

86  
2 Ems.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO DE CANAVANINA PRESENTE EN  
CACAHUANANO (GLIRICIDIA SEPIUM)**



EXCMOS. PROPECIOLES  
FAC. DE QUIMICA

**(TESIS)**

**MARIA GILDA RAMIREZ SCHUETZ**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION .....	1
1.- GENERALIDADES.	
1.1 LEGUMINOSAS .....	3
1.2 GLIRICIDIA SEPIUM.	
1.2.1 Características botánicas .....	4
1.2.2 Ecología y distribución .....	8
1.2.3 Nombres comunes .....	8
1.2.4 Usos .....	9
1.2.5 Composición química .....	10
1.3 AMINOACIDOS RAROS .....	11
1.4 CANAVANINA.	
1.4.1 Fórmula y generalidades .....	12
1.4.2 Historia .....	13
1.4.3 Propiedades físicas y químicas .....	14
1.4.4 Acción bioquímica .....	16
2.- PARTE EXPERIMENTAL.	
2.1 DIAGRAMA DE TRABAJO .....	19
2.2 DETECCIÓN Y DETERMINACION COLORIMETRICA DE CA- NAVANINA .....	20
2.3 OBTENCION DE CANAVANINA .....	22
2.4 PRUEBAS TOXICOLOGICAS A LA CANAVANINA AISLADA	
2.4.1 Toxicidad aguda. DL50 .....	25

	PAGINA
2.4.2 Determinación de actividad antibiótica	28
2.4.3 Citotoxicidad .....	31
3.- RESULTADOS Y DISCUSION.	
3.1 DETECCION Y DETERMINACION COLORIMETRICA DE CANAVANINA .....	34
3.2 OBTENCION DE CANAVANINA .....	34
3.3 PRUEBAS TOXICOLOGICAS A LA CANAVANINA AISLADA	
3.3.1 Toxicidad aguda. DL50 .....	38
3.3.2 Determinación de actividad antibiótica	43
3.3.3 Citotoxicidad .....	43
4.- CONCLUSIONES .....	47
5.- BIBLIOGRAFIA .....	48

## I N T R O D U C C I O N

Cada vez adquiere mayor importancia el problema de la desnutrición debido principalmente a la crisis económica que afecta a la mayor parte de los países, sobre todo a los países pobres. Esto ha llevado a realizar investigaciones tendientes a buscar nuevas fuentes de alimentos, los cuales sean de buena calidad nutricional, para que, dentro de lo que cabe, sustituir alimentos como la carne, huevos, leche, etcétera, que son de excelente calidad nutricional pero de un elevado costo. Estas investigaciones se han enfocado al estudio de vegetales que pueden ser una fuente protefca. En el caso particular del proyecto: "Investigación química de nuevas fuentes de alimentos". del que forma parte el presente estudio, las investigaciones se han enfocado al estudio de las leguminosas.

Las leguminosas silvestres son muy abundantes en México y podrían ser utilizadas tanto para alimentación animal como humana. Sin embargo, las leguminosas contienen factores tóxicos y antinutricionales como: glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina, hemaglutininas, saponinas, alcaloides, factores antivitaminicos, factores que producen flatulencia, taninos, compuestos polifenólicos y aminoácidos no proteficos. La mayoría de éstos - han sido estudiados en el proyecto mencionado anteriormente, el presente trabajo se enfoca a uno de éstos factores: aminoácidos no proteficos, especialmente canavanina que se encuentra en la semilla del cacahuanano (*Gliciridia sepium*).

En un trabajo anterior del mismo proyecto, al analizar la semilla de cacahuanano, se encontró que ésta poseía una fuerte toxicidad al administrarse a ratones y se pensó que se podía deber al alto contenido de canavanina en la semilla. En este trabajo se trata de comprobarlo. Teniendo como objetivo el implantar un método para aislar la canavanina de la semilla, debido a que en estudios previos se encontró que éste aminoácido está presente en el cacahuanano en concentraciones superiores al "Jack bean" (*Canavalia ensiformes*), que ha sido hasta ahora la semilla de la que generalmente se extrae éste aminoácido. Además investigaciones recientes muestran que la canavanina, por ser un análogo estructural de arginina, posee acción bioquímica muy importante.

## 1.- G E N E R A L I D A D E S

### 1.1 LEGUMINOSAS.

Las leguminosas pertenecen a la familia leguminosae, que está compuesta de 600 géneros y 1300 especies y en orden de importancia ocupa el segundo lugar entre la familia de plantas provistas de semillas.

La historia de las leguminosas como planta cultivada se remonta a miles de años, investigaciones arqueológicas realizadas recientemente han demostrado que el cultivo de éstas data de unos 8000 años aproximadamente.

Su cultivo se extiende en todo el mundo ya que pueden ser cultivadas tanto en el trópico como en zonas templadas. Las leguminosas son muy importantes en la rotación de cultivos por ser fijadoras de nitrógeno, con lo que enriquecen el suelo.

Por su alto contenido de proteínas (17-25% en base seca), se consideran un alimento importante para el consumo humano, ya que no solo es importante por su gran cantidad de proteínas, sino por la calidad de éstas, que aunque no se pueden comparar con las proteínas animales, por no tener todos los aminoácidos esenciales en cantidades importantes puede emplearse para suplementación con un cereal. Además son buena fuente de carbohidratos asimilables, vitaminas y minerales.

Sin embargo, las leguminosas contienen factores tóxicos y antinutricionales que pueden limitar su consumo, aunque éste no -

debe considerarse como desventaja, ya que un cocimiento y técnicas de procesamiento adecuadas son suficientes para eliminar casi totalmente los factores termolábiles como: inhibidores de proteasas, hemaglutininas, componentes antivitaminicos y componentes que se unen a metales. Pero también contienen factores estables al calor como; glucósidos cianogénicos, alcaloides y algunos aminoácidos raros como la canavanina, de la que se hablará más adelante.

La leguminosa estudiada en el presente trabajo es el cacahuanano (*Gliricidia sepium*).

## 1.2 GLIRICIDIA SEPIUM.

### 1.2.1 Características Botánicas.

Pertenece a la familia Leguminosae y subfamilia Favoide. Es un árbol hasta de 15 m, de madera dura y resistente a la humedad, la veta es irregular y dura para trabajarla, pero la madera del corazón da un buen acabado en artículos de artesanía. (30) (40) (41)

#### Corteza:

La corteza externa es escamosa, ligeramente fisurada, de pardo amarillenta a pardo grisácea, con protuberancias blancas. La corteza interna es de color crema amarillento, fibrosa. (30) (41)

**Hojas:**

Yemas alargadas de 3-5 mm., desnudas, con abundantes pelos sedosos simples. Estipula intrapeciolar pubescente. Hojas dispuestas en espiral, imparipinadas, de 12-24 cm. de largo incluyendo el peciolo, compuesto por 2-9 pares de folíolos opuestos de 2 por 1 cm. a 8 por 4.5 cm., ovados a elípticos, con el margen entero, ápice obtuso o agudo, base aguda o cortamente a tenuada que es ligeramente asimétrica y revoluta, verde oscura y brillante en el haz, verde grisáceo en el envés, con algunos pelos simples en ambas superficies especialmente a lo largo de las nervaduras. Las hojas se pierden en la época de floración, que es de diciembre a abril. (27) (29) (41). El dibujo de las hojas se muestra en la figura 1.1.

