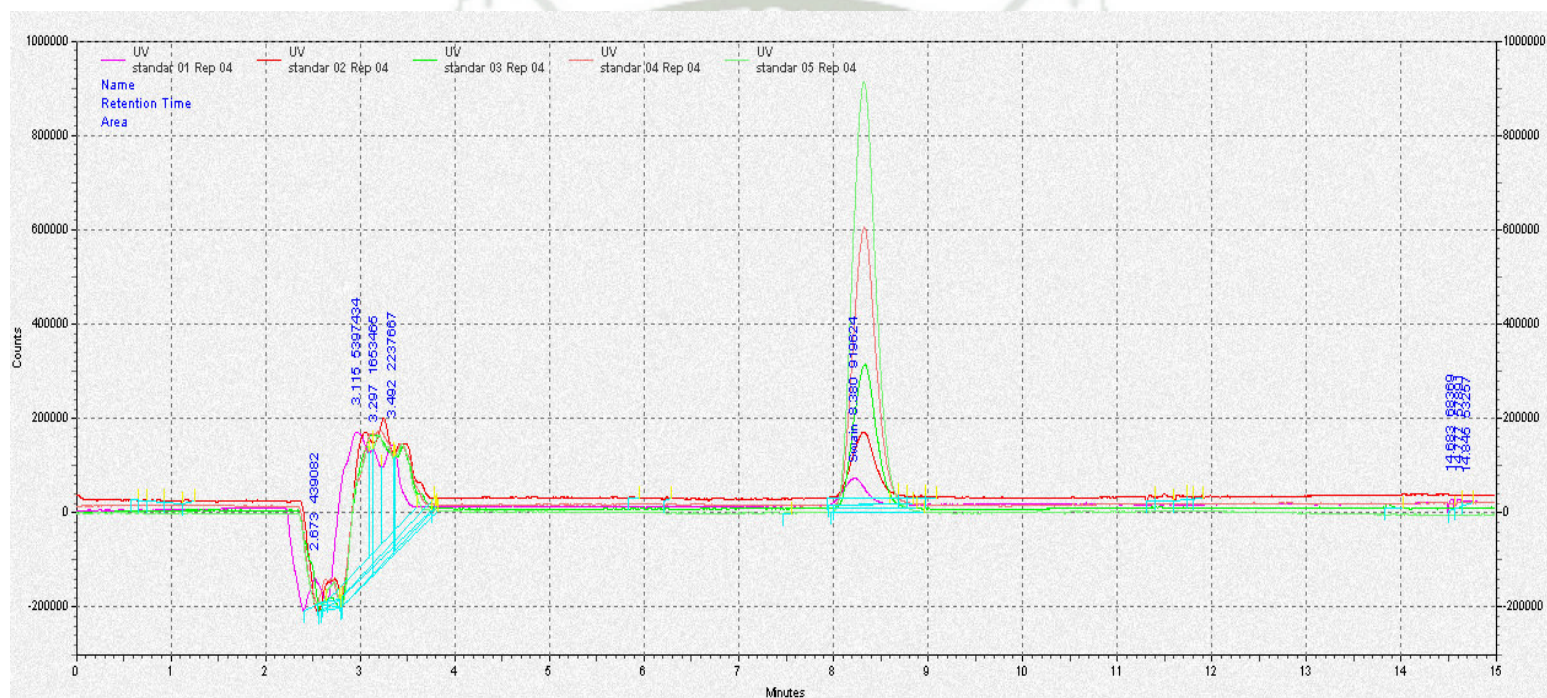
### Datos de la curva de calibración con el estándar de Swainsonina en HPLC

Estándar	[C] μg SW/mL	tr	A	X tr	X A	DS	RSD (%)
1	0.5	8.127	924864				
1	0.5	8.143	968573	8.2167	937687	26876	2.8662
1	0.5	8.380	919624				
2	1	8.077	2421281				
2	1	8.105	2419435	8.1680	2432684	21370	0.8784
2	1	8.322	2457337				
3	2	8.312	5061777				
3	2	8.073	5184071	8.2393	5143099	70428	1.3694
3	2	8.333	5183450				
4	4	8.317	9947108				
4	4	8.097	10054948	8.2463	9989884	57271	0.5733
4	4	8.325	9967597				
5	6	8.025	14220241				
5	6	7.993	16023949	8.1133	15356907	989318	6.4422
5	6	8.322	15826530				

