



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Patología Animal

**Determinación del efecto de Lupanina y de Esparteína, administradas por vía oral,
sobre el comportamiento de pollos Broiler, en el laberinto en cruz elevado**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Grado de LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA.

Claudia Andrea Díaz Marín
Valdivia Chile 1999

PROFESOR PATROCINANTE

: Dra. AIDA CUBILLOS G.

PROFESOR COPATROCINANTE

: Dr. FREDERICK AHUMADA M.

PROFESORES CALIFICADORES

: Dr. OSCAR ARAYA.

Dr. RAFAEL BURGOS.

FECHA DE APROBACION

: 9 de Diciembre de 1999

**A MIS AMIGOS
CON CARÍÑO**

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCION.....	3
METERIAL Y METODO.....	11
RESULTADOS.....	15
DISCUSION.....	19
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFIA.....	23
ANEXOS.....	30
AGRADECIMIENTOS.....	44

"DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LUPANINA O ESPARTEINA, ADMINISTRADAS POR VÍA ORAL, SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE POLLOS BROILER, EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO".*

1. RESUMEN

Se estudió el efecto de los alcaloides lupanina y esparteína provenientes de la semilla de lupino, sobre el sistema nervioso central de pollos broiler al ser administrados por vía intraingluviana.

Se utilizaron 90 pollos broiler de 15 días de edad divididos en 6 grupos de 15 aves cada uno, a 4 de éstos se les administró diariamente y por un periodo de 5 días las siguientes diluciones de alcaloides: 1/10 de la DL50 de lupanina, y 1/5, 1/10 y 1/20 de la DL50 de esparteína para pollos broiler. Los grupos restantes correspondieron a un grupo control negativo, que permaneció sin administración y un grupo control agua, que recibió agua destilada, medio en el que se diluyen los alcaloides. La dosis a administrar a cada ave fue calculada basándose en 0,5 ml/100 g de peso corporal.

Se realizaron las mediciones de comportamiento en el laberinto en cruz elevado (elevated plus maze) en dos momentos, la primera observación se llevó a cabo el último día de administración de los alcaloides y la segunda, 5 días más tarde, a objeto de determinar en esta última una recuperación de algún posible efecto sobre las aves.

Cada ave fue puesta en la zona intermedia de dicho dispositivo en cruz y por espacio de 3 minutos se determinaron las siguientes variables: número de entradas en los brazos abiertos, número de entradas en los brazos cerrados, tiempo de permanencia en la zona intermedia, tiempo de permanencia en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en los brazos cerrados.

El análisis estadístico aplicado a cada una de estas variables se realizó en el programa computacional Graph Pad Prism, versión 2.0 no evidenciando diferencias significativas tanto en el análisis intergrupo (comparaciones realizadas entre distintos grupos en un mismo momento), como en el análisis intragrupal (comparaciones entre el momento 1 y 2 de un mismo grupo).

Los resultados obtenidos en el estudio permiten concluir que ni lupanina ni esparteína, en las dosis utilizadas, producen cambios en el comportamiento de pollos broiler.

Palabras clave: Pollos, lupanina, esparteina, lupino, comportamiento.

* Proyecto FONDECYT N° 1970404.

"EFFECT OF LUPANINE OR SPARTEINE BY ORAL ADMINISTRATION ON THE BEHAVIOUR OF BROILER CHICKENS, IN THE ELEVATED PLUS MAZE". *

2. SUMMARY

The effect of the alkaloids lupanine and sparteine from lupin seed, on the central nervous system of broiler chickens by oral administration was studied.

90 chickens of 15 day old, divided into 6 groups of 15 fowls each, were used. Four of the groups received the following doses of alkaloids which were administered for 5 days: 1/10 of the lupanine LD50, and 1/5, 1/10 and 1/20 of the sparteine LD50 for broiler chickens. The other two groups were used as a negative control group, which remained without administration, and a water control group, which received distilled water, the medium in which the alkaloids were diluted. The dose administered to each fowl was calculated based on 0,5 ml/100 g of corporal weight.

The behaviour of the fowl was measured in the elevated plus maze at two times, the first on the last day of alkaloid administration and the second, five days later, in order to observe the recovery process.

Each fowl was placed in the intermediate zone of the maze and in 3 minutes the following variables were determined: The number of entries in the open arms, time spent in the open arms, time spent in the intermediate zone, number of entries in the closed arms and time spent in the closed arms.

The statistical analysis of the variables were obtained by using the computer program Graph Pad Prism (2.0) and did not show significant differences between the groups in the intergroups analysis (comparisons made between distinct groups at one time), nor between groups in the intragroups analysis (comparisons between results from the two different times of observation).

The results obtained in the study permit to conclude that neither lupanine nor sparteine, in the doses used, produce changes in the behaviour of broiler chickens.

Keywords: Chicken, lupanine, sparteine, lupin, behaviour.

* Proyecto FONDECYT N° 1970404.

3. INTRODUCCION

3.1. ANTECEDENTES GENERALES

En la industria avícola los gastos en insumo para alimentación, constituyen la parte más importante de los costos de producción, representando aproximadamente un 70 a 80% (Rodríguez, 1980). En particular el pollo broiler, debido a su gran rapidez de crecimiento, es el que tiene los más altos requerimientos proteicos (Scott y col., 1982); es así como el porcentaje de proteína total en la ración se eleva sobre el 20- 25 %, siendo aportada mayoritariamente por harina de pescado (Galdamez, 1973; Cubillos, 1977; Scott y col., 1982).

El alto costo que significa el uso de alimentos proteicos de origen animal, en raciones de aves de carne, induce a la búsqueda de nuevas fuentes proteicas de origen vegetal (Cubillos, 1977; Mora, 1977). Entre éstas se cuenta con afrecho de soya, muy usado en otros países, pero que no se cultiva en Chile; la torta de maravilla que se produce en escasa cantidad en nuestro país; el afrecho de raps, que tiene sus limitantes especialmente en aves de postura, y la semilla de lupino (López, 1977; Cubillos y col., 1982).

En general las materias primas tradicionales en la alimentación de aves, como lo son el maíz y la soya, tienen en nuestro país, un costo más alto que en países vecinos y Estados Unidos. Debido a esto, se está buscando nuevas alternativas, como el lupino para compensar los costos alimenticios, que son los de mayor incidencia económica; sobre todo si se compete en mercados abiertos de comercialización con otros países (Mac Auliffe, 1996).

3.2. LUPINO

3.2.1. Características botánico-agronómicas

El lupino, también conocido como "altramuz", pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionaceae* y género *Lupinus* (Robinson, 1962; Cárdenas, 1977).

Es una planta semi-arbustiva, de tallos suculentos, hojas compuestas, con flores agrupadas en inflorescencias racimosas, de color azul, violeta, blanco, magenta o bicolor. El fruto recibe el nombre de legumbre, cada vaina tiene 3 a 6 granos. Posee una raíz pivotante, que alcanza más de 1 m de longitud, con múltiples ramificaciones, raicillas y pelos radicales. Toda su masa radicular es capaz de vivir en simbiosis con las bacterias del género *Rhizobium* (López, 1977; Cárdenas, 1977).

La siembra permite ahorro de fertilizantes, debido a sus propiedades de utilizar el fósforo no disponible por otros cultivos regionales y captar nitrógeno atmosférico (FAO 1982). Esto último deja un balance positivo de nitrógeno en el suelo después de su cosecha, razón por la cual se usa como cabecera de rotación. El lupino además, aprovecha la

humedad y los nutrientes de capas profundas del suelo, absorbe de éstos elementos minerales poco solubles, por lo que mejora los cultivos posteriores (Cárdenas, 1977; Larraín, 1977; Gross, 1982; López, 1986).

El cultivo tiene amplias perspectivas especialmente en la zona sur y centro de Chile, donde las condiciones agroclimáticas de invierno húmedo y verano seco, además de suelos ácidos, son adecuadas (von Baer, 1993). Otra característica por la que se ve favorecido su cultivo en dichas zonas, es la rusticidad y adaptabilidad a climas fríos (-10° C) y a suelos pobres (Galdamez, 1973; von Baer, 1986).

El género *Lupinus* comprende alrededor de 500 especies, de las cuales no más de 10 se encuentran presentes en el país. De éstas, 4 están consideradas como especies nativas mientras que el resto corresponde a introducciones. Entre las especies cultivadas, *L. albus* y *L. angustifolius* corresponden a aquellas más importantes para la producción de grano en el país (Peñaloza, 1996). En conjunto, la superficie cultivada con ambos lupinos alcanzó la cifra histórica de 25.000 has la temporada de 1994/1995, con más del 95% concentradas en la IX Región del país (Peñaloza, 1996), siendo para la temporada 1998/1999 de 18.724 has, encontrándose en la IX Región, un 98% de ellas (Agroanálisis, 1999). Cabe además señalar, que durante 1997, se sembraron a nivel mundial 1,4 millones de has, las que se concentraron en un 89% en Oceanía, especialmente en Australia (Agroanálisis, 1999).

En la actualidad, *L. albus* y *L. angustifolius* se han incorporado en sistemas de producción basados principalmente en la rotación con cereales. Sin embargo, el primero se ha cultivado por más de 20 años, principalmente en la pequeña agricultura, en tanto que *L. angustifolius* se está insertando progresivamente en los sistemas de producción de la mediana y gran agricultura del sur de Chile (Peñaloza, 1996).

A pesar de haber una gran variedad de especies en el mundo, en la agricultura chilena sólo tienen importancia 5 de ellas: *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. consentini*, *L. mutabilis* (Bascur, 1982). Estas especies corresponderían en su mayoría a tipos amargos, a partir de los cuales y por selección genética, se han obtenido variedades dulces (Tirado-Serrano, 1971). von Sengbush en Alemania en 1928, obtuvo por selección genética los primeros tipos de lupinos dulces, con bajos niveles de alcaloides (Cárdenas, 1977; von Baer, 1986).