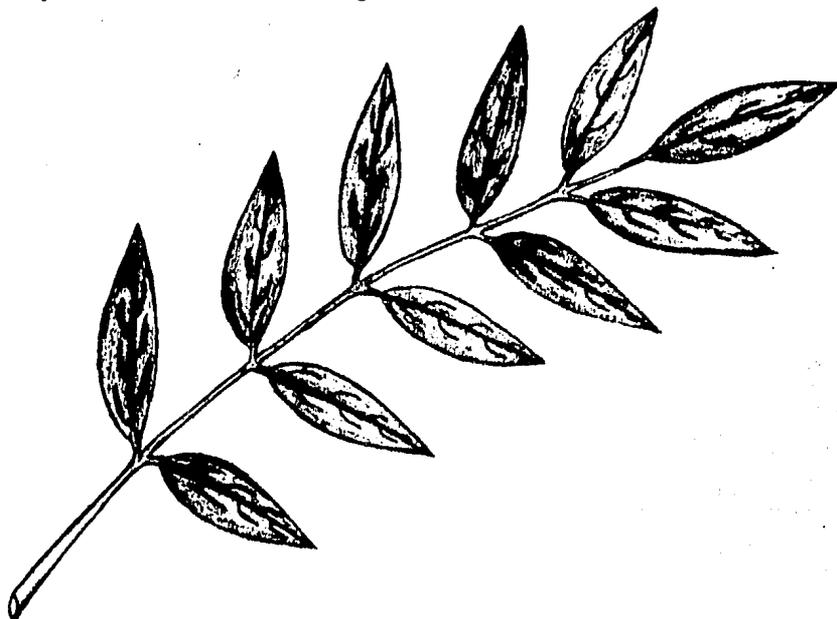


Figura 1.1 Hojas de cacaahuanano (*Gliricidia sepium*)

**Flores:**

Se presentan en racimos de 10-15 cm. de largo, dispersos, - situados en las axilas de las hojas caídas, pedúnculos de 5-10 cm. de largo, flores papilionadas, de 2-2.5 cm. de largo, cáliz copular ligeramente hinchado en la cara superior y atenuado en la base, margen truncado y muy ligeramente dentado, escasamente pubescente, carola glabra, estandarte de color lila con una mancha amarillenta en el centro de la cara interna y ligeramente más pálido y amarillento en la cara externa, de 1.8-2 cm. de largo, redondeado, ápice amarginado erecto o ligeramente reflej<sub>ó</sub>, con dos protuberancias en la superficie interna cerca de la base, alas de color lila en ambas superficies de 2-2.5 cm. de largo, anchamente lineares, hasta ligeramente estipuladas, -ápice obtuso, quilla de color blanco y lila en su borde cerca



Figura 1.2 Flores de cacaahuanano (*Gliricidia sepium*)

de 2 cm. de largo, compuesta de 2 pétalos parcialmente fusionados cerca del ápice, posee 10 estambres, 9 unidades cerca del ápice, la porción libre de los filamentos fuertemente recorvada, el décimo estambre (superior) libre, filamentos blancos, antenas amarillas, el color de las flores varía desde tonos muy oscuros, hasta muy pálidos. Florece de diciembre a abril. (29)  
(41) Ver figura 1.2

Frutos:

Vainas dehicentes, aplanadas, de 15-20 cm. de largo y de 2-3 cm. de ancho, agudas, péndulas, con una fina nervación, verde amarillentas o verde limón, conteniendo de 4-10 semillas casi redondas, aplanadas, de 1-1.4 cm. de diámetro, morenas y brillantes. Los frutos maduran de febrero o marzo a junio o julio. (29)  
(41) Ver figura 1.3.

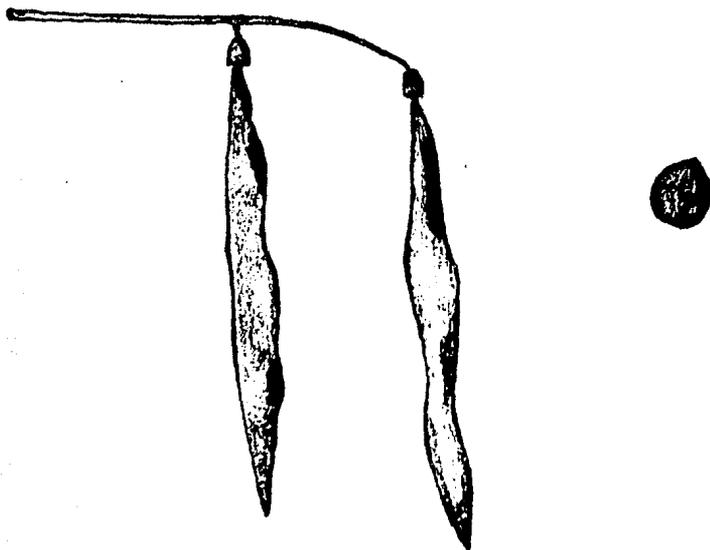


Figura 1.3

Vaina y semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*)

### 1.2.2 Ecología y distribución.

Se desconoce el área original en la cual se distribuyó esta especie. En la actualidad se encuentra distribuída en las vertientes del Golfo, desde Tamaulipas y San Luis Potosí, norte de Puebla y Veracruz, hasta la península de Yucatán y desde Sinaloa hasta Chiapas en la vertiente del Pacífico. Esta planta es conocida en Colombia, Venazuela y las Guyanas, también se le ha plantado en el sur de Florida y en Sudamérica hasta Brasil. También se ha introducido en los trópicos de Africa y Asia Meridional. Se puede encontrar algunos árboles silvestres formando parte de selvas medianas perennifolias y con vegetación secundaria, desde el nivel del mar hasta altitudes de 600 700 m. Crece de la misma manera en suelos derivados de material calcáreo, ígneo o volcánico, siempre y cuando no existan deficiencias de drenaje. (40) (41)

### 1.2.3 Nombres comunes.

El nombre más común es cacahuanano, que proviene del nahuatl cacahuanantl, que se traduce como madre de cacao, es llamado así en Sinaloa, Nayarit, Michoacan, Guerrero y Oaxaca, también se le conoce en esta región como cacahuananche; cocuite (en el norte de Puebla, Veracruz, norte de Oaxaca); cocoite (Pichucalco Chiapas); cocuitle (región del Tajín, Veracruz); cocomuite; cuchunuc (lengua zoque, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas); chanté (Chiapas); frijolillo (Temascaltepec, México); guieniiza (lengua zapoteca, Oaxaca); lipa-ca-sui-la (lengua chontal, Oaxaca);

hipa-ca-ujcum (tzeltal, Chiapas); madre de cacao (Quintana Roo, Jalisco y Chiapas); mata ratón (Chiapas, Panamá y Colombia); -muites; m<sub>u</sub>iti (región del Tajín Veracruz); sayab (Yucatán); sa<sub>u</sub>yaniab (Yucatán); xabyaab (maya Yucatán);sakyab (Yucatán); tun<sub>u</sub>duti (lengua mixteca, Oaxaca); ujcum (lengua tzeltal, el Real Chiapas); xab-yaab (lengua maya, Yucatán); yaga-le (lengua zapoteca, Oaxaca); yaité (Soconusco, Chiapas); mata rata (Gerre-ro); jelelelte (lengua huasteca, sureste de San Luis Potosí);-flor de San José (sureste de San Luis Potosí); lengua de perico (Veracruz); palo de corral (sureste de San Luis Potosí); --primavera (Hidalgo y San Luis Potosí); sangre de dragón (Costa Rica); madera negra (Costa Rica, Panamá, y Nicaragua); bien -vestida (Peñón Florido, Cuba). (27) (28) (29) (30) (40) (41)

#### 1.2.4. Usos.

Los árboles se han utilizado grandemente como cercas vivas de terrenos agrícolas ganaderos de zonas tropicales, en gran parte por su facilidad de regenerarse a partir de estacas. Mucho se le ha utilizado como sombra de plantas de cacao, de don<sub>u</sub>de proviene el nombre de madre de cacao. Los nativos utilizan la madera para construir casas y chozas por su resistencia a -prodrirse por la humedad. El ganado puede comer las hojas sin peligro, pero hay partes de la planta venenosas para ratas, ra<sub>u</sub>tones y otros roedores. (30) (40) (41)

Las hojas molidas y mezcladas con masa de maíz, queso, etcé<sub>u</sub>tera, se usa para matar ratones, perros y otros animales. Los brotes tiernos y las flores son comestibles. Los indígenas uti<sub>u</sub>

lizan las hojas para curar el espanto, pasándolas repetidas veces por el cuerpo de la persona "espantada", rezando sus oraciones al mismo tiempo. En Acaponeta, Nayarit, se dan baños con el cocimiento de las hojas contra el paludismo (29) (30)

#### 1.2.5 Composición química.

El análisis bromatológico (g/100 g. de muestra), se muestra en el siguiente cuadro.(7)

Cuadro 1.1 Análisis bromatológico (g/100 g. de muestra)

Determinación	Muestra cruda	Muestra cocida
Humedad	7.04	4.39
Cenizas	4.18	4.53
Proteínas	42.78	41.83
Grasa cruda	24.52	29.46
Fibra cruda	6.73	10.72
Carbohidratos	21.79	13.46

Se puede apreciar el alto contenido de proteínas que posee esta leguminosa, también el contenido de grasa es alto, además contiene en gran cantidad un aminoácido raro llamado canavanina, cuya obtención a partir de la muestra desengrasada de cacahuanao, es el objetivo principal del presente trabajo.