[C] =concentración de μg de swainsonina estándar por mL de solución, X = promedio, tr= tiempo de retención, A= área de integración, DS= desviación estándar, RSD= desviación estándar relativa (desviación estándar/concentración media)x100

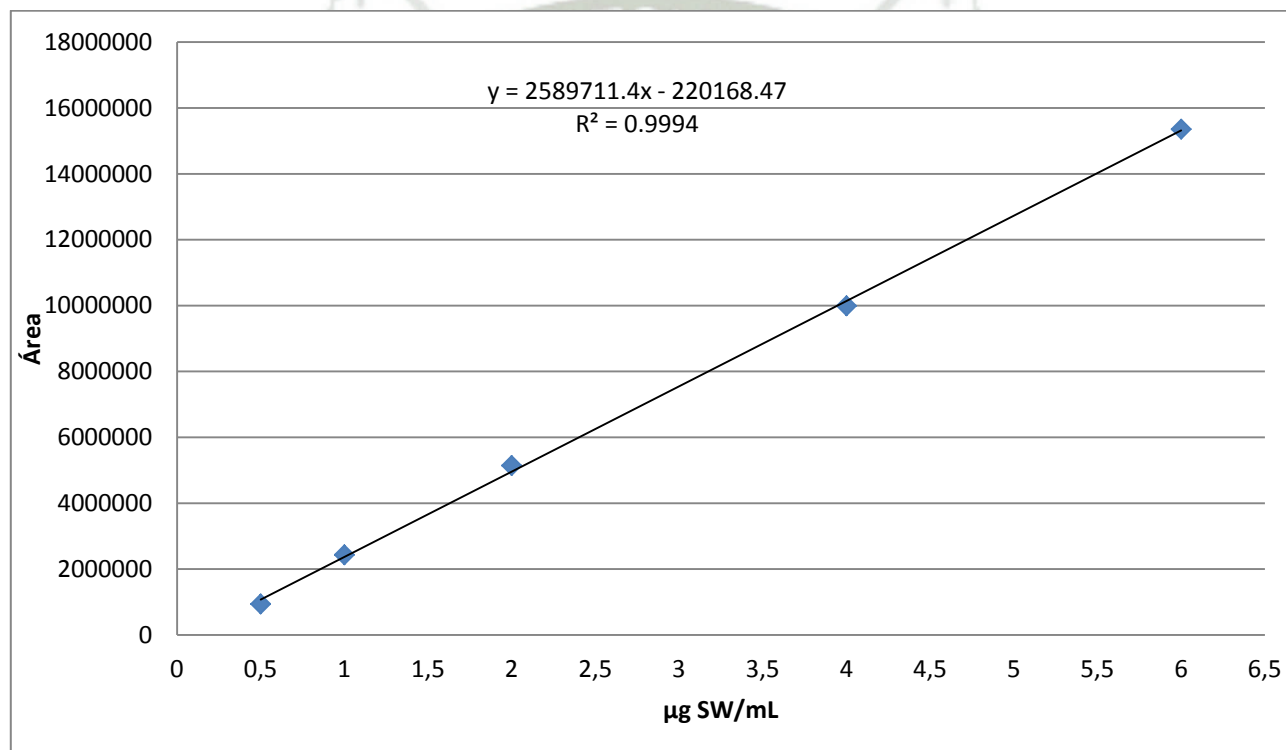
# Anexo 11

## Cromatograma de HPLC de la gráfica de calibración de Swainsonina



## Anexo 13

**Gráfico concentraciones de la curva de calibración con el estándar de *Swainsonina* en HPLC versus área de integración**