3.2.2. Usos del lupino

El principal uso del lupino es en alimentación animal, ya sea peletizado, molido o como grano entero. Su utilización para consumo humano se ha instaurado en varios países, incorporándose a las dietas como extensor de harinas o procesado como "snak" (Peñaloza y col., 1995).

Otros usos son como abono verde, mejorador del suelo, vainas verdes y legumbres, ensaladas, forraje, harinas, aceites comestibles (margarinas), etc. (Cárdenas, 1977; Agroanálisis, 1999).

3.2.3. Ventajas y desventajas de su cultivo

El lupino se produce en el sur de Chile, y que ha despertado interés en muchos países, como una alternativa proteica en la alimentación de monogástricos (Mac Auliffe, 1996), especialmente en aves, por las razones que se indican:

- Alto aporte calórico, para sustentar una postura intensiva y crecimiento acelerado.
- Elevado valor de energía metabolizable para aves, superior al afrecho de soya von Baer e Ibañez (1979).

El cultivo no requiere de acondicionamiento del suelo, de tal forma que se reducen los costos de abono y fertilizantes, siendo muy buenos los rendimientos medios en suelos pobres, poco profundos, ácidos, arenosos, en donde las cosechas de cereales son siempre escasas (Bascur, 1982; Gross, 1982).

De acuerdo a cifras de la FAO (1994), el consumo de nitrógeno en el país se ha incrementado sostenidamente durante los últimos 10 años, representando más del 50% del total de los fertilizantes usados actualmente. Dentro de las especies con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico se encuentra el lupino, cuyos aportes de nitrógeno a los sistemas de producción se han estimado entre 150 y 200 kg/ha/año (Unkovick y col., 1994).

Sin embargo, no se puede dejar de mencionar la presencia de ciertas limitaciones agronómicas como lo es la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en *L. albus*, o la mancha café (*Pleiochaeta setosa*) en *L. angustifolius*, que representan los principales problemas bióticos de producción de lupinos en el sur del país (Galdamez y Peñaloza, 1995).

Y finalmente, la presencia de alcaloides, constituye otra desventaja, que con las tendencias ecologistas del mundo moderno se ha llevado a reconsiderar el concepto de alcaloides como compuestos indeseables, basado en las numerosas evidencias sobre sus beneficios, no sólo como mecanismo de defensa de las plantas frente a herbívoros, insectos u hongos, sino también por su potencial aplicación en medicina y agricultura (Wink, 1994; Gulewicz y col., 1994). Es así como trabajos realizados en diversas especies de lupino revelan su función no sólo como armas biológicas, sino como estimuladores del rendimiento per se (Kahnt e Hijazi, 1987; von Baer y col., 1990; Cwojzinski y col., 1989). Trabajos realizados por Tyski (1988) demostraron que lupanina, 13 OH-lupanina y angustifolina tienen un efecto bacteriostático. von Baer (1996), observó la acción inhibidora sobre el crecimiento del hongo causante de la antracnosis por parte de lupanina, y de esparteína sobre la mancha café.

3.2.4. Aspectos nutricionales

Las especies de lupino más conocidas en la alimentación animal son: *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* (Mac Auliffe, 1996). Las distintas semillas varían en formas, tamaños, colores y composición nutricional:

Composición química de diferentes semillas de lupino (% en base a materia seca)

Especie de lupino	ProL Cruda	Ext Etéreo	Cenizas	Fibra Cruda
<i>L albus</i>	33-38	9,0-12	3-4	12-14
<i>L angustifolius</i>	27-34	5,5-6,5	3-4	16-17
<i>L luteus</i>	39-41	5,0-6,0	3-4	18-20
<i>L mutabilis</i>	40-46	17-23	4	10

Fuente: Aguilera y Trier, 1978.

Se puede apreciar que la proteína varía desde 27% hasta 46% y que el contenido de aceite (extracto etéreo) en *L albus* es el doble del encontrado en *L luteus* y *L angustifolius*. Por otra parte *L mutabilis* posee los más altos contenidos de proteína cruda y extracto etéreo, en cambio el más bajo en fibra cruda (Mac Auliffe, 1996).

Según von Baer y col., 1992, el porcentaje proteico de los *Lupinus albus* en Chile sería en promedio de un 36,2% fluctuando entre 29,9 y 42,2%.

El problema nutritivo ampliamente conocido de la semilla de lupino es su bajo contenido en aminoácidos azufrados (especialmente metionina y usina) y también valina y triptófano, lo que se presenta tanto en las variedades dulces como amargas (Díaz y col., 1977; Pizarro, 1977; Cerletti y col., 1982). Pero, Galdamez (1973) y Pizarro (1977) concuerdan en que el aminoácido limitante sería solamente la metionina, considerando a Usina con una concentración adecuada; es así que Hanczakowski (1982), señala en uno de sus estudios, que la semilla de lupino es una buena fuente de proteína en dietas de pollos broiler, cuando es suplementada con este aminoácido limitante.

En términos generales, se puede decir que la proteína del lupino es comparable a la de otros importantes recursos proteicos y que cuando es suplementario con DL-metionina, en concentraciones de 0,1 a 0,4% de la dieta, produce una mejoría significativa en su calidad biológica (Espinoza y col., 1984; López, 1987; Martínez, 1987).

El contenido de aceite es bastante alto comparado con otros cultivos, variando según la especie entre 5 a 18% (Hill, 1982).

Se ha comprobado que los ácidos grasos insaturados son los que se encuentran en mayor proporción en el lupino, y de éstos, principalmente el ácido oleico (Cárdenas, 1977; Burbano y col., 1982), a esto se agrega un alto contenido de ácido linoleico lo que hace a esta leguminosa más interesante para la alimentación avícola, debido a que este ácido graso es considerado como el único esencial para las aves (Scott y col., 1982).

Su aporte de energía metabolizable alcanza las 2559 kcal/kg en promedio, y en el caso de *L albus* se encuentra entre 2991 y 3280 kcal/kg (Bouthelier y col., 1982; Romero, 1982; Camiruaga, 1986). Estos valores superan las calorías aportadas por el afrecho de soya, raps y maravilla, con niveles de 2240, 1590 y 1666 kcal/kg respectivamente (Tartakowsky y Schultz, 1977).

Los niveles de fibra cruda en las diferentes especies de lupino fluctúan entre 11,3 y 16,8% en la semilla entera. El 81-88% de la fibra cruda se encuentra en la cáscara, por lo

que la semilla descascarada tiene bajos niveles de fibra cruda, alrededor de un 2%, de ahí el procesamiento de descascarillado a que puede ser sometida para su mejor utilización en monogástricos (Espinoza y col., 1984).

Para las aves que no pueden hacer un buen aprovechamiento de la fracción fibrosa de los alimentos, el lupino descascarado aparece como una alternativa válida, si además pensamos que el proceso de descascarado se lleva a cabo en la zona de cultivo que es la zona ganadera, la cáscara se utilizaría como alimento para ganado mayor, fletándose a la zona central sólo la semilla descascarada (Mac Auliffe, 1996).

En general se puede alimentar pollos broiler con las siguientes cantidades de lupino en la ración sin observar depresiones en la performance: sobre 10% en la primera semana, sobre 20% en la segunda, sobre 25% en la tercera y 30% a partir de la cuarta semana, después de la salida del cascarón; considerando la suplementación con metionina (Vogt y col., 1982).

3.3. ALCALOIDES

Los alcaloides están clasificados en 6 grupos dentro de los cuales encontramos los quinolicidínicos (Cheeke y Shull, 1985), grupo al cual pertenecen los alcaloides del lupino y que en cuyo caso constituirían el principal obstáculo para su uso en consumo animal (López-Bellido y Fuentes, 1986).

Estos son compuestos termorresistentes que contienen nitrógeno (Cheeke y Shull, 1985), de variable complejidad, aunque la mayoría son bicíclicos y tetracíclicos. Encontrándose como bases terciarias y como N-óxidos (Keeler, 1989; Muzquiz y col., 1989). Las bases terciarias son normalmente solubles en agua, y fuertemente básicas (Cheeke y Shull, 1985).

La concentración puede ir desde niveles indetectables en variedades dulces (genéticamente obtenidas) hasta un 3,8% en algunas especies amargas (Keeler, 1989; Muzquiz, 1989). Las proporciones relativas de alcaloides en una especie determinada varían con el cultivar, la localidad y las condiciones climatológicas (Muzquiz y col., 1993; Cárdenas, 1977). Variará además de acuerdo al órgano que se analice, su posición en la planta y la edad de ésta (Jambrica, 1983). Así los alcaloides se encuentran mayormente acumulados en las partes aéreas (91% - 98%), y se presentan en concentraciones de hasta 4 veces más en las plantas amargas que en las dulces (Saito y col., 1993); Cheeke y Shull (1985) señalan que la mayor concentración de alcaloides está en la semilla.

Contenido de alcaloides totales (g/Kg) y componentes alcaloideos (%) en 3 especies de Lupino

Alcaloide	L. luteus	L. angustifolius	L. albus
Alcaloide Total	0.4-19.0	0.0-15.0	0.0-38.0
Lupanina	----	21,8-66,6	80,7-98,7
Espartenía	0,0-2,5	----	----
Lupinina	35,2-100	----	----
Angustifolina	----	20,2-49,5	0,0-0,8

Fuente: Muzquiz (1989).

En la primera conferencia del Lupino, se propusieron "Normas de calidad para granos de lupino blanco (*L. albus*) de uso industrial" (von Baer y col, 1992) en lo concerniente a muestreo, alcaloides y otros parámetros de calidad. Resultando la siguiente clasificación para los alcaloides presentes:

Lupino dulce, con una concentración de alcaloides de 0 a 0,05%, semi-dulce con 0.05 a 0,15%; semi-amargo con 0,15 a 0,3%, y amargo con 0,3 a 2% (von Baer y col., 1992).