### 1.3 AMINOACIDOS RAROS.

Además de los ya conocidos aminoácidos esenciales y no esenciales, existen una gran cantidad de aminoácidos no proteícos, de los cuales no se sabe perfectamente el papel que desempeñan. En las leguminosas se han aislado por encima de 200 aminoácidos no proteícos. (31)

Los aminoácidos raros se dividen en; los que son análogos químicos de los aminoácidos comunes, y los que no son análogos. Los aminoácidos análogos se pueden formar por la modificación de los aminoácidos comunes o por cambios en la ruta biosintética normal, al sintetizarse aminoácidos comunes.

Algunos de éstos aminoácidos son tóxicos o fisiológicamente activos en organismos que no los sintetizan, en éstos se incluyen bacterias, hongos, insectos y en algunas especies de plantas.

Existen ciertas evidencias que muestran que estos compuestos tienen el poder de proteger la especie de los vertebrados y de la predación de los insectos, también se descubrió que los aminoácidos no proteícos pueden ser tóxicos a otras especies de plantas que no lo sintetizan. Los aminoácidos no proteícos producidos en algunas plantas confieren un avance en la evolución al inhibir la germinación y el crecimiento de especies en competencia. (31)

La toxicidad de los aminoácidos no proteícos, está en relación con la habilidad particular para competir con otros aminoácidos proteícos o con otras vías biosintéticas, que involu -

cran a los aminoácidos proteícos. También esta toxicidad está en relación a la cantidad que puede ser tolerada al incorporarse a la proteína, antes de que el mal funcionamiento llegue a ser letal para el organismo.

Los aminoácidos no proteícos en ocasiones aparecen como aminoácidos constantes de una especie y se encuentran en mayor proporción que otros que también están presente en la semilla (este es el caso de *Gliricidia sepium*, que contiene una gran cantidad de aminoácido raro canavanina). Esta alta concentración puede indicar que se ocupa como un material de reserva para el desarrollo del embrión. El nitrógeno no proteíco es importante como producto de almacén en la semilla y los aminoácidos raros pueden ser precursores de metabolitos. (16)

#### 1.4 CANAVANINA.

##### 1.4.1. Fórmula y generalidades.

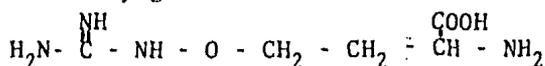


Figura 1.4 Fórmula química de canavanina.

La canavanina (ácido  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -guanidoxi-butírico), es un aminoácido básico análogo de arginina aislado de *Canavalia ensiformes* (Jack bean) por Kitagawa y Tomiyama. La semilla contiene del 2-5 % en peso, (en la semilla de cacahuanano se obtuvo una concentración del 10% de canavanina en una muestra desengrasada) También se encuentra en menores cantidades en *Canavalia lincota*

y en *Canavalia obtusifolia*. (12) (21) (22) (23)

La canavanina se encuentra principalmente en la familia de las leguminosas, subfamilia Papilionoidae. Está ampliamente distribuída ya que se encuentra en un 60% de las 540 especies y en un 35% de los 150 géneros. (52)

#### 1.4.2. Historia.

En 1929 Kitagawa descubre un aminoácido desconcido hasta la fecha, extrayendo de ureasa de la semilla de Jack bean, en el estudio del mecanismo de formación de urea en higado de cerdo. (23)

Kitagawa reportó que este nuevo aminoácido, al tratarse enzimáticamente con arginasa da un segundo aminoácido, canalina. (21)

Kitagawa realiza la primera síntesis de este aminoácido mediante un método enzimático, muy tedioso y poco práctico, sin embargo fué el comienzo del estudio para conocer la estructura de este interesante aminoácido. Kitagawa establece la relación entre L-canalina y el ácido L-  $\alpha$ -amino-  $\gamma$ -hidroxibutírico, mostrando que uno puede ser el producto de hidrogenación del otro. La síntesis empieza con el ácido  $\alpha$ -amino-  $\gamma$ -hidroxibutírico, en una sucesión de 5 pasos de reacción en secuencia. (22)

Borek y Clarke, intentaron varios métodos de síntesis, sin embargo no fueron capaces de preparar canalina, solamente prepararon varios compuestos aminoxi.

Nyberg y Christensen en 1956, realizaron la síntesis de ca-

navanina partiendo de  $\gamma$ -butirolactona la cual broman y obtienen  $\alpha$ -bromo- $\delta$ -butirolactona con un rendimiento del 89%, a esta lactona la tratan con amoniaco al 28% y obtienen  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona hidrobromada con un rendimiento del 68%. - Nyberg y Christensen consiguen pasar de canalina a canavanina en un solo paso. (39)

La síntesis se resume en el esquema de la figura 1.5

#### 1.4.3 Propiedades físicas y químicas.

La canavanina es un compuesto básico, soluble en agua, se encuentra libre en la fracción no proteica de la semilla, es soluble en alcohol al 50% y precipita en alcohol absoluto formándose una masa viscosa. (21) (23)

En solución acuosa es alcalina a la fenoftaleína, es D-rotatoria y no reduce la solución de Felhing. Precipita con ácido fosfotungstístico y mas completamente con cloruro de mercurio y acetato de sodio, igualmente con nitrato de plata en solución alcalina. Con el reactivo de Nessler da un color amarillo verdoso, con tricloruro de fierro (en caliente) da un color rojo, con ninhidrina da el color típico de la reacción, el característico y estable color rubí. (22)

Da una reacción de coloración con pentacionoaminoferrato, el grupo guanidoxi de canavanina reacciona con el reactivo en solución acuosa a un pH de 7 dando un color magenta. (3)

Su tiempo de retención es mayor comparado con el de ornitina 282 y 238 min. respectivamente, y menor comparando con arginina

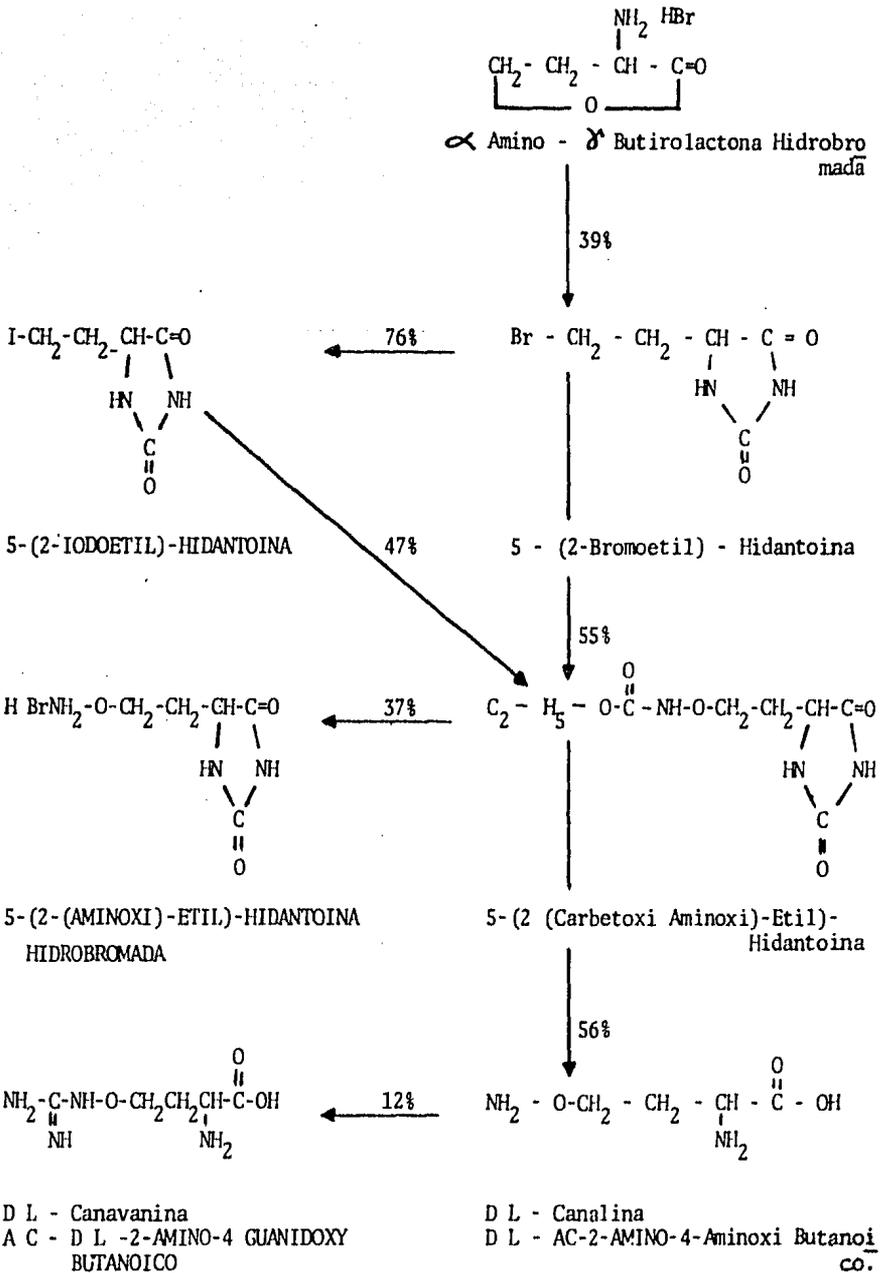


FIGURA 1.5 SINTESIS QUIMICA DE CANAVANINA

que es de 300 min. (19) (46)

- mp  $172 \pm 0.5$  °C (desc.)