## Anexo 14

FUENTE VEGETAL DE HOJAS DE <i>Astragalus Arequipensis</i>									
M.	ACN	tr	A	[C] µg/mL	X [C]	X tr	X A	DS	RSD (%)
1		8.055	1874195	0.809					
1	20g	8.120	1930702	0.831	0.821	8.090	1904758.3	28535.35	1.4981
1		8.095	1909378	0.822					
2		8.062	6749042	2.691					
2	500g (1:9)*	8.117	6540650	2.611	2.675	8.096	6707492.7	150434.77	2.2427
2		8.110	6832786	2.723					
3		8.098	13223656	5.191					
3	500g (2:8)*	8.122	12989423	5.101	5.147	8.160	13108320	117157.095	0.8937
3		8.260	13111881	5.148					

\*Diluciones del extracto en 1000 µL, M=Muestra, ACN = extracto de X gramos de hojas en Acetonitrilo [C] =concentración, X = promedio, tr= tiempo de retención, A= área de integración, DS= desviación estándar, RSD= desviación estándar relativa (desviación estándar/concentración media)x100

## Anexo 15

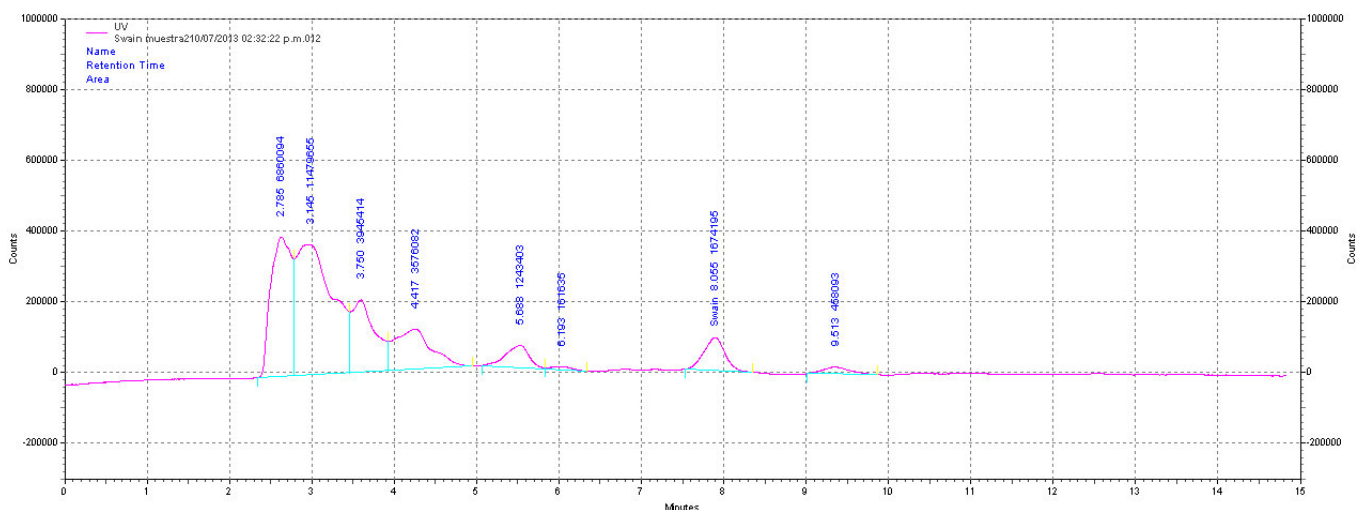
FUENTE FUNGAL DE <i>Fusarium spp</i> Y <i>Ulocladium spp</i> . EN MEDIO AVENA [M2] Y MEDIO AVENA-LISINA [M3]									
M.	ACN	tr	Área	[C] µg/mL	X µg/mL	X tr	X Á	DS	RSD (%)
4	<i>Fusarium spp.</i> [M3]	8.087	7348656	2.923					
4		8.188	6976800	2.779	2.855	8.172	7172926.7	186765.25	2.604
4		8.242	7193324	2.863					
5	<i>Fusarium spp.</i> [M2](25uL)*	8.310	4781319	1.931					
5		8.310	4991050	2.012	1.984	8.299	4918630.4	118974.52	2.419
5		8.277	4983522	2.009					
6	<i>Ulocladium spp.</i> [M3]	8.220	2891599	1.202					
6		8.268	2881256	1.198	1.200	8.230	2888102.0	5929.27	0.205
6		8.203	2891451	1.202					
7	<i>Ulocladium spp.</i> [M2]	8.217	5684319	2.280					
7		8.130	5587554	2.243	2.259	8.173	5631205.0	49071.66	0.871
7		8.173	5621742	2.256					