Dos de los alcaloides quinolicidínicos. lupanina y esparteína. son considerados los más amargos de todos los alcaloides (Ballester y col., 1982; Cheeke y Shull, 1985) y los más tóxicos (Aguilera y Trier, 1978).

Deben tomarse precauciones para evitar el riesgo de reversión de cultivares de dicha especie a formas amargas. Al respecto, se insiste en la necesidad de renovación periódica de la semilla producida, controlada y certificada en forma apropiada, para evitar lo que ocurriera con *L. albus* hace una década (von Baer y Pérez. 1991).

Sin embargo. Muzquiz y col. (1993). indican que los efectos tóxicos de los alcaloides del lupino no son acumulativos y los alcaloides son rápidamente excretados por el riñón. Por lo tanto se pueden ingerir grandes cantidades de semillas de lupino, siempre que la cantidad total de alcaloides no exceda un determinado nivel.

3.4. INTOXICACIÓN POR LUPINO

Se describe una intoxicación por lupino, que se produce por la acción directa de los alcaloides sobre el organismo. El cuadro se caracteriza por producir depresión respiratoria y fibrilación cardíaca (Culvenor y Petterson.. 1986; Merck, 1993), posee también acción hipotensora e inhibición de la transmisión neuromuscular. Se ha visto que en cuadros agudos reduce drásticamente el consumo de alimento. Especialmente en animales jóvenes hay un efecto antimetabólico, que reduce la eficiencia alimenticia (Merck. 1993).

Jurado (1989). indica que los alcaloides en sí, tienen una acción paralizante del sistema nervioso central, especialmente sobre los centros respiratorio y vasomotor, los que primero son estimulados y luego paralizados, produciéndose muerte por asfixia asociada con convulsiones.

La intoxicación por los altramuces puede ser aguda o crónica denominándose corrientemente a la última, como lupinosis. La intoxicación aguda se produce cuando se consume una considerable cantidad de plantas en un breve período de tiempo y se debe al contenido de alcaloides. Los síntomas manifiestos son inapetencia y disnea, seguida por lo general, por convulsiones e hiperexcitabilidad. La muerte se debe a parálisis respiratoria, pero si el animal sobrevive, es probable que se recupere por completo, ya que los alcaloides del altramuces se eliminan fácilmente por la orina. No hay ictericia y no se observan lesiones post mortem características (Gamery Papworth. 1970).

La ingestión de esta semilla también puede producir intoxicación por lupinosis originada por una hepatotoxina. Durante mucho tiempo se relacionó la lupinosis con el contenido de alcaloides en las plantas, aunque la lupinosis también se presentaba después del pastoreo del lupino dulce. En realidad la lupinosis es debida a las micotoxinas producidas por una contaminación secundaria de la planta por el hongo *Phomopsis leptostromiformis* (Culvenor y Petterson, 1986), que crece en el tallo y en las vainas de las semillas (Cheeke y col., 1985). Los síntomas son embotamiento, pérdida de apetito, desmejoramiento general e ictericia (Gamery Papworth. 1970).

Finalmente se ha determinado que la ingestión de esta leguminosa es causa de la "Crooked Calf Disease" que se caracteriza por deformaciones esqueléticas en los terneros, condición teratogénica que puede ser causada por el consumo de lupino por vacas que están entre los 40 y 70 días de preñez: cabe mencionar que el principal alcaloide responsable de esta enfermedad es anagirina (Davis y Stout, 1986; Cheeke y col., 1985).

Sin embargo, esparteína. por ejemplo, se ha usado farmacológicamente como sulfato de esparteína (Swan, 1967) en el tratamiento de arritmias cardíacas (Agnese y Cabrera, 1997). Se han usado también plantas que contenían esparteína como fuente diurética, lo que es atribuido a sus propiedades a nivel cardíaco. También se ha usado como oxitócico (Swan, 1967; Steinegger, 1992).

A nivel de los ganglios autónomos se puede producir un estímulo con pequeñas dosis, o bien una inhibición de ellos con altas dosis. Periféricamente tiene una acción parecida al curare, impidiendo la respiración al inhibir las terminaciones del nervio frénico (Gamery Papworth, 1970; Campillo, 1999).

Dado lo anterior, se ha desarrollado una línea de trabajo sobre aves en lo que respecta al uso del lupino en su alimentación.

3.5. TOXICOLOGÍA

Uno de las formas más corrientes de expresar la toxicidad de un compuesto es por medio del valor DL50 (dosis letal media). Dicho valor es un dato calculado estadísticamente que expresa la dosis necesaria para matar el 50% de una población muy amplia de la especie estudiada, en las condiciones indicadas en el experimento (Radeleff, 1967).

En primer lugar, los riesgos que presenta cualquier sustancia dependen más de cómo se emplea que de su propia toxicidad. Por otra parte, es sabido que la toxicidad puede variar

con las especies, edad, sexo, estado de nutrición, factores de estrés y presentación farmacológica del preparado, así como la vía de administración y otros muchos factores (Radeleff, 1967).

Loomis (1982) divide en dos categorías los métodos para la evaluación de toxicidad: los ensayos generales y específicos. Los generales comprenden las pruebas de toxicidad aguda, prolongada y crónica, mientras que dentro de los ensayos específicos se encuentran los ensayos de potenciación, teratogénicos, reproductivos, mutagénicos, de tumorigenicidad y carcinogenicidad, ensayos sobre el efecto de la aplicación directa del producto sobre los ojos y finalmente los estudios de comportamiento.

Existen varios métodos de estudios de comportamiento, siendo los más usados la prueba de campo abierto (Loomis, 1982) y la prueba del **laberinto en cruz elevado** (elevated plus maze) (Loomis, 1982; Viola y col., 1994; Wolfman y col., 1994; Rodgers y Colé, 1994). Esta última, consiste en poner a un animal en un laberinto, que cuenta con dos brazos cerrados, corriendo en eje Norte-Sur y dos brazos abiertos, corriendo en eje Este-Oeste, siendo estos dos últimos brazos intensamente iluminados, midiendo su comportamiento por un determinado período de tiempo (Dawson y Tricklebank, 1995).

El presente estudio, como parte del proyecto FONDECYT N° 1970404, tiene por objetivo determinar efectos sobre el sistema nervioso que pudieran producir dos de los alcaloides del lupino, lupanina y esparteína, al ser administradas por vía oral a aves de carne. Esto dada la necesidad de saber exactamente las cantidades de alcaloides que aseguran ser no tóxicos para dicha especie.

Basándose en la toxicidad manifestada por dichos compuestos el presente trabajo postula la hipótesis ° lupanina o esparteína al ser administradas por vía intraingluviana, producen cambios en el comportamiento de pollos broiler en la prueba del Laberinto en Cruz Elevado".

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 MATERIAL

4.1.2 Material biológico:

- 90 pollos broiler de un día de edad.

4.1.3 Material farmacológico y solvente:

- Sulfato de esparteína

- Perclorato de Lupanina

- Agua destilada

4.1.4 Material de laboratorio:

- Pesa electrónica

- Cronómetros

- Jeringas de tuberculina

- Sondas de polietileno

- Anillos de colores

4.1.5 Laberinto en cruz elevado:

Este es una estructura en forma de cruz, que está a una distancia del suelo de 90 cm. Uno de sus pares de brazos opuestos, se encuentra rodeado por muros de madera de 50 cm de altura, constituyendo de esta forma la denominada zona cerrada, mientras que el par de brazos restante, es aislado del medio por placas de vidrio e iluminado homogéneamente mediante dos ampolletas de 100 Watts (una para cada brazo), conformando la zona abierta (Figura 1).

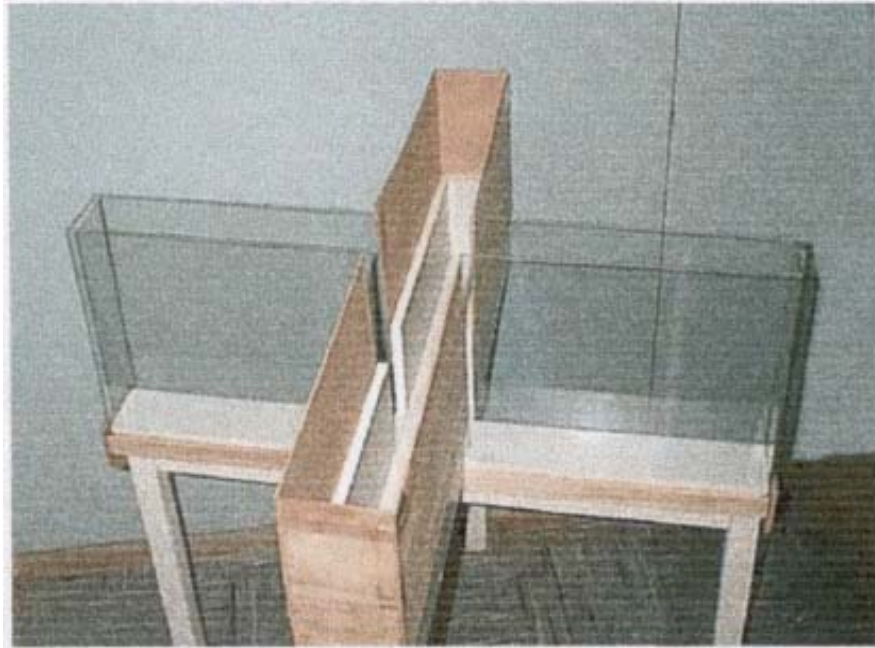


Figura 1. Laberinto en Cruz Elevado

4.2. MÉTODO

Los pollos broiler fueron recibidos de un día de edad, se ubicaron en baterías con calefactores, contando con agua y alimento ad *libitum*.