- Km  $10^{-3}$ M

-  $[\alpha]_D^{22} = + 4.8 \pm 0.1$

-  $[\alpha]_D^{25} = 11.8$

#### 1.4.4. Acción bioquímica.

Canavanina por ser un aminoácido análogo de arginina, puede - sustituirlo en la biosíntesis de proteínas de muchos sistemas - procariotes y eucariotes.

Estudios con crecimientos de células "in vitro", indican que canavanina causa una marcada inhibición de las síntesis de DNA y de la viabilidad. (47) (49)

Gren Melvin efectuó un estudio en donde se inyectó canavanina a ratones con células leucémicas y se observó su efecto en la - proliferación de las células del tumor, observándose que una cons<sub>u</sub> tante infusión subcutánea de 20 mg/rata durante 24 horas causa un 86% de inhibición en la síntesis de DNA de las células leucémicas, por consiguiente la canavanina puede ser utilizada como agente an<sub>ti</sub>tumoral. (15) (38)

Otros estudios han probado el efecto de canavanina contra el - virus herpes simple, el cual infecta al humano produciendo cáncer en la laringe.

Poul F. Kruse Jr. encontró que la canavanina es un antagonista competitivo en la utilización de arginina en el carcinosarcoma --

Walken 256 en cultivo tisular, las células del tumor defectuosas utilizan ornitina y citrulina a favor de arginina. Estudios con carbono 14 indicaron que la inhibición es por una interferencia en la utilización de arginina. (25) (36) (56)

En otro estudio similar se observó el efecto de canavanina - en el tratamiento del virus herpes en cultivos de células. L-ca navanina al ser análogo natural de arginina inhibe efectivamente la morfogénesis en el virus herpes simple (HSV) y en el humano citomegalovirus (HCMV), cuando se adiciona en el tiempo de infección ocurren cambios citopáticos. Se encontró que la exposición progresiva de canavanina después de un tiempo lleva a la maduración normal. Las células HCMV lavadas con canavanina durante 1-5 días mantienen normal la morfogénesis viral. (2) (50)

Joseph F. Morgan observó en un estudio que la arginina es esencial para la supervivencia de fibroplastos cultivados "in vitro" en un medio sintético conteniendo suplementos completos de aminoácidos esenciales y no esenciales. El requerimiento de arginina en el tejido tisular puede ser reemplazado por altas concentraciones de citrulina. Al querer reemplazar la arginina por su análogo canavanina, se observa una inhibición del tejido tisular que puede ser completamente reversible al agregar arginina de nuevo. (33)

Se han efectuado muchos estudios para determinar el efecto que tiene canavanina sobre el crecimiento de virus, larvas, levaduras, insectos, bacterias observándose en todos los casos inhibición y retardamiento en el crecimiento. (1) (8) (9) (13) (20) - (31) (35) (50)

Se ha utilizado la canavanina en cultivos de levadura, observándose una inhibición normal en el crecimiento de la levadura, esto se ha aprovechado para la estandarización y mejoramiento de los cultivos de levadura en la industria del vino. (13)

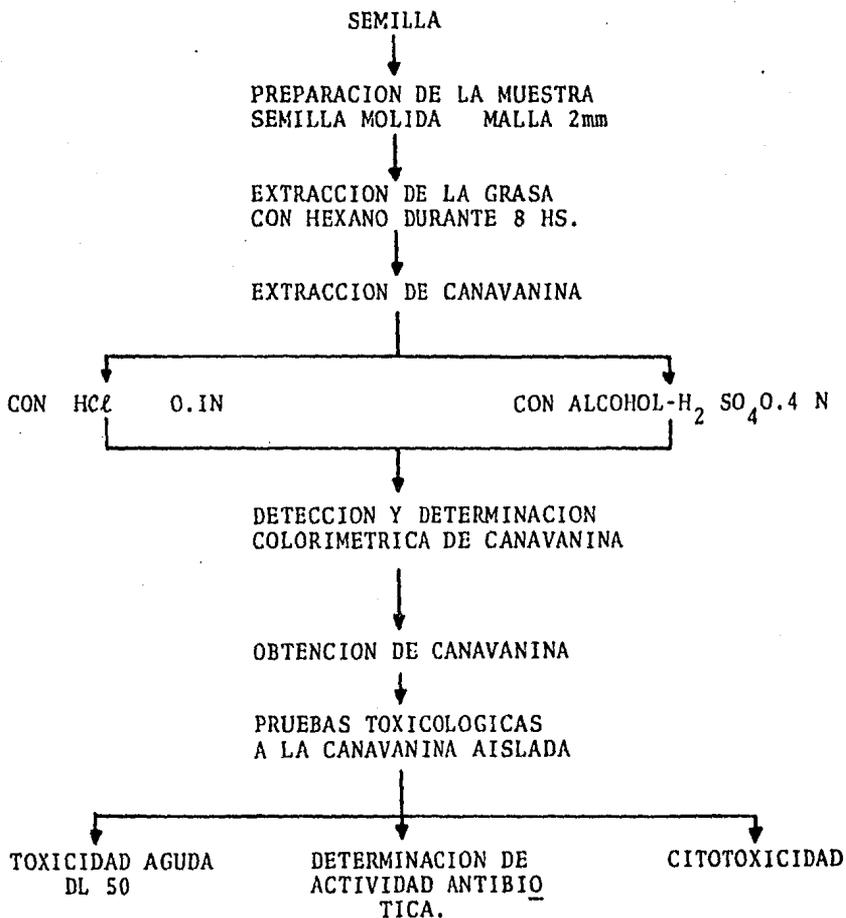
La canavanina puede intervenir en el sistema de balance de agua, esto se estudió en *Locusta migratoria*. Se observó que inhibe la secreción de fluidos del volumen hemolinfático. Después del tratamiento con canavanina el volumen hemolinfático se reduce drásticamente abajo del nivel retenido en *Locusta* no tratada con canavanina. (42)

Se han estudiado los mecanismos bioquímicos y la intervención de la canavanina en éstos, por ejemplo en la síntesis de proteínas, en la síntesis de RNA y DNA, en la síntesis de macromoléculas, en la síntesis de glucoproteínas etc. (17) (18) (43) (47) (48) (49) (54) (55)

Como se ha visto, la canavanina posee una importante acción bioquímica, que en cierta medida afecta el metabolismo en el organismo.

## 2.- PARTE EXPERIMENTAL

## 2.1 DIAGRAMA DE TRABAJO



## 2.2 DETECCIÓN Y DETERMINACION COLORIMETRICA DE CANAVANINA

Esta determinación es propuesta por Fearon y Bell. (11) con alguna modificaciones. (46)

Esta basada en que los compuestos que tienen el grupo guanidoxi ( $-O-NH-\overset{\text{NH}}{\underset{\text{NH}}{\text{C}}}-NH_2$ ) como la canavanina, reaccionan con el reactivo específico de Pentacianoamonioferrato produciendo color rojo magenta.

La determinación tiene dos objetivos, primeramente saber cual es el contenido del aminoácido canavanina en la semilla de cacahuanano y escoger el método de extracción más adecuado, entre una extracción con alcohol  $H_2SO_4$  0.4 N y una extracción con --- HCl 0.1 N.

La semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*), de Guerrero y Oaxaca, en el inicio de la primavera, en el mes de marzo. Como la vaina es dehiciente al secarse al sol, brotan las semillas maduras.

La semilla se molió utilizando una malla de 2mm. A la harina obtenida se le extrajo la grasa con hexano, por medio de un reflujo durante 8 horas.

### Material

Espectrofotómetro Coleman Junior II A

Potenciómetro Corning

Agitador magnético Corning

Balanza analítica Mettler

## Reactivos:

Solución de HCl 0.1 N

Solución de NaOH 1 N

Solución buffer de fosfatos pH 7

Solución de pentacianoamonioferrato (PCAF) Sigma al 1%

Canavanina estandar Sigma.