\*Dilución de 25 uL del extracto en 1000 uL, M=Muestra, ACN= extracto de fermentado de X en ACN, [C] =concentración, X = promedio, tr= tiempo de retención, A= área de integración, DS= desviación estándar, RSD= desviación estándar relativa (desviación estándar/concentración media)x100

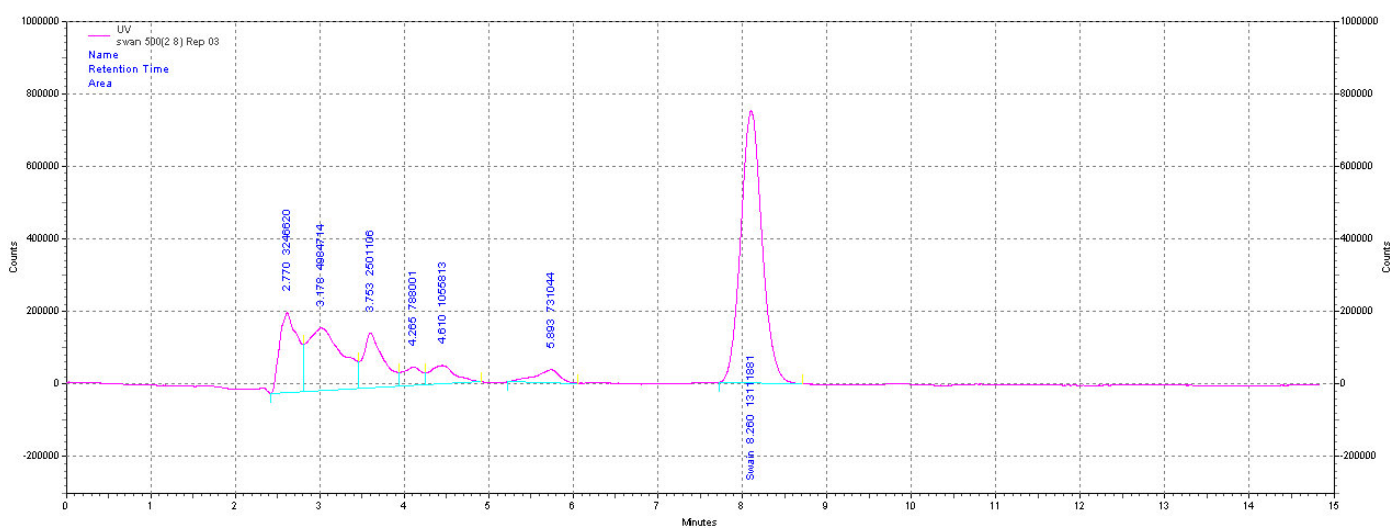
## Anexo 16

### Recopilación de los cromatogramas obtenidos