El día 14. a contar de la llegada de los pollos, se procedió a distribuirlos en los diferentes grupos experimentales, para lo cual se identificó cada ave con un anillo de color distintivo de cada grupo, en cada de sus patas. De esta forma se logró obtener 6 grupos de 15 aves cada uno

A los 15 días de edad de los pollos se comienza la administración diaria de agua destilada, lupanina. o sulfato de esparteína, según el grupo al que corresponda el ave. utilizándose para ello, la vía oral, a través de una sonda intraingluviana, con ayuno previo de aproximadamente 12 horas. Proceso que se efectuó durante 5 días

Seis horas después de la última administración se realiza la primera medición en el laberinto en cruz, (momento 1) para hacerles una segunda y última, a los 24 días de edad (momento 2) con el objeto de observar una recuperación de algún posible efecto de los alcaloides sobre las aves.

Las dosis a administrar fueron calculadas sobre la base de 0.5ml/100g de peso de las aves, considerando que la dosis letal media (DL50) de lupanina para pollos broiler es de 1117 mg/kg de peso corporal (Olivares. 1999), y que la de esparteína es de 391mg/kg de peso corporal, acorde con lo descrito por Valdés, (1997).

Los grupos experimentales sometidos a la prueba de comportamiento del laberinto en cruz se describen a continuación:

Administración de agua, lupanina o esparteína de los grupos experimentales

GRUPOS		ADMINISTRACION				
N°	N° AVES	AGUA DESTILADA (ml)	LUPANINA		ESPARTEINA	
			Fracción DL50	mg/100g	Fracción DL50	mg/100g
1	15	---	---	---	---	---
2	15	0,5	---	---	---	---
3	15	---	---	12,48	---	---
4	15	---	---	---	1/5	7,48
5	15	---	---	---	1/10	3.92
6	15	---	---	---	1/20	1.96

Para llevar a cabo la prueba, cada ave fue puesta en la zona intermedia del laberinto, y observada por un período de 3 minutos, en que acorde a lo planteado por Rivaplamed (1996), fueron medidas las siguientes variables:

- a) Número de entradas en los brazos abiertos.
- b) Tiempo de permanencia en los brazos abiertos.
- c) Número de entradas en los brazos cerrados.
- d) Tiempo de permanencia en los brazos cerrados.
- e) Tiempo de permanencia en la zona intermedia.

Los resultados que se obtuvieron a partir de las variables estudiadas, se expresaron como medias aritméticas \pm el error standard de la media (SEM); estas variables se sometieron a los siguientes análisis estadísticos:

1. Prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov: se utilizó con el objeto de comprobar la normalidad de las variables estudiadas.
2. Prueba no paramétrica Mann Whitney test: para comparar dos grupos, en un mismo momento.
3. Análisis de Varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis: se aplicó para comparar múltiples grupos en un mismo momento.
4. Prueba pareada de Wilcoxon: se usó en la comparación de una variable en dos momentos, para un mismo grupo.

Se utilizó un nivel de significancia de 0,05, siendo significativo un $p < 0,05$ (Naranjo y Bustos. 1992).

El programa computacional usado para la obtención de dichos análisis fue Graph Pad Prism. versión 2.0.

5. RESULTADOS.

El análisis estadístico se inició determinando si los datos provenientes de los grupos experimentales siguen una distribución normal en cuanto a las variables estudiadas, resultando que en su mayoría no pasan esta prueba de normalidad, por lo que se continúa con estadística no paramétrica.

De esta manera, se comparó el grupo control negativo con el grupo control agua, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$), en ninguna de las variables medidas (anexos N° 13, 14 y 15), razón por la cual las posteriores comparaciones intergrupales, se realizaron tomando como grupo de referencia o control, al segundo.

5.1. NUMERO DE ENTRADAS EN LOS BRAZOS ABIERTOS:

El análisis de esta variable (tabla N° 1) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del análisis intergrupar ($p > 0,05$), tanto en las pruebas t Student (anexos N° 13, 16 y 19) como en el Análisis de Varianza (anexo N° 22), para los momentos 1 y 2. Del mismo modo, el análisis intragrupo no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre sus grupos (anexos N° 25, 28, 31 y 34).

TABLA N° 1. Número de entradas en los brazos abiertos de los de los grupos Control Negativo, Control Agua, 1/10 Lupanina, 1/5, 1/10 y 1/20 Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, expresado como promedio y su error típico.

GRUPOS	MOMENTO 1	MOMENTO 2
Control Negativo	0,07 ± 0,07	0,00 ± 0,00
Control Agua	0,27 ± 0,12	0,13 ± 0,09
1/10 Lupanina	0,07 ± 0,07	0,13 + 0,09
1/5 Esparteína	0,20 ± 0,11	0,13 ± 0,09
1/10 Esparteína	0,40 ± 0,1 9	0,33 ± 0,27
1/20 Esparteína	0,33 ± 0,13	0,33 + 0,13

5.2. TIEMPO DE PERMANENCIA EN LOS BRAZOS ABIERTOS:

El análisis de esta variable (tabla N° 2) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del análisis intergrupo ($p > 0.05$), tanto en las pruebas t Student (anexos N° 13, 16 y 19) como en el Análisis de Varianza (anexo N° 22), para los momentos 1 y 2. Del mismo modo, el análisis intragrupo no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre sus grupos (anexos N° 25, 28, 31 y 34).

TABLA N° 2. Tiempo, en minutos, de permanencia en los brazos abiertos de los de los grupos Control Negativo, Control Agua, 1/10 Lupanina, 1/5, 1/10 y 1/20 Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, expresado como promedio y su error típico.

GRUPOS	MOMENTO 1	MOMENTO 2
Control Negativo	0,10±0,10	0,00 ± 0,00
Control Agua	0,14 + 0,08	0,03 ± 0,02
1/10 Lupanina	0,10 ± 0,10	0,04 ± 0,03
1/5 Esparteína	0,19 ± 0,14	0,23 ± 0,16
1/10 Esparteína	0.46 ± 0,23	0,21 ± 0,18
1/20 Esparteína	0,18 ± 0,08	0.48 ± 0,24

5.3. NÚMERO DE ENTRADAS EN LOS BRAZOS CERRADOS:

El análisis de esta variable (tabla N° 3) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del análisis intergrupar ($p > 0.05$). tanto en las pruebas t Student (anexos N° 14, 17 y 20) como en el Análisis de Varianza (anexo N° 23), para los momentos 1 y 2. Del mismo modo, el análisis intragrupo no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre sus grupos (anexos N° 26, 29, 32 y 35).

Cabe destacar, que el grupo de aves dosificadas con 1/10 de la DL50 de Lupanina. tanto en el momento 1 como en el momento 2, no registró entradas a los brazos cerrados del laberinto (anexos N° 5 y 6), sin embargo, las comparaciones que se realizaron entre este grupo y el grupo control agua no mostró diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p > 0.05$) (anexo N° 17). Situación idéntica se apreció al compararlo con el grupo que recibió 1/10 de la DL50 de Esparteína ($p > 0,05$) (anexo N° 20).

TABLA N° 3. Número de entradas en los brazos cerrados de los de los grupos Control Negativo, Control Agua, 1/10 Lupanina, 1/5, 1/10 y 1/20 Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, expresado como promedio y su error típico.

GRUPOS	MOMENTO 1	MOMENTO 2
Control Negativo	0,07 ± 0,07	0,07 ± 0,07
Control Agua	0,07 ± 0,07	0,07 ± 0,07
1/10 Lupanina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1/5 Esparteína	0,07 ± 0,07	0,27 ± 0,27
1/10 Esparteína	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,09
1/20 Esparteína	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07

5.4. TIEMPO DE PERMANENCIA EN LOS BRAZOS CERRADOS:

El análisis de esta variable (tabla N° 4) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del análisis intergrupar ($p > 0,05$), tanto en las pruebas t Student (anexos N° 14, 17 y 20) como en el Análisis de Varianza (anexo N° 23), para los momentos 1 y 2. Del mismo modo, el análisis intragrupo no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre sus grupos (anexos N° 26, 29, 32 y 35).

TABLA N° 4. Tiempo, en minutos, de permanencia en los brazos cerrados de los de los grupos Control Negativo, Control Agua, 1/10 Lupanina, 1/5, 1/10 y 1/20 Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, expresado como promedio y su error típico.

GRUPOS	MOMENTO 1	MOMENTO 2
Control Negativo	0,04 + 0,04	0,19±0,19
Control Agua	0,06 ± 0,06	0,19 + 0,19
1/10 Lupanina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1/5 Esparteína	0,07 ± 0,07	0,06 ± 0,06
1/10 Esparteína	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,18
1/20 Esparteína	0.00 ± 0.00	0,04 ± 0,04

5.5. TIEMPO DE PERMANENCIA EN LA ZONA INTERMEDIA:

El análisis de esta variable (tabla N° 5) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del análisis intergrupar ($p > 0.05$). tanto en las pruebas t Student (anexos N° 15, 18 y 21) como en el Análisis de Varianza (anexo N° 24), para los momentos 1 y 2. Del mismo modo, el análisis intragrupo no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre sus grupos (anexos N° 27, 30, 33 y 36).

TABLA N° 5. Tiempo, en minutos, de permanencia en la zona intermedia de los de los grupos Control Negativo, Control Agua, 1/10 Lupanina, 1/5, 1/10 y 1/20 Esparteína. en los momentos 1 y 2 del experimento, expresado como promedio y su error típico.