## Técnica.

Para extracción de canavanina con HCl 0.1N, pesar de 100-150mg de la muestra preparada, colocarla en una vaso de precipitado pequeño con un magneto, adicionar 20 ml de HCl 0.1 N y dejar agitando toda la noche a 200 rpm. Filtrar el extracto sobre papel filtro doble (watman #4) y ayuda de vacío (se puede ayudar la filtración con 100 mg de silica gel 60 G.F.) ajustar el pH cerca de la neutralidad (6.5-7.0) con NaOH 1 N en un potenciómetro. El filtrado ajustado se afora a 25 ml, se toman 3 alicuotas de 0.5 ml, a cada una se adiciona 9.1 ml de buffer pH7 y 0.4 ml de PCAF. Se lleva a un baño de 30°C, se deja por 25 min. Pasado este tiempo se lee en un espectrofotómetro a 550 nm.

La extracción alcohol  $H_2SO_4$  0.4 N. Se realiza siguiendo el método de extracción que se encuentra en 2.2 obtención de canavanina.

Si la alicuota de 0.5 ml no es suficiente para dar una lectura, se puede tomar una mayor cantidad de alicuota, hasta un volumen de 3ml, en este caso será necesario introducir un blanco, para tomar en consideración la coloración del extracto, para lo cual a la mezcla de reacción se le adiciona 0.1 ml de NaOH 5 N tomando en cuenta que el volumen final es de 10 ml, con este tubo se ajusta a 100% de transmitancia.

Cuadro 2.1

Curva estandar

Concentración canavanina ( $\mu$ g)	sol. std. canavanina (ml)	buffer pH7 (ml)	PCAF (ml)	30°C/25 min →	lectura 550 nm
0	0.0	9.6	0.4		
20	0.2	9.4	0.4		
50	0.5	9.1	0.4		
100	1.0	8.6	0.4		
150	1.5	8.1	0.4		
200	2.0	7.6	0.4		
300	3.0	6.6	0.4		

Cálculos.

$$\mu\text{g de canavanina} = \frac{(A) - B}{m}$$

$$\text{mg canavanina/100 gm} = \frac{(\mu\text{g canav.}) \cdot A \cdot 100}{a \cdot \text{mg}}$$

(A) = Absorbancia de la muestra

B = Intercepto regresión lineal

m = Pendiente regresión lineal

A = Aforo extracto

a = Alicuota para desarrollar color con PCAF

mg = mg de muestra para extracción

### 2.3 OBTENCION DE CANAVANINA.

Técnica basada en la empleada por Rosenthal G.A. (46)

Material:

Pontenciómetro Corning

Centrífuga Dynac

Rotavapor Biichi

Estufa de vacío Lab-line Instrument Inc.

Balanza analítica Mettler

Parrilla con agitación Corning

Columna de vidrio de 50 cm de largo por 3 cm de ancho

Refrigerador a 4°C

Desionizador Crystalab

#### Reactivos.

Solución de  $H_2SO_4$  1N

Solución de  $H_2SO_4$  0.4N

Solución de  $H_2SO_4$  0.06N

Solución de  $NH_4OH$  al 20%

Solución de  $NH_4OH$  0.35N

Solución de PCAF al 1%

Etol al 95%

Etol absoluto

Eter anhidro

Solución buffer de fosfatos pH 7

Carbón activado

Resina de intercambio iónico Dowex 50-X8

#### Técnica.

Se pesan 100 g de la muestra preparada (semilla de cacahuanano molida y extraída la grasa con hexano), se agitan mecánicamente - con 1 lt de volúmenes iguales de  $EtOH-H_2SO_4$  0.4N durante una hora. Transcurrido el tiempo, se decanta y se filtra a vacío, el filtra

do se guarda. La harina se vuelve a extraer con un litro de  $\text{EtOH-H}_2\text{SO}_4$  0.4N 1:1 durante una hora, se repite el procedimiento de decantación y filtración, el filtrado se junta con el anterior. La harina se reextrae, por otra hora, con un litro de  $\text{EtOH-H}_2\text{SO}_4$  0.06 1:1, al finalizar el tiempo se decanta y filtra, antes de juntar el filtrado con las anteriores se efectúa una prueba con el reactivo de PCAF (dando un color rojo en presencia de canavanina), si la prueba es negativa ya no se efectúa otra extracción, si es positiva se realizan las extracciones necesarias hasta que la prueba sea negativa.

A los filtrados se les ajusta el pH a 7.3 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 20% para que precipiten las proteínas solubles, se deja toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Después que han precipitado las proteínas, se separan por centrifugación durante 15 min. A la solución sobrenadante se le ajusta el pH a 6.2 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N. La solución se pasa por una columna que contiene 10 cm de resina Dowex 50-X8, a cada cierto volumen (aproximadamente 50 ml) que pasa por la columna, se le efectúa una prueba con PCAF para detectar en que momento se ha saturado la resina con canavanina. En el momento en que la prueba da positiva, se deja de pasar solución por la columna y se guardan los últimos ml que pasaron (no se desechan como los anteriores, porque al dar prueba positiva ya contienen canavanina). La canavanina se extrae de la resina haciendo pasar por ésta una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.35N, por la columna. Se colecta la solución hasta que la prueba con PCAF de negativa, después se concentra la solución en rotavapor por unos minutos, para eliminar el ión amonio ya que éste

provoca descomposición espontánea de la canavanina. Se lava la resina con agua desionizada, hasta que quede pH neutro. Ya limpia la resina, se repite el procedimiento pasando la solución por la resina, hasta que se satura, eluyendo la canavanina con  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.35N (concentrando ésta solución) y lavando con agua desionizada, hasta que ha pasado toda la solución por la columna.

Se juntan las soluciones que contienen la canavanina (a las que se les ha eliminado el amoniaco) y se concentra en rotavapor a un volumen de 300 ml aproximadamente. La solución concentrada se agita mecánicamente con 5 g de carbón activado durante 15 min. se filtra a vacío para eliminar el carbón. Se concentra a 5-7 ml. Se vacía la solución acuosa de canavanina en 10 ml de ETOH acuoso al 95% a 4°C, la solución de canavanina residual del metrúz, se lava dos veces con 2 ml de agua desionizada. Se adicionan 25 ml de ETOH absoluto frío a la solución de canavanina, se forma un precipitado chicloso, el cual precipita a canavanina con ETOH absoluto y raspando las paredes con una varilla. Se filtra en embudo buchner y se lava con ETOH absoluto frío y eter anhidro, se seca a vacío toda la noche a 60°C.

## 2.4 PRUEBAS TOXICOLÓGICAS A LA CANAVANINA AISLADA.

### 2.4.1 Toxicidad aguda DL50

Técnica basada en métodos de experimentación de Gay W.I.(14)

La toxicidad aguda de un cuerpo se expresa como las dosis en mg/Kg necesaria para matar al 50% de los animales de experimentación. Es lo que se llama la dosis letal 50 (DL50). Dependien-

do de la ruta de administración.

Se fundamenta en que cuando una sustancia es tóxica, después de la penetración en el organismo a ciertas dosis, provoca trastornos a una o varias funciones y puede llegar hasta la muerte en caso de una intoxicación aguda. (10)

#### Material.

60 ratones hembras con peso entre 15-20 g

Cuarto de experimentación

Jaulas para ratones

Bebedores

Jeringas

Agujas

#### Sustancias.

Sulfato de canavanina estandar ICN Pharmaceuticals

Sulfato de canavanina obtenido

Buffer fosfatos pH 6.25

#### Técnica:

Los 60 ratones se dividen en dos lotes de 30 ratones cada uno. Con el primer lote se efectúa una prueba global para evaluar el vehículo de administración y a la vez para evaluar aproximadamente entre que concentraciones se podría encontrar el cero y el cien por ciento de mortalidad. En el segundo lote se trata de fijar el cero y el cien por ciento de mortalidad, en base a concentraciones determinadas.

Los ratones se privan de agua y alimento dos horas antes del experimento.

Se preparan las soluciones de sulfato de canavanina (estandar y obtenido), empleandose una dosis de 5000 mg/Kg., en base a suponer que la canavanina es ligeramente tóxica, de acuerdo a la clasificación del cuadro 3.4, con una dosificación de 0.04 ml/g de peso del ratón. Se esterilizan las jeringas y agujas, los ratones se pesan, se marcan para su identificación por medio de perforaciones en sus orejas (teniendo un valor numérico cada una de ellas). Se administra la solución por vía intraperitoneal (0.04 ml/g de peso del ratón). Una vez que se inyectan se van distribuyendo en cuatro lotes (5 ratones por lote), cuidando de que el peso total de los ratones de cada lote sea equivalente entre los demás lotes.