de cada muestra analizada por HPLC

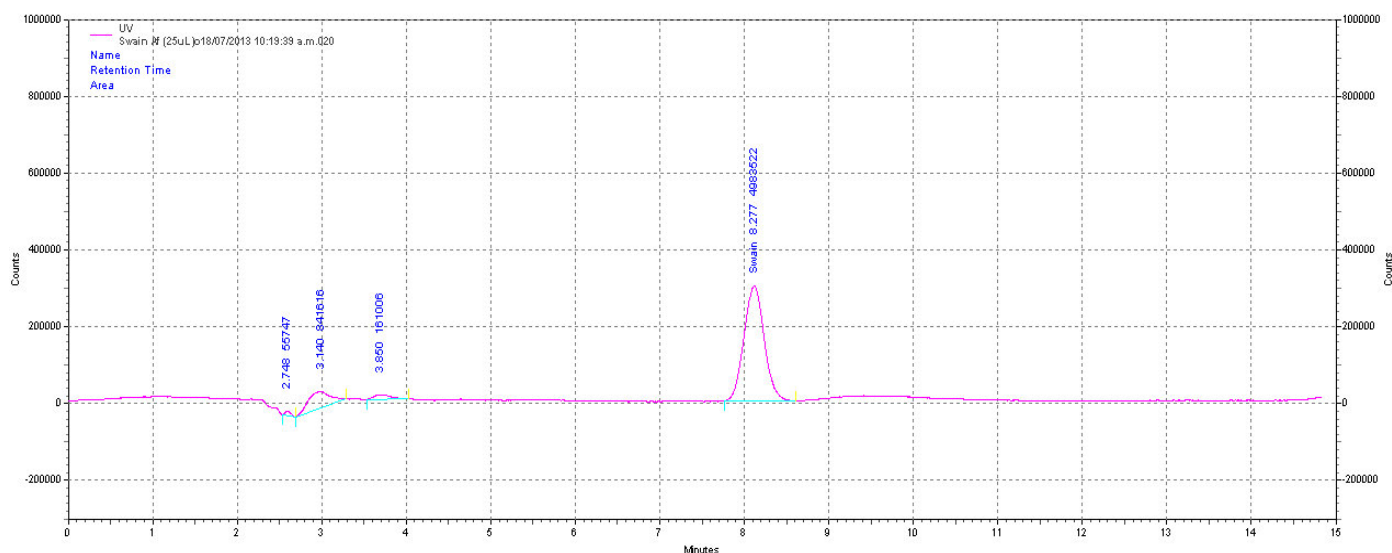
Cromatograma de HPLC de la gráfica de muestra de fuente vegetal de 20 g de hojas pulverizadas



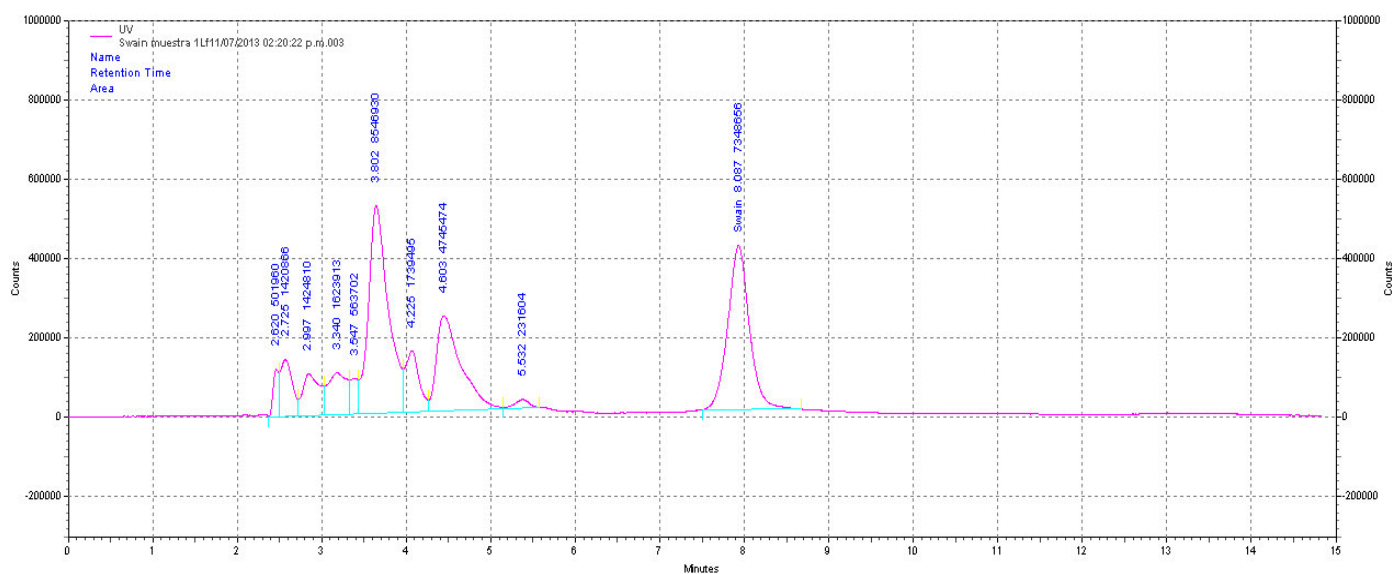
Cromatograma de HPLC de la gráfica de muestra de fuente vegetal de 500 g de hojas pulverizadas diluido 200 uL del extracto alcaloideo en con 800 uL de Acetonitrilo