GRUPOS	MOMENTO 1	MOMENTO 2
Control Negativo	2,86 ± 0,10	2,80 ± 0,19
Control Agua	2, 80 ± 0,09	2,77 ± 0,20
1/10 Lupanina	2,90 ± 0,10	2,96 ± 0,03
1/5 Esparteína	2,74 ± 0.15	2,71 ± 0,21
1/10 Esparteína	2.56 ± 0,22	2,54 ± 0,24
1/20 Esparteína	2,82 ± 0.08	2,35 ± 0,26

6. DISCUSION

El comportamiento normal de los animales causado por el miedo que sienten hacia los espacios desconocidos, abiertos e intensamente iluminados, representados por los brazos abiertos del laberinto (Dawson y Tricklebank, 1995; Ruarte y Alvarez, 1999), como la protección que les brinda el callejón estrecho formados por las altas paredes de los brazos cerrados (Dawson y Trickebank, 1995), es ingresar mayor cantidad de veces y por más tiempo a estos últimos (Imaizumi y Miyazaki, 1995). Es por esto, que RIVAPLAMED (1998), señala que el laberinto en cruz elevado es uno de los modelos que mejor avalan la relación miedo-ansiedad.

En esta prueba los parámetros correspondientes a los brazos abiertos, tanto la cantidad de entradas, como el tiempo de permanencia en ellos, revela inhibición de la ansiedad (Viola y col., 1994; Imaizumi y Miyazaki, 1995; Thongsaard y col., 1996; Nogueira y col., 1998; RIVAPLAMED, 1998). El número de entradas en los brazos cerrados, en cambio, debe ser solamente considerado como un índice de actividad exploratoria, sin tener relación con la ansiólisis (RIVAPLAMED, 1998).

Se discutirá a continuación, el comportamiento manifestado por las aves, de acuerdo a las variables evaluadas en esta prueba:

6.1. NUMERO DE ENTRADAS Y TIEMPO DE PERMANENCIA EN LOS BRAZOS ABIERTOS

Los animales evitan la zona abierta, ya que esta les provoca una reacción de miedo más fuerte que la zona cerrada (Rodgers y Colé, 1994). Una rata, por ejemplo, explora tanto los brazos abiertos como los cerrados, pero típicamente estará más frecuentemente en estos últimos (Morato y Brandao, 1997).

En el caso de las aves pertenecientes al grupo control negativo, que representan a los individuos que manifestarán un comportamiento normal frente a la prueba, tal como indican Morato y Brandao (1997), ingresan en forma errática tanto a los brazos abiertos como a los cerrados, sin embargo permanecen una gran cantidad del total del tiempo que dura la observación en la zona intermedia; situación similar pudo observarse en los pollos que fueron administrados con el solvente (agua destilada). Lo cual concuerda con lo encontrado por Campillo (1999) quien sometió a esta prueba a pollitas de dos líneas de postura.

Wolfman y col. (1994) y RIVAPLAMED (1998), señalan que los compuestos con acción ansiolítica produce un aumento en el número de entradas a la zona abierta, como así también aumenta el tiempo de permanencia aquí, lo que coincide con lo descrito por Fernández (1997); Kuribara y col. (1998); Schmidt-Mutter y col. (1998); Pain y col. (1999).

En la prueba realizada sobre los pollos se observó un mayor número de entradas y por lo tanto un mayor tiempo de permanencia total en los brazos abiertos, tanto en las aves a las que se administró lupanina, como en los grupos que recibieron esparteína, siendo dicho parámetro levemente superior en estos últimos individuos, comparativamente con las variables que hacen referencia a la zona cerrada. Del mismo modo Campillo (1999) pudo observar esta tendencia en las aves del experimento que llevó a cabo al usar diluciones del alcaloide esparteína.

Basándose en las catas de los autores antes mencionados, podría decirse que esta sutil tendencia es debida a algún efecto anstolítico por parte de los alcaloides usados sobre los pollos, lo que concuerda con Wink (1994), quien señala que esparteína, lupanina e hidroxilupanina tienen propiedades depresoras del sistema nervioso central. Sin embargo, en la presente investigación no existe evidencia estadísticamente significativa que avale dicha observación.

6.2. NUMERO DE ENTRADAS Y TIEMPO DE PERMANENCIA EN LOS BRAZOS CERRADOS

RIVAPLAMED (1998), señala que el número de entradas en la zona cerrada es única y exclusivamente un factor relacionado con la exploración del espacio por parte del animal y es importante que sea registrado, con el objeto de considerar el número total de entradas como un índice de actividad locomotora.

Al hacer una evaluación en forma global de los resultados de esta variable, se puede observar que además de presentarse de manera similar en la gran mayoría de los individuos, es reducida tanto en número de entradas como en tiempo de permanencia, al ser comparadas con las variables de la zona abierta, situación que se manifiesta en forma extrema en el grupo que fue dosificado con 1/10 de la DL50 de Lupanina para pollos broiler, y por último, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que han recibido los alcaloides y los controles.

6.3. TIEMPO DE PERMANENCIA EN LA ZONA INTERMEDIA

Janczak y col. (1999) y RIVAPLAMED (1998), indican que el tiempo que los animales permanecen en la zona intermedia del laberinto, equivale a una medida de tentativas, que puede ser asumido como un proceso relacionado a la decisión de ingreso a una de las dos zonas restantes.

El tiempo que las aves tomaron en esta zona, fue elevado, homogéneo y sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo cual podría deberse a la alta confusión que les produce el ser sacados de su grupo social y ser puestos en un espacio desconocido, que les ofrece puertas de ingreso a diferentes espacios como lo son los brazos del laberinto.

Basado en lo expuesto, se puede determinar que si bien la dosis de lupanina y de esparteína administradas oralmente a los pollos indican tener una leve tendencia hacia un efecto sobre el sistema nervioso central, lo cual concuerda con lo descrito por Olivares (1999) en cuanto a lupanina, indicando que es un alcaloide ligeramente tóxico, por Valdés (1997), quien señala que esparteína es una sustancia moderadamente tóxica y por Pothier y col. (1998), que en la determinación del efecto que producen lupanina, esparteína y extracto de lupino en el sistema nervioso central, concluyen que lupanina y extracto de lupino son menos tóxicos que esparteína, y que en las dosis estudiadas los tres productos tienen un débil efecto sedativo a nivel central, los análisis estadísticos no arrojan diferencias significativas entre los grupos.

Riofrio (1995), estudió el efecto de la incorporación de dos especies de lupinos con diferentes niveles de alcaloides en raciones de pollas durante la recría apreciando al examen histopatológico un mayor efecto tóxico de las variedades amargas encontrando tumefacción y picnosis neuronal en encéfalos pero esto no interfirió con la salud de las aves, concordando con la ausencia de signos clínicos y mortalidad al igual que lo que se presentó en este experimento.

Por su parte, López (1995) indica que al usar lupino amargo en gallinas ponedoras, se produjeron trastornos leves a nivel del cerebro, pero no se apreció signología nerviosa ni alteraciones macroscópicas en dicho órgano en el transcurso de la experiencia (154 días). Dichas alteraciones podrían ser las causantes de los leves efectos depresivos (ansiolíticos) en el sistema nervioso central manifestados por los pollos broiler en este experimento a través de un mayor número de entradas a los brazos abiertos.

Sin embargo en 1982 Ballester y col, en un ensayo en ratas alimentadas por nueve meses con harina de lupino dulce (0,02% alcaloides) encontraron que el cerebro tenía una estructura normal al examen histológico sin apreciarse fenómenos inflamatorios ni alteraciones vasculares y que durante el período no hubo cambios adversos en la apariencia, comportamiento y sobrevivencia de las ratas. Igualmente, en análisis macro y microscópicos de pollos broiler alimentados con lupino que contenía concentraciones de hasta 2,53% de lupanina, Carrillo (1995) no encontró alteraciones significativas que permitan diferenciarlas de las encontradas en el grupo control.

Concordando esto último con los resultados del análisis estadístico en que no existe significancia estadística entre los grupos que indique un cambio en el comportamiento de los individuos en estudio.

Por su parte, Valdés (1997), obtuvo resultados similares a los arrojados en este estudio, al medir efectos de esparteína en el comportamiento de pollos broiler a través de la prueba de campo abierto; al igual que Campillo (1999), al determinar los posibles efectos a nivel central producidos por este alcaloide en pollas de postura tanto en la prueba de campo abierto como en el laberinto en cruz elevado.

Y finalmente Olivares (1999), quien realizó pruebas de comportamiento en pollos broiler en la prueba de campo abierto, para determinar el efecto de lupanina en idéntica dosis a la usada en este experimento, concuerda en que no existen manifestaciones significativas por parte de los grupos ni de las variables en estudio que indiquen efecto de dicho alcaloide sobre el Sistema Nervioso Central de las aves.

7. CONCLUSIONES

Del estudio realizado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- No hubo diferencias estadísticamente significativas en las variables observadas entre el grupo al que se le administró lupanina y el grupo control que sólo recibió agua.

- No se manifestaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de aves que recibieron las diluciones de esparteína y el grupo control agua.

- No se presentó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de aves que recibió 1/10 de lupanina, respecto del que fue administrado con 1/10 de esparteína, a pesar de que el número de entradas y el tiempo de permanencia en la zona abierta del laberinto fue levemente superior en este último grupo experimental.

- Se observó tanto en el grupo que recibió lupanina como en los que recibieron esparteína, un mayor número de entradas y por lo tanto un mayor tiempo de permanencia en la zona abierta, lo cual indicaría la característica depresora del sistema nervioso central por parte de estos alcaloides, sin embargo, esta leve tendencia no alcanza a tener significancia estadística.

- Finalmente, basado en lo expuesto en este trabajo, se puede concluir que ni lupanina, en dosis de 1/10 de la DL50, ni esparteína en dosis de 1/5, 1/10 y 1/20 de la DL50 para pollos broiler, administrados por vía oral, producen cambios en el comportamiento de dichas aves en la prueba de laberinto en cruz elevado.