Cuadro 2.2 DL 50 Primera parte (Prueba global)

LOTE 1	Control buffer fosfatos pH 6.25
LOTE 2	Muestra de sulfato de canavanina
LOTE 3	Control buffer fosfatos pH 6 con $H_2SO_4$ diluido
LOTE 4	Estandar de sulfato de canavanina

Se observan los resultados a las 24 horas después de la administración. Con el resultado de esta prueba, se fijan las dosis que se emplean en la segunda prueba para determinar el rango entre el 0 y el 100% de mortalidad.

Se procede de la misma forma, en esta prueba se trabaja con cinco lotes de cinco ratones cada uno.

Cuadro 2.3

DL 50

SEGUNDA PARTE

	DOSIS mg/Kg	DOSIFICACION ml/g peso
LOTE 1	2500	0.01
LOTE 2	5000	0.02
LOTE 3	7500	0.03
LOTE 4	10000	0.04
LOTE 5	Control	0.05

#### 2.4.2 Determinación de actividad antibiótica.

El método para penicilina, bacitracina y tricomicina es de Code Fed. Regulation. (4) (5) (6) respectivamente.

Esta determinación se basa en que, cuando una solución de antibiótico se difunde a través de un medio inoculado con el microorganismo susceptible al antibiótico, se forma una halo de inhibición proporcional a la concentración de antibiótico.

#### Material

Autoclave

Estufa incubadora

Parrilla Corning

Mechero de Bunsen

#### Reactivos

Buffer de fosfatos al 1% pH 6

Buffer de fosfatos al 10% pH 6

Mezcla de dimetil-sulfóxido-metanol-agua (2:3:5)

Medio bacto-penassay seed agar B263 DIFCO

Medio bacto-penassay base agar B270 DIFCO

Estandar de penicilina (1748 U/mg)

Estandar de bacitracina (69 U/mg)

Estandar de tricomicina (6690 U/mg)

Estandar de griseofulvina (977 g/mg)

Medios #1 y #2 (según instrucciones del manual DIFCO)

Caldo glucosado

Etanol

Sulfato de canavanina obtenido

#### Microorganismos.

Sarcina subflava ATCC 7468

Sacharomyces cereviceae ATCC 2601

Staphylococcus aureus ATCC 6538 B

#### Medio # 1

10.0 g de peptona

5.0 g de extracto de lavadura (0127-01)

2.5 g de extracto de carne (0126-02)

10.0 g de cloruro de sodio

10.0 g de dextrosa

25.0 g de agar

El agua necesaria para un litro

#### Medio # 2

20.0 g de dextrosa

5.0 g de bacte-peptona (0118-01)

1.5 g de extracto de levadura (0127-01)

20.0 g de agar

El agua necesaria para un litro

Caldo glucosado

20.0 g de dextrosa

1.0 g de extracto de levadura (0127-01)

El agua necesaria para un litro

Técnica.

Se prepara el inóculo para la determinación de penicilina y bacitrocina, resemebrando el microorganismo en medio seed agar inclinado, 24 horas antes de la determinación y se incuba a una temperatura de 35-37°C.

Determinación de penicilina y bacitracina.

Se preparan cajas petri con 18 ml de medio base. Se suspenden las células en 5 ml de agua estéril se toman 0.1 ml y se -- llevan a 10 ml con agua estéril (se obtiene una dilución de --- 1:100 v/v). Se toman 3 ml del inóculo y se adicionan a 50 ml de medio seed agar (disuelto y a una temperatura de 48-50°C), se - homogeniza y se toman 4 ml que se adicionan a la caja que con - tiene el medio base agar gelificado, distribuyendo bien el medio, unos minutos después se colocan los cilindros, 4 cajas con 5 ci- lindros cada una y dos cajas con 4 cilindros cada una. Las 4 pri- meras son para la curva estandar y las dos últimas para la mues- tra. Se llenan los cilindros con las soluciones, tanto de la cur- va estandar como la muestra. Todo el procedimiento se efectúa en una zona estéril y con mechero encendido. La concentración de la muestra es de 50 mg/ml. Las cajas se incuban durante 24 horas.

Se prepara el inóculo para la determinación de tricomicina y griseofulvina, resemebrando el microorganismo en tubos con medio

# 1 incluido, 24 horas antes de la determinación y se incuba a una temperatura de 35-37 °C .

Determinación de tricomicina y griseofulvina.

Se colocan unas asadas del inóculo preparado, en 10 ml de caldo glucosado y se deja fermentar a la misma temperatura durante 3-6 horas. A cada 30 ml de medio # 1 a 50°C, se adicionan 4 ml de caldo fermentado. Por último, en cajas de petri que contienen 21 ml de medio # 2 estéril y sólido, se agregan 4 ml del medio inoculado. Se colocan los cilindros en 5 cajas petri, para la curva estandar y 2 para el problema. Ya colocados los cilindros y las soluciones, se incuban a 35-37°C durante 24 horas, después de este tiempo se mide el halo de inhibición resultante. La concentración de la muestra es la misma que para penicilina y bacitracina, 50 mg/ml.

#### 2.4.3 Citotoxicidad.

Técnica basada en la empleada por Tennant J.R. (51)

La célula viva posee resistencia a la penetración de un colorante, esta resistencia se pierde en la célula muerta, y como consecuencia el colorante penetra en ella. De esta manera es posible conocer el número de células muertas contando las células coloridas.

#### Material

Microscopio

Baño ajustado a 37°C

Porta y cubre objetos

Pipetas Pasteur

Bulbos

#### Reactivos

Solución de azul de tripano al 0.1%

Solución de formol al 10%

Solución salina al 9%

Buffer de fosfatos 0.1N pH 7.4

Sulfato de canavanina obtenido

Linfocitos humanos

#### Técnica.

Se efectúan soluciones de canavanina con las siguientes concentraciones; 200  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  y 2  $\mu\text{g/ml}$

Las células de linfocitos se obtienen de sangre humana de donadores sanos siguiendo el método de Ficoll-Hypaque. (32)

Se colocan 0.5 ml de cada solución de canavanina en tubos de ensayo, se le adicionan 0.5 ml de las células de linfocitos. El efecto citotóxico se prueba a diferentes tiempos, al tiempo 0, a los 30 min y a los 60 min. Se incuban los 5 tubos más un blanco con un mililitro de células de linfocitos, a 37°C. Las muestras del tiempo 0, se toman inmediatamente después que se adicionan las células de linfocitos a la solución de canavanina, de la siguiente manera; se coloca en un porta objeto una gota de la solución de canavanina con linfocitos, se le adiciona una

gota de azul de tripano y una gota de formol, se homogeniza rápidamente y se le coloca un cubre objeto. Este procedimiento se repite para cada concentración y para el blanco, inmediatamente se procede a observar bajo el microscopio contando células vivas y muertas, se cuentan 3 campos con concentración. Este procedimiento se repite a los 30 y 60 min.

### 3.- RESULTADOS Y DISCUSION.

#### 3.1 DETECCION Y DETERMINACION COLORIMETRICA DE CANAVANINA.

Esta determinación se realizó tanto para saber cuál era el contenido real de canavanina en la semilla, como para saber - cuál método de extracción sería el más indicado para utilizarse en la técnica de obtención.

En el cuadro 3.1 se observa que se obtuvo una mejor extracción del aminoácido empleando la mezcla  $\text{ETOH-H}_2\text{SO}_4$ . Se detectó hasta un gramo más de canavanina en cien gramos de muestra, por lo que se decidió emplear este método de extracción en la técnica de obtención de canavanina.

#### 3.2 OBTENCION DE CANAVANINA.

El rendimiento obtenido con la semilla de cacahuanano es alto (5.82 g/100 g), comparándolo con el resultado reportado por Rosenthal en su técnica de obtención de canavanina a partir de Jack bean (3.14 g/100 g) (46). Esto es debido principalmente a que el cacahuanano contiene una mayor cantidad de canavanina.

## CUADRO 3.1

Resultados del análisis colorimétrico comparando dos métodos de extracción de canavanina.