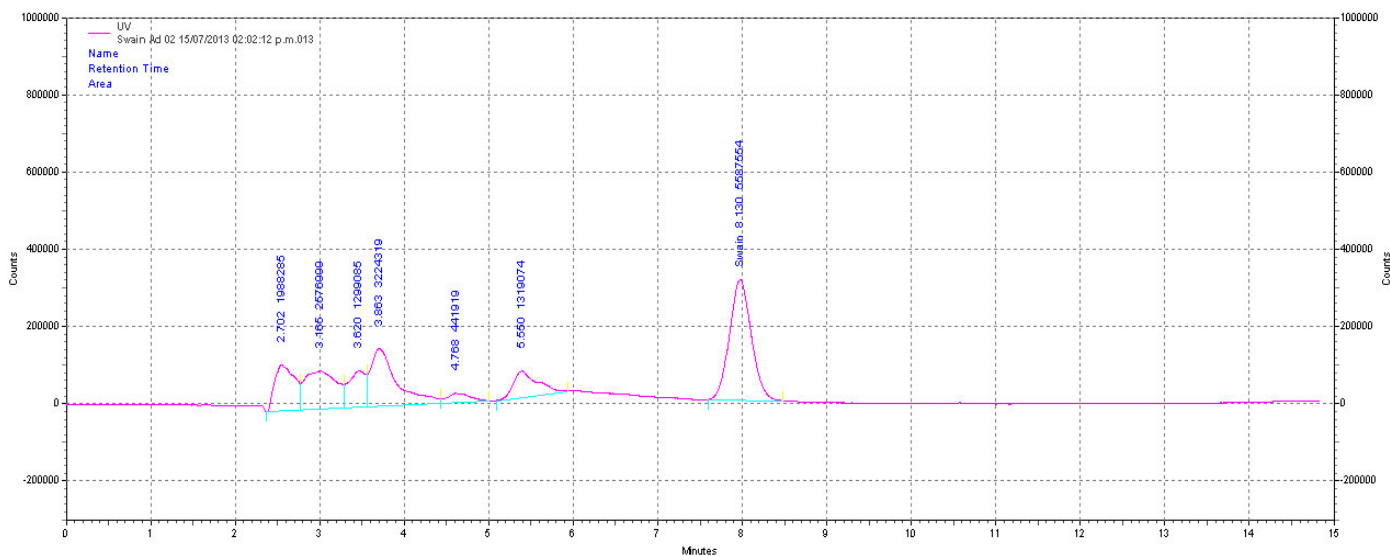
Cromatograma de HPLC de la gráfica de muestra de fuente Fungal de *Fusarium spp.* en medio Avena [M2] a 19°C-22°C durante 25 días, diluido 25uL del extracto alcaloideo en a 1000uL de Acetonitrilo