8. BIBLIOGRAFIA

- AGNESE, A., J. CABRERA. 1997. Alcaloides quinoüidínicos en hojas de *L paraguayensis*. En: Resúmenes II Congreso mundial de plantas aromáticas y medicinales para el bienestar de la humanidad. 10-15 de Noviembre. Mendoza, Argentina.
- AGROANALISIS. 1999. N° 179. (Informe económico) Julio.
- AGUILERA, J.M., A. TRIER. 1978. The revival of lupin. Food Technology. 32: 70-76.
- BALLESTER, D., M. SAITUA, O. BRUNSER, J. EGAÑA, D. OWEN, E. YAÑEZ. 1982. Evaluación toxicológica del lupino dulce, I Estudio en ratas alimentadas durante 9 meses con *Lupinus albus* var *Mulfolupa*. Revista Chilena de Nutrición 10, 2: 177-191.
- BASCUR, G. 1982. Informe sobre la situación actual de las leguminosas alimenticias en Chile. Reunión de Trabajo. Organización de las Naciones Unidas. Chile.
- BOUTHELIER, V., M. J. GUILLEN, M. CASSINELLO, I. RODENAS, J. VILLAVARDE. 1982. Estudio del contenido de esteroides del aceite de semillas de diferentes especies del género Lupino. En: II Conferencia Internacional del Lupino, Torremolinos,. España.
- BURBANO, C.,V. BOUTHELIER, M. MUZQUIZ, L. GIAASER, A. RODRIGUES-MARIN. 1982. *Lupinus angustifolius*, composición de los elementos esenciales en distintas variedades cultivadas y espontáneas de la Península Ibérica. En: II Conferencia Internacional del Lupino, Torremolinos,. España.
- CAMIRUAGA, M. 1986. Contenido energético de alimento para aves. *Inf. Avícolas*. 91: 20-24.
- CAMPILLO, C. 1999. Determinación del efecto de esparteína administrada por vía oral sobre el comportamiento de pollitas de líneas de postura blancas y de color. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CÁRDENAS, B. 1977. El cultivo del lupino en Chile. En: I Reunión de Trabajo, Fundación Chile. Situación, Análisis y Perspectivas del Lupino en Chile. 1 y 2 de Diciembre. Santiago, Chile, pp 27-35.
- CARRILLO, J. 1995. Estudio de la incorporación de semilla de lupino con diferentes porcentajes de alcaloides en la ración de pollos broiler. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CERLETTI, B., M. DURANTI, P. RESTANI. 1982. Chemical, nutritional and functional properties of lupine seed protein. In: Gross, R. and E. Bunting. Agricultura and Nutritional aspect of lupines. Germán Agency for Technical Cooperation Germany.

- CHEEKE, P., L. SHULL. 1985. Natural Toxicants in Feed and Poisonous Plants. AVI Publishing company, INC. Westport, Connecticut.
- CUBILLOS, A. 1977. Empleo de la semilla de lupino en la alimentación aviar. En: I Reunión de Trabajo. Fundación Chile. Situación, Análisis y Perspectivas del Lupino en Chile. 1 y 2 de Diciembre. Santiago, Chile, pp. 57-61.
- CUBILLOS, A., O. CACERES, C. DE VEER, S. MORA, R. MEGE. 1982. Estudio comparativo de tres especies de lupinos dulces (*L. angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus*), en alimentación de broilers. En: II Conferencia Internacional del Lupino, Torremolinos, España, pp. 271-275.
- CULVENOR, C., S. PETERSON. 1986. Lupin toxins alkaloids and phomopsins. Proceedings 4th International Lupin Conference. Geraldton, Australia, pp. 188-198.
- CWOJZINSKI, W., Z. MICHALSKI, K. NOWAK, K. GULEWIECZ. 1989. Studies on the influence of bitter lupine extract on the yield of different cultivated plants. *Lupin Newsletter* 13: 22-28.
- DAVIS, A., D. STOUT. 1986. Anagryne in Western American lupines. *Journal of Range Management*. 39: 1, 29-30.
- DIAZ, Y., S. CORNEJO, E. HAART, A. LÓPEZ, J. POKNIAK, A. SKOKNIC. 1977. Lupino como recurso proteico en nutrición animal. En: I Reunión de Trabajo. Fundación Chile. Situación, Análisis y Perspectivas del Lupino en Chile. 1 y 2 de Diciembre. Santiago, Chile, pp. 53-56.
- DAWSON, G., M. TRICKLEBANK. 1995. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacol. Sci.* 16 pp. 33-36.
- ESPINOZA, F., E. YAÑEZ, O. GARATE. 1984. Conocimiento y realidad del lupino en Chile. FAO-INTA. Santiago, Chile.
- FAO. 1982. Informe sobre la situación actual de las leguminosas alimenticias en Chile. Oficina regional de la FAO para América Latina, División de Protección Vegetal. Santiago.
- FAO. 1994. Anuario de fertilizantes. Vol. 44. Colección FAO, Estadístico N° 126
- FERNANDEZ, E. 1997. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus maze test of anxiety. En: *Behav. Brain Research*. 86, 1: 105-113.
- GALDAMEZ, L. 1973. Valor nutritivo del lupino para pollos broiler. Tesis de magíster en producción avícola. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Santiago, Chile.
- GALDAMEZ, G. R., H. PEÑALOZA. 1995. Enfermedades del lupino en el sur de Chile; mancha café y antracnosis. *Tierra adentro* 2: 32-35.

- GARNER, R.J., D.S. PAPWORTH. 1970. Toxicología Veterinaria. 3^a ed. Acribia, Zaragoza, España.
- GROSS. R. 1982. El cultivo y la utilización del Tarwi (*Lupinus mutabilis*) Sweet. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- GULEWIECZ, K., M. PERETIATKOWIECZ, M. BRATEK-WIEWIOROWSKA, M. WIEWIOROWSKI. 1994. Bitter lupins seeds and straw as raw materials in ecological agricultura. In: Neves-Matins J. And M. Beirao da Costa (Eds.). Advances in lupin research, pp.312-332. ISA Press, Lisboa.
- HANCZAKOWSKI, P. 1982. Nutritive value for chickens of Lupine seed protein supplemented with various sulphur sources in Lupine Animal Nutrition. Proceedings first international lupine workshop. 5: 585-591.
- HILL, G.D. 1982. Nutrición animal en no rumiantes. Boletín informativo de lupino. N° 4.
- IMAIZUMI, M., S. MIYAZAKI. 1995. Assessment of anxiolytics an elevated plus maze test. Nihon-Shinkei-Seishin-Yakurigaku-Zasshi. 15, 2: 125-133.
- JAMBRICA, J. R. 1983. La genética de los alcaloides en el género *Lupinus* Comunicaciones INIA, Producción Vegetal N° 51: 12.
- JANCZAK, A., B. BRAASTAD, M. BAKKEN. 1998. Effects of selection for high litter size on aversion-related behaviour in mice. 11th Nordic International Society for applied Ethology Symposium. January 27-28th. Flåmsslätt, Sweden.
- JURADO, R. 1989. Toxicología Veterinaria. Editorial Salvat, Barcelona, España.
- KAHNT, G., L. A. HIJAZI. 1987. Effect of bitter lupin extract on growth and yield of different crops. J. Agronomy and crop science. 159: 320-328.
- KEELER, R.F. 1989. Quinolizidine alkaloids in range and grain lupin. In: Cheeke, P.R. (ed). Toxicants of Plant Origin. Vol I: Alkaloids. CRC. Press pp. 134-159.
- KURIBARA, H., W. STAVINOHA, Y. MARUYAMA. 1998. Behavioural pharmacological characteristics of honokiol, an anxiolytic agent present in extraes of Magnolia Bark, evaluated by an elevated plus-maze test in mice. J. Pharm. Pharmacol. 50: 819-826.
- LARRAIN, J. L. 1977.. Situación actual y perspectivas de desarrollo del cultivo y aprovechamiento del lupino en Chile. Una evaluación preliminar. En: I Reunión de Trabajo. Fundación Chile. Situación, Análisis y Perspectivas del lupino en Chile. 1 y 2 de Diciembre. Santiago, Chile, pp 7-15.
- LOOMIS, T. 1982. Fundamentos de Toxicología. 3^a ed., Acribia. Zaragoza. España.
- LÓPEZ, F. 1977. Incidencia económica social del cultivo del lupino en la IX Región. En: 1^a Reunión de Trabajo, Fundación Chile. Situación, Análisis y Perspectivas del lupino en Chile. 1 y 2 de Diciembre. Santiago, Chile, pp 17-19.