Tipo de extracción	mg canav/g muestra	g canav/100 gm
Extracción HCl O.IN	91,590	9.159
Extracción HCl O.IN	88,398	8.839
Extracción HCl O.IN	91,590	9.159
Extracción ETOH-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	109,636	10,963
Extracción ETOH-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100,021	10,002
Extracción ETOH-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	110,307	11,030

La técnica de obtención desarrollada en el presente trabajo, se basa en la empleada por Rosenthal a diferencia que él utiliza 3 Kg de la resina Dowex 50-X8, los cuales son agitados toda la noche con el extracto de canavanina. En la técnica que se utilizó en el trabajo, se empleó una columna de 50 cm de largo y 3 cm de ancho, con 10 cm de la resina Dowex 50-X8, con el inconveniente que al pasar la solución de canavanina por la resina ésta se saturaba muy pronto por lo que se tenía que lavar constantemente. Además, para eluir la canavanina de la resina saturada, se tiene que pasar una solución de amoníaco tendiéndose que eliminar éste lo más pronto posible de la solución de canavanina puesto que provoca descomposición espontánea de canavanina... (46), por lo que el poco tiempo que está en contacto el amoníaco con la solución de canavanina, antes de eliminarse por medio del vacío y concentración mediante el rotavapor, es otra fuente de pérdida. Aún con estos inconvenientes se obtiene una buena cantidad de canavanina en forma de sulfato.

En cuanto al punto de descomposición al compararse con el sulfato de canavanina estandar resulta muy parecido, y la mezcla de sulfato de canavanina estandar con el sulfato de canavanina muestra comparada con el sulfato de canavanina muestra, resultaron iguales, por lo que se puede decir que se trata de la misma sustancia. Ver cuadro 3.2

### CUADRO 3.2

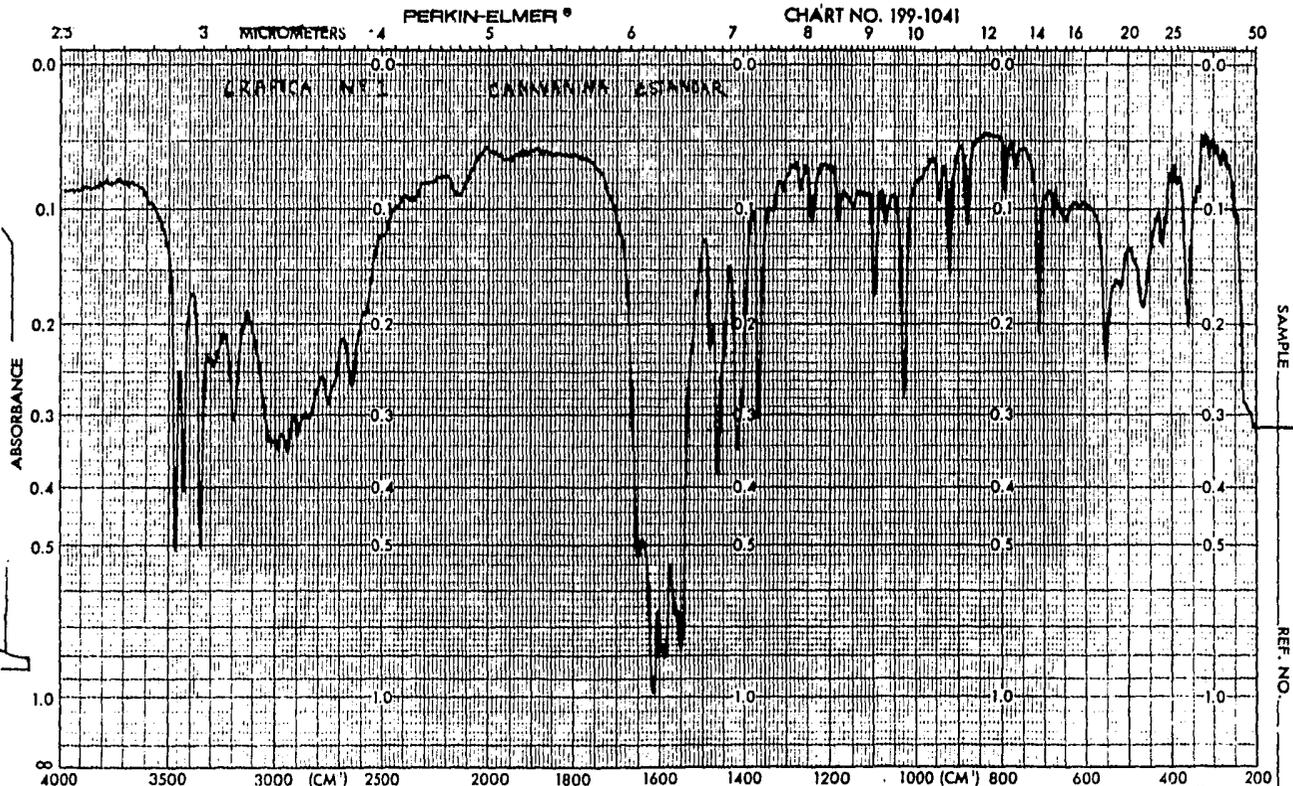
Rendimiento y punto de descomposición de sulfato de canavanina

Rendimiento: 5.82 g SO <sub>4</sub> -canav./100 g de semilla	
	Punto de descomposición
SO <sub>4</sub> -canav. estandar	158 °C - 164 °C
SO <sub>4</sub> -canav. estandar y SO <sub>4</sub> -canav.muestra	159 °C - 164 °C
SO <sub>4</sub> -canav. muestra	159 °C - 164 °C
Referencia literatura	172 ± 0.05 °C

Las pruebas cualitativas dieron positivas, tanto con el reactivo PCAF (pentacianoammonioferrato), como con ninhidrina.

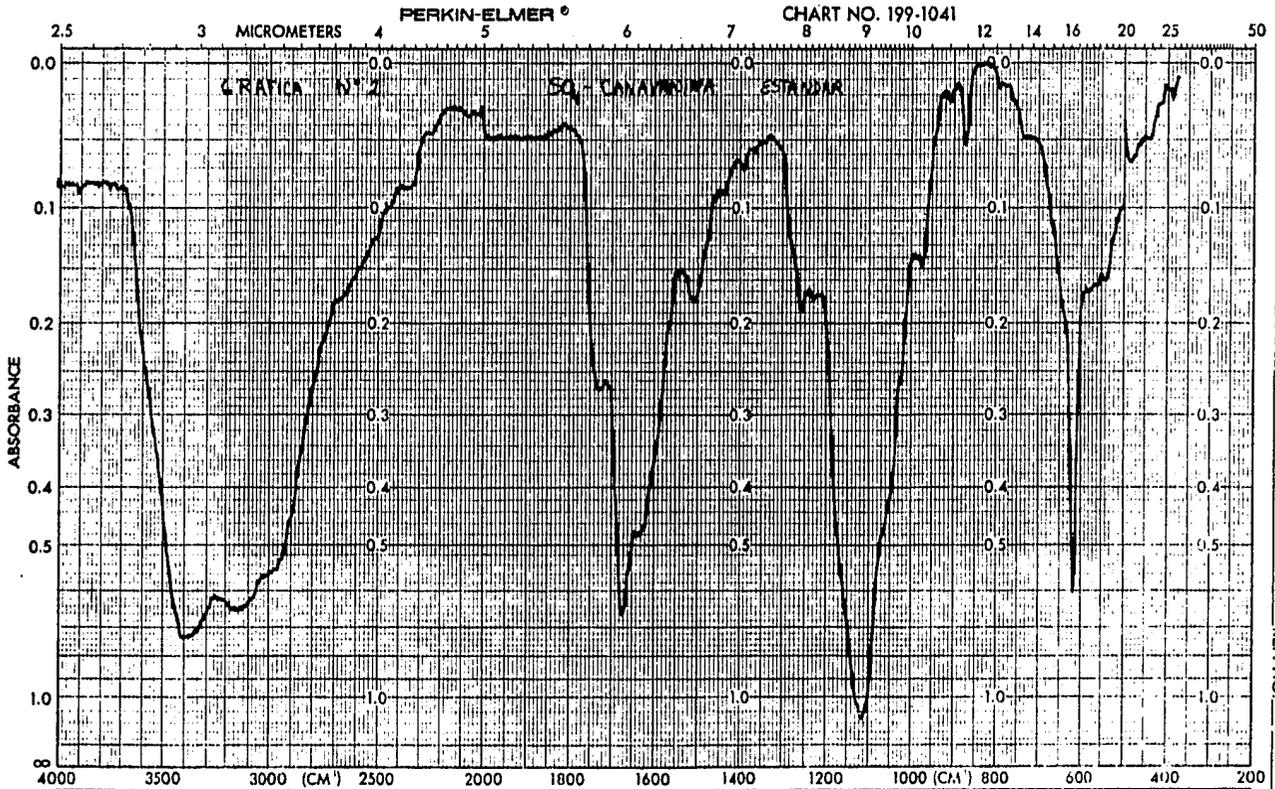
A la muestra recristalizada, se le hicieron determinaciones de infrarrojo, figura 3.1. Comparando los espectros obtenidos con la muestra y con el estandar se observa que las bandas principales, tanto en uno como en otro, se encuentran en la misma frecuencia, lo que indica que se trata de la misma sustancia.