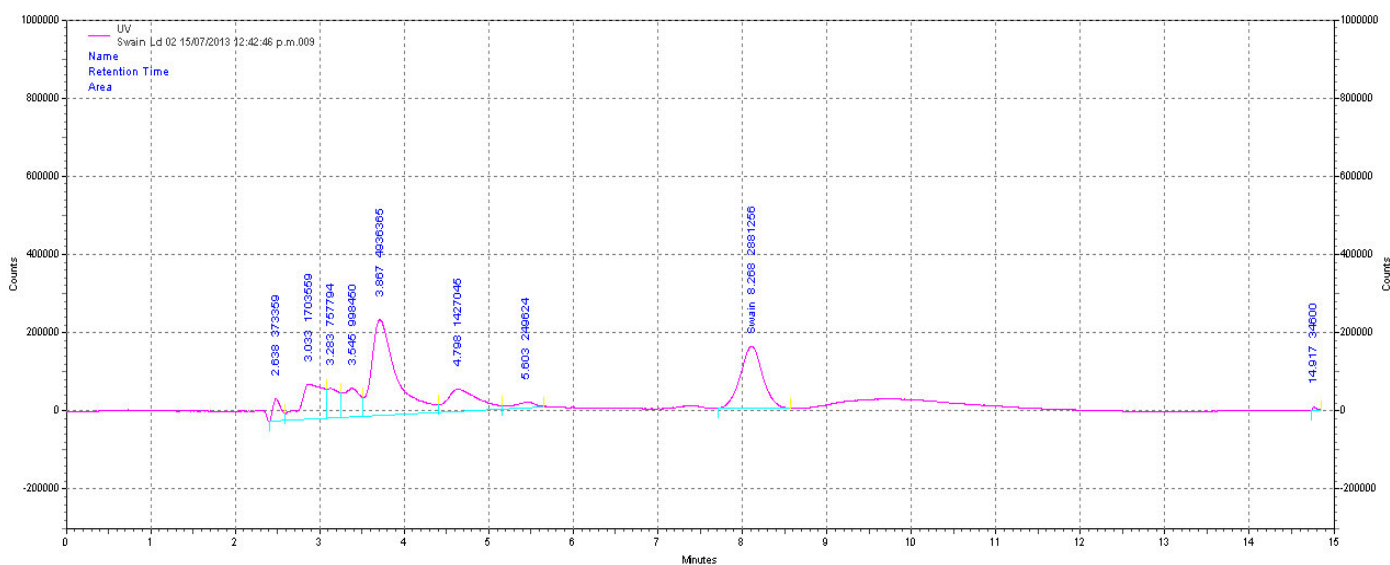
Cromatograma de HPLC de la gráfica de muestra de fuente Fungal de *Fusarium spp.* en medio Avena-Lisina [M3] a 19°C-22°C durante 25 días



**Cromatograma de HPLC de la gráfica de muestra de fuente Fungal de *Ulocladium spp.*  
en medio Avena [M2] a 19°C-22°C durante 25 días**



**Cromatograma de HPLC de la gráfica de muestra de fuente Fungal de *Ulocladium spp.*  
en medio Avena-Lisina [M3] a 19°C-22°C durante 25 días**



## Anexo 17

Tabla de datos obtenidos a partir de la monitorización de cinética (g/L) de *Fusarium spp.* y *Ulocladium spp.* En medio Avena [M2] y medio Avena-Lisina [M3] de los primeros 14 días.

Horas	Medio Avena [M2]		Medio Avena-Lisina [M3]	
	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Ulocladium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Ulocladium spp.</i>
0	70.6	70.6	70.6	70.6
12	80.965	80.965	80.965	80.47
24	84.655	85.105	96.805	110.195
36	90.055	87.715	101.35	123.355
48	90.64	88.525	113.365	125.155
60	92.89	88.975	125.92	129.745
72	95.545	87.535	129.745	135.865
84	99.505	88.165	137.89	143.245
96	100.72	91.09	149.365	144.01
108	101.62	100.405	154.63	152.29
120	104.14	104.535	158.365	154.855
132	105.355	106.805	161.245	157.015
144	108.955	115.315	162.865	164.845
156	111.97	125.425	165.79	171.865
168	113.455	129.475	166.465	178.345
180	109.4	124.755	167.34	181.675
192	103.87	114.05	169.4325	181.925
204	102.385	102.57	169.525	174.885
216	100.855	95.455	169.615	164.83
228	98.965	94.105	170.38	157.785
240	97.885	89.38	162.91	147.895
252	93.16	84.475	153.19	142.39
264	92.125	80.74	140.455	131.545
276	90.865	78.58	139.96	128.845
288	88.255	77.5	138.925	123.85
300	87.67	76.375	136.9	122.005
312	87.7	75.4	136.95	122.7
324	84.9	76.05	136.85	122.15
336	84.885	74.9	134.9	120.1