- LOPEZ, L. 1986. El altramuz. *Investigación y Ciencia*. Abril: 8-15.
- LOPEZ, A. 1987. Efecto de la adición de metionina y virginamicina en raciones que contienen *Lupinus albus* var. Multolupa en alimentación de broilers. Tesis, M:V: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- LOPEZ, J. 1995. Efecto de la incorporación de semilla de lupino amargo en la salud y en la productividad de gallinas ponedoras durante la primera fase de postura. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- LOPEZ-BELLIDO, L.. M. FUENTES. 1986. Lupin crops as an alternative source of protein. *Advances in agronomy*. 40: 239-292.
- MAC AULIFFE, T. 1996. Lupino en la alimentación de monogástricos en Chile. Avances de investigación en Lupino. INIA. Carillanca. Serie Carillanca. 51:18-26.
- MARTÍNEZ, S. 1987. Incorporación de penicilina procaína y metionina en raciones que contienen *Lupinus luteus* en alimentación de broilers. Tesis, M:V:, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- MERCK, 1993. El manual de Merck de Veterinaria 4^a ed., Océano/Centrum. Barcelona. España.
- MORA, S. 1977. Valor adaptativo de cuatro especies de lupino en la provincia de Valdivia. En: 1^a Reunión de Trabajo, Fundación Chile. Situación, Análisis y Perspectivas del lupino en Chile. 1 y 2 de Diciembre. Santiago, Chile, pp. 43-51.
- MORATO, S., M.L. BRANDAO. 1997. Paradoxical increase of exploratory behaviour in the elevated plus maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. *Braz. J. of Medical and Biological Research*. 30, 9: 1113-1120.
- MUZQUIZ, M. 1989. A chemical study of *Lupinus hispaniens* seed-toxic and antinutritional compound. *J. Sci. Food Agrie*. 47: 205-214.
- MUZQUIZ, M., C. BURBANO, M. GOROSPE, I. RODENAS. 1989. A chemical study of *L. hispanicus* seed. II: Toxic and antinutritional components. *J. Sci. Food Agrie*. 47: 205-214.
- MUZQUIZ, M., C. BURBANO, C. CUADRADO y C. DE LA CUADRA. 1993. Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas. I: Alcaloides. *J. Sci. Food Agrie*. 8:3, 351-361.
- NARANJO, C., U. BUSTOS. 1992. Métodos en farmacología clínica. Métodos de ensayos clínicos de medicamentos. Editorial OPS. Washington, U.S.A.
- NOGUEIRA, E., G.J. ROSA, V.S. VASSILIEFF. 1998. Involvement of GABA (A)-benzodiazepine receptor in the anxiolytic effect induced by hexanic fraction of *Rubus brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol*. 61, 2: 119-126.

- OLIVARES, P. 1999. Determinación de la DL50 de Lupanina y estudio del efecto en el comportamiento de dosis simples administradas por vía oral en pollos broiler. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- PAIN, L, P. OBERLING, A. LAUNOY, G, Di SCALA. 1999. Effect of nonsedative doses of propofol on an innate anxiogenic situation in rats. American society of anesthesiology. 90, 1: 191-196.
- PEÑALOZA, E., R. GALDAMEZ, A. AGUILERA. 1995. Cultivar de hoja angosta, nueva variedad de Lupino en el Sur de Chile. *Tierra Adentro*. 1: 23-26.
- PEÑALOZA, H. 1996. El lupino en los sistemas de producción. En: Avances de investigación en Lupino INIA. Carillanca. Serie Carillanca N° 51. pp: 18-26.
- PIZARRO, M.A. 1977. Valor nutritivo de dos especies de Lupino (*Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius*). Prueba de crecimiento y utilización proteica (UPN) en ratas. Tesis, Ing. Agr. Universidad Católica, Facultad de Agronomía (Departamento de Zootecnia), Santiago, Chile.
- POTHIER, J. S. CHEAV, N. GALANO, C. DORMEAU, C. VIEL. 1998. A comparative study of the effects of sparteine, lupanine and lupin extract on the central nervous system of the mouse. J. Pharm. and Pharmacol. 50: 8, 949-954.
- RADELEFF, R.. 1967. Toxicología Veterinaria. Editorial Academia, León, España.
- RIOFRIO, A. 1995. Efecto de incorporación de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* con diferentes niveles de alcaloides en raciones de pollos durante la recría. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- RIVAPLAMED. 1996. I Curso Iberoamericano de Validacao de Plantas Medicináis com actividae sedativa/tranquilizante. Rede Iberoamericana de validacao de Plantas Medicináis. Coimbra, Portugal. 8-19 de Junio de 1996.
- RIVAPLAMED. 1998. I Curso Iberoamericano de Validacao de Plantas Medicináis com Actividade no Sistema Nervoso Central. Rede Iberoamericana de validacao de Plantas Medicináis. Florianópolis, Sta Catarina, Brasil. 6-17 de Octubre de 1997.
- ROBINSON, D. 1962. Leguminosas forrajeras. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- RODGERS, R.. J. COLÉ. 1994. Ethol. Psychopharmacol. pp. 9-44.
- RODRÍGUEZ, V. 1980. Utilización de *Lupinus albus*/avena nuda como principal fuente energética en reemplazo de maíz/afrecho de raps en pollos broiler. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- ROMERO, J.J. 1982. Production and use of lupines en Chile. En: Gross, R. and E.S. Buting. Agricultura and nutritional aspect of lupines. Germán agency for técnica cooperation. Germany.

- RUARTE, M., E. ALVAREZ. 1999. Behavioural Profiles Displayed by Rats in Elevated Asymmetric Plus Maze: effects of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1: 99-106.
- SAITO, K., Y. KOIKE, H. SUZUKI and I. MURAKOSHI. 1993. Biogenetic implication of lupin alkaloid biosynthesis in bitter and sweet forms of *Lupinus luteus* and *L. albus*. *Phytochemistry*. 34:4. 1041-1044.
- SCOTT, M., M. NESHEIM and R.J. JOUNG. 1982. Nutrition of the chicken. 3rd ed., M.L. Scott & Associates. Ithaca. New York.
- SCHMIDT-MUTTER, L., L. PAIN, G. SANDNER, S. GOBAME, M. MAITRE. 1998. The anxiolytic effect of GHB in the elevated plus maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil. *European Journal of Pharmacology*. 342, 1: 21-27.
- STEINEGGER, E. 1992. Pharmakognosie. 5. Aufl., Springer. Berlin.
- SWAN, A. 1967. An introduction to the alkaloids. Ed. John Wiley and Sons Inc. New York.
- TARTAKOWSKI, O., P. SCHULTZ. 1977. Tabla de composición de alimentos AVICOSAN. Sogaf. Santiago, Chile.
- THONGSAARD, W., C. DECHAPANUYA, S. PONGSAKORN, E.A. BOYD, G.W. BENNETT, C.A. MARDSEN. 1996. Bakarol: a potential anxiolytic extracted from *Cassia sennam*. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 53: 3, 753-758.
- TIRADO-SERRANO, J. 1971. La harina de semilla de altramuces dulce (*Lupinus luteus* var. Weico) en alimentación aviar. *Arch. Zootec.* 20: 121-153.
- TYSKI, S., M. MARKIEWICZ, K. GULEWICZ, T. TWARDOWSKI. 1988. The effect of lupin alkaloids and ethanol extracts from seeds of *Lupinus angustifolius* on selected bacterial strain. *J. of plant physiology*. 133:2. 240-242.
- UNKOVICH, M. J., J. S. PATE, J. HAMBLIN. 1994. The nitrogen economy of broadacre lupin in South West Australia. *Aust. J. Agric. Research* 45: 149-164.
- VALDES, H. 1997. Determinación de la DL50 de esparteína y estudio de su efecto en el comportamiento, al incorporarla a la dieta de pollos broiler. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- VIOLA, H., C. WOLFMAN, M. LEVI de STEIN, C. WASOWSKI, C. PEÑA, J. MEDINA A. PALADINI. 1994. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligand from *Tilia tomentosa* (777/aceae). *J. Ethnopharmacol.* 44: 47-53.
- VOGT, H., S. HARNISCH, R. KRIEG. 1982. Sweet lupines in poultry rations. *Lupine Animal Nutrition. Proceedings first international lupine workshop*. 5: 593-601.

- von BAER, D., L. LAMPERTIU. E. ROSS, P. PUENTES, E. von BAER, D. VATH and U. WEISSMANN. 1990. Potential of *L. mutabilis* in comparison with *L. albus*. Results of the season 1989/90 in the south of Chile. 6th Int. Lupin Conference. Pucón, Chile. Abstract 3.
- von BAER, D. y I. PEREZ. 1991. Quality standard propositions for commercial grain of white lupin (*Lupinu albus*). In: von Baer, D. (ed). Proceedings of the 6th International Lupin Conference, Asociación Chilena del Lupino, pp. 158-167.
- von BAER, D., L. LAMPERTI. M. MORALES. E. ROSS. P.. PUENTES, I. PEREZ. E. von BAER, U. HASHAGEN, R. IBAÑEZ. 1992. Proyecto FDP- CORFO: Normas de calidad de lupino: Resultados de Cosechas 1989, 1990, 1991 y conclusiones finales. En: Bioley, E. y V. Herbach (ed). Proceedings 1^a Conferencia Nacional del Lupino, Instituto de Agroindustria, Universidad de la Frontera, pp. 65-75.
- von BAER, E., R. IBAÑEZ. 1979. Variabilidad de proteína, usina, aceite y alcaloides en *L. albus* y *L. mutabilis*. III Reunión de Lupino. Fundación Chile. Valdivia, Chile.
- von BAER, E. 1986. El cultivo del lupino. *El Campesino CXCII* 6: 21-30.
- von BAER, E. 1993. Manejo del cultivo. Lupino: una alternativa de progreso. Temuco. Chile.
- von BAER, E. 1996. Avances en fitomejoramiento del lupino. Avances de investigación en lupino. Serie Carillanca. 51: 1-8.
- WINK, M. 1994. Biological activity and potential application of lupin alkaloids. in: Neves-Matins J. And M. Beirao da Costa (Eds.). Advances in lupin research, pp. 161-178. ISA Press. Lisboa.
- WOLFMAN. C., H. VIOLA. A. PALADÍNI. F. DAJAS. J. MEDINA. 1994. Possible anxiolytic effects of chrysin; a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. *Pharmacol-Biochem-Behav.* Jan: -47(1): 1.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Resultados del grupo Control Negativo en el momento 1.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br.cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	1	1.48	0	0	1.516
5	0	0	0	0	3
6	0	0	1	0.55	2.45
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	3
14	0	0	0	0	3
15	0	0	0	0	3

ANEXO 2. Resultados del grupo Control Negativo en el momento 2.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br.cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	3
5	0	0	1	2.916	0.083
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	3
14	0	0	0	0	3
15	0	0	0	0	3

ANEXO 3, Resultados del grupo Control Agua en el momento 1.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br.cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	1	0.6	0	0	2.4
4	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	1	0.066	0	0	2.93
8	1	1.033	0	0	1.96
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	0	0	1	0.916	2.083
13	0	0	0	0	3
14	1	0.4	0	0	2.6
15	0	0	0	0	3

ANEXO 4. Resultados del grupo Control Agua en el momento 2.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br.cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	1	0.3	0	0	2.7
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	3
14	0	0	1	2.966	0.033
15	1	0.166	0	0	2.833

ANEXO 5. Resultados del grupo 1/10 de Lupanina en el momento 1.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br.cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	1	1.5	0	0	1.5
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	3
14	0	0	0	0	3
15	0	0	0	0	3

ANEXO 6. Resultados del grupo 1/10 de Lupanina en el momento 2.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br.cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	1	0.083	0	0	2.916
3	0	0	0	0	3
4	1	0.483	0	0	2.516
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	3
14	0	0	0	0	3
15	0	0	0	0	3

ANEXO 7. Resultados del grupo 1/5 de Esparteína en el momento 1.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br. cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	1	0,05	1	1.083	1.866
13	0	0	0	0	3
14	1	0.8	0	0	2.2
15	1	1.966	0	0	1.033

ANEXO 8. Resultados del grupo 1/5 de Esparteína en el momento 2.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br.cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	1	1.316	0	0	1.683
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	3
14	1	2.1	4	0.866	0.033
15	0	0	0	0	3

ANEXO 9. Resultados del grupo 1/10 de Esparteína en el momento 1.

Ave N°	N°entr.br.abjer.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br. ce rr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	2	2.96	0	0	0.33
9	0	0	0	0	3
10	2	2.066	0	0	0.93
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	1	0.916	0	0	2.083
14	1	0.933	0	0	2.066
15	0	0	0	0	3

ANEXO 10. Resultados del grupo 1/10 de Esparteína en el momento 2.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br. cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	3
5	1	0.483	0	0	2.516
6	4	2.66	0	0	0.333
7	0	0	1	1.5	1.5
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	0	0	1	2.283	0.716
13	0	0	0	0	3
14	0	0	0	0	3
15	0	0	0	0	3

ANEXO 11. Resultados del grupo 1/20 de Esparteína en el momento 1.

Ave N°	N°entr.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br. cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	3
3	1	1	0	0	2
4	1	0.5	0	0	2.5
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	3
7	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	1	0.716	0	0	2.283
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	1	0.183	0	0	2.816
14	0	0	0	0	3
15	1	0.35	0	0	2.65

ANEXO 12. Resultados del grupo 1/20 de Esparteína en el momento 2.

AveN°	N°enir.br.abier.	Tpo.br.abier. (min.)	N°entr.br.cerr.	Tpo.br. cerr. (min.)	Tpo.Z.interm. (min.)
1	0	0	0	0	3
2	1	0.033	0	0	2.96
3	1	0.583	0	0	1.416
4	0	0	1	0.533	1.466
5	1	2.516	0	0	0.483
6	1	1.333	0	0	1.66
7	1	2.7	0	0	0.3
8	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	3
14	0	0	0	0	3
15	0	0	0	0	3

ANEXO 13. Valor de p en una prueba t Student de los grupos control negativo y control agua, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. ABIERTOS		TIEMPO BR. ABIERTOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Negativo	0,34	0,54	0,43	0,56
C. Agua				

ANEXO 14. Valor de p en una prueba t Student de los grupos control negativo y control agua, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. CERRADOS		TIEMPO BR. CERRADOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Negativo	0,98	0,98	1	1
C. Agua				

ANEXO 15. Valor de p en una prueba t Student de los grupos control negativo y control agua, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test		
GRUPOS	TIEMPO ZONA	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Negativo	0,39	0,54
C. Agua		

ANEXO 16. Valor de p en una prueba t Student de los grupos control agua y 1/10 de Lupanina, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. ABIERTOS		TIEMPO BR. ABIERTOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Agua 1/10 Lupanina	0,33	0,98	0,43	0,98

ANEXO 17. Valor de p en una prueba t Student de los grupos control agua y 1/10 de Lupanina, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. CERRADOS		TIEMPO BR. CERRADOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Agua 1/10 Lupanina	0,76	0,76	0,77	0,74

ANEXO 18. Valor de p en una prueba t Student de los grupos control negativo y control agua, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test		
GRUPOS	TIEMPO ZONA	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Agua 1/10 Lupanina	0,29	0,72

ANEXO 19. Valor de p en una prueba t Student de los grupos 1/10 de Lupanina y 1/10 de Esparteína, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. ABIERTOS		TIEMPO BR. ABIERTOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
1/10 Lupanina 1/10 Esparteína	0,32	0,98	0,37	0,93

ANEXO 20. Valor de p en una prueba t Student de los grupos 1/10 de Lupanina y 1/10 de Esparteína, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. CERRADOS		TIEMPO BR. CERRADOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
1/10 Lupanina 1/10 Esparteína	0,98	0,54	0,98	0,51

ANEXO 21. Valor de p en una prueba t Student de los grupos 1/10 de Lupanina y 1/10 de Esparteína, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Mann Whitney test		
GRUPOS	TIEMPO ZONA INTERMEDIA	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2
1/10 Lupanina 1/10 Esparteína	0,34	0,43

ANEXO 22. Valor de p en el Análisis de Varianza de los grupos control agua, 1/5, 1/10 y 1/20 de Esparteína, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Kruskal-Wallis test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. ABIERTOS		TIEMPO BR. ABIERTOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Agua 1/5 Esparteína 1/10 Esparteína 1/20 Esparteína	0,76	0,43	0,91	0,93

ANEXO 23. Valor de p en el Análisis de Varianza de los grupos control agua, 1/5, 1/10 y 1/20 de Esparteína, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Kruskal-Wallis test				
GRUPOS	ENTRADAS BR. CERRADOS		TIEMPO BR. CERRADOS	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Agua 1/5 Esparteína 1/10 Esparteína 1/20 Esparteína	0,86	0,95	0,86	0,51

ANEXO 24. Valor de p en el Análisis de Varianza de los grupos control agua, 1/5, 1/10 y 1/20 de Esparteína, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia, en los momentos 1 y 2 del experimento.

Kruskal-Wallis test		
GRUPOS	TIEMPO ZONA INTERMEDIA	
	MOMENTO 1	MOMENTO 2
C. Agua 1/5 Esparteína 1/10 Esparteína 1/20 Esparteína	0,94	0,5

ANEXO 25. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/10 de Lupanina, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon test		
GRUPOS	ENTR. BR. ABIERTOS	TPO. BR. ABIERTOS
1/10 Lupanina Mom. 1	0,75	1,25
1/10 Lupanina Mom. 2		

ANEXO 26. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/10 de Lupanina, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon test		
GRUPOS	ENTR. BR. CERRADOS	TPO. BR. CERRADOS
1/10 Lupanina Mom. 1	0,98	0,98
1/10 Lupanina Mom. 2		

ANEXO 27. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/10 de Lupanina, en los momentos 1 y 2 del experimento, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia.

Wilcoxon test	
GRUPOS	TPO. ZONA INTERMEDIA
1/10 Lupanina Mom. 1	1,25
1/10 Lupanina Mom. 2	

ANEXO 28. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/5 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon Test		
GRUPOS	ENTR. BR. ABIERTOS	TPO. BR. ABIERTOS
1/5 Esparteína Mom. 1	0,75	1,12
1/5 Esparteína Mom. 2		

ANEXO 29. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/5 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon test		
GRUPOS	ENTR. BR. CERRADOS	TPO. BR. CERRADOS
1/5 Esparteína Mom. 1	1	1
1/5 Esparteína Mom. 2		

ANEXO 30. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/5 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia.

Wilcoxon test	
GRUPOS	TPO. ZONA INTERMEDIA
1/5 Esparteína Mom. 1	0,87
1/5 Esparteína Mom. 2	

ANEXO 31. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/10 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon test		
GRUPOS	ENTR. BR. ABIERTOS	TPO. BR. ABIERTOS
1/10 Esparteína Mom. 1	0,68	0,43
1/10 Esparteína Mom. 2		

ANEXO 32. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/10 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon test		
GRUPOS	ENTR. BR. CERRADOS	TPO. BR. CERRADOS
1/10 Esparteína Mom. 1	0,5	0,5
1/10 Esparteína Mom. 2		

ANEXO 33. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/10 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia.

Wilcoxon test	
GRUPOS	TPO. ZONA INTERMEDIA
1/10 Esparteína Mom. 1	1,05
1/10 Esparteína Mom. 2	

ANEXO 34. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/20 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos abiertos y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon test		
GRUPOS	ENTR. BR. ABIERTOS	TPO. BR. ABIERTOS
1/20 Esparteína Mom. 1	1,05	0,82
1/20 Esparteína Mom. 2		

ANEXO 35. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/20 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para las variables número de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en ellos.

Wilcoxon test		
GRUPOS	ENTR. BR. CERRADOS	TPO. BR. CERRADOS
1/20 Esparteína Mom. 1	1	1
1/20 Esparteína Mom. 2		

ANEXO 36. Valor de p en la prueba pareada de Wilcoxon del grupo 1/20 de Esparteína, en los momentos 1 y 2 del experimento, para la variable tiempo de permanencia en la zona intermedia.

Wilcoxon test	
GRUPOS	TPO. ZONA INTERMEDIA
1/20 Esparteína Mom. 1	0.16
1/20 Esparteína Mom. 2	

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo y muy especialmente a:

- Dr. Frédérick Ahumada M., por su grata disposición a solucionar los más diversos problemas presentados en esta investigación.
- Dra. Aída Cubillos G., por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.
- Dra. Paula Gádicke, por su apoyo y consejos.
- Dr. Gastón Valenzuela, por su pronta y desinteresada colaboración.
- Luis Améstica, por su valiosa ayuda.
- Mis padres y amigos, por su constante y necesario apoyo.