Analizando los espectros se encontró que, la banda ancha e intensa que aparece en la frecuencia de 2500-3500 cm<sup>-1</sup> corresponde al alargamiento O-H. La banda de alargamiento C=O aparece



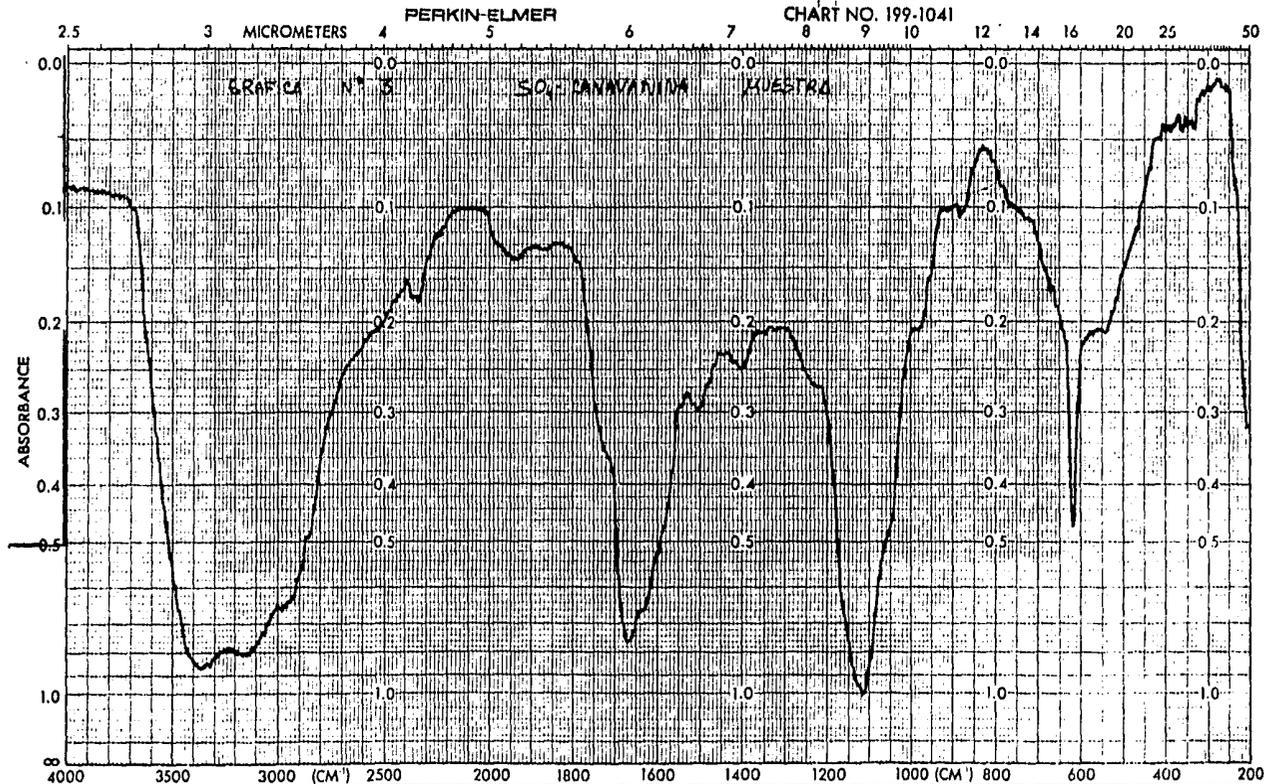
ABSCISSA	ORDINATE	SCAN TIME <u>6</u>	REP. SCAN <u>SINGLE BEAM</u>
EXPANSION	EXPANSION	MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE
<u>9274</u> → <u>ESTANDAR</u>	% T <u>ABS</u>	SLIT PROGRAM <u>W</u>	OPERATOR <u>niehu</u> DATE <u>12-84</u>
SAMPLE <u>ANHYDRINA (U)</u>	REMARKS <u>pastilla</u>	SOLVENT <u>1,2BA</u>	CELL PATH
ORIGIN <u>Ma. Josea Rojas</u>		CONCENTRATION	REFERENCE <u>cm</u>

SAMPLE REF. NO.



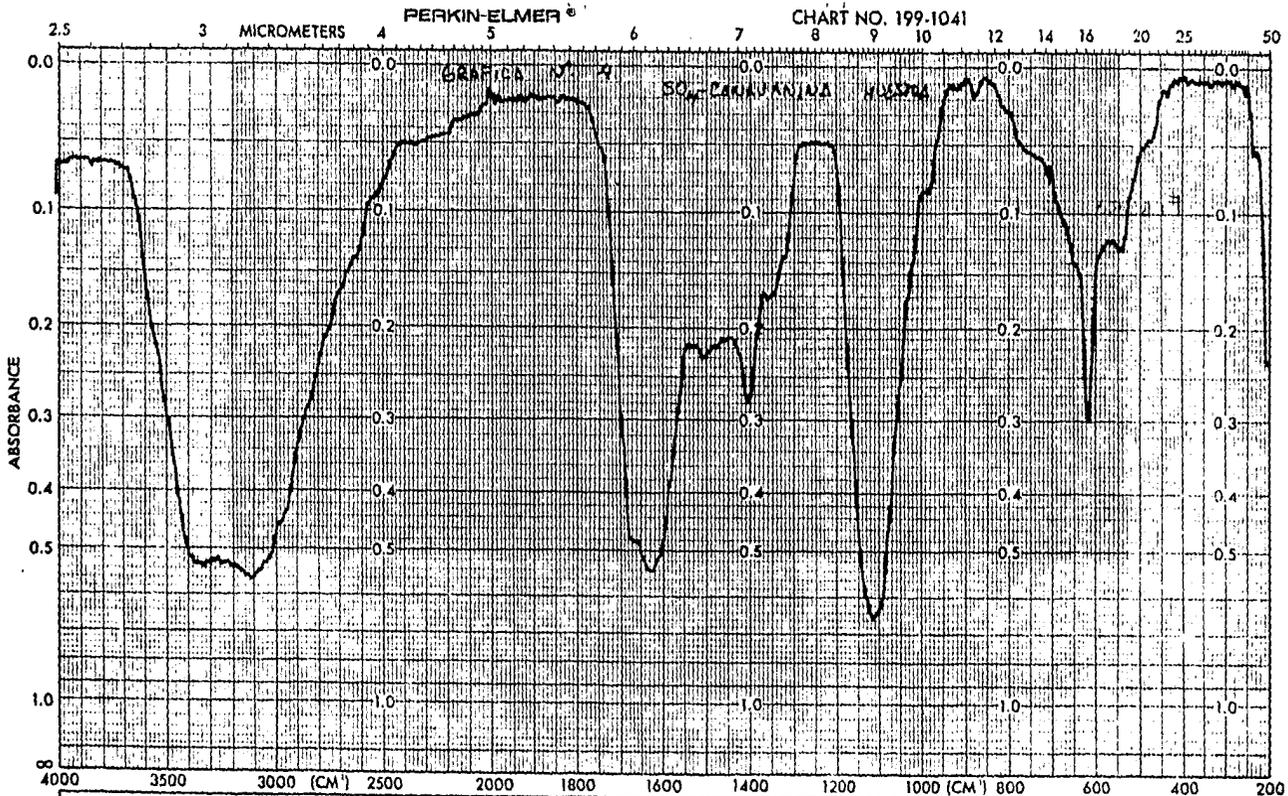
SAMPLE REF. NO. 4540

<input checked="" type="checkbox"/> ABSCISSA	ORDINATE	SCAN TIME <u>12</u>	REP. SCAN _____ SINGLE BEAM _____
EXPANSION _____	EXPANSION _____	MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE _____
<u>ESTANDAR</u>	% T. _____ ABS _____	SLIT PROGRAM <u>N</u>	OPERATOR <u>Marsela</u> DATE <u>3-12-84</u>
<u>Canaviquina 504</u>	REMARKS <u>pastilla</u>	SOLVENT <u>KBr</u>	CELL PATH _____
SAMPLE ORIGIN <u>La Teresa Negro</u>		CONCENTRATION _____	REFERENCE <u>alle</u>



SAMPLE REF. NO. 5381

✓ ABSCISSA EXPANSION <u>MUESTRA</u> <u>Canavanna-SO<sub>2</sub></u>	ORDINATE EXPANSION _____ % T _____ ABS _____	SCAN TIME <u>12</u> MULTIPLIER <u>1</u> SLIT PROGRAM <u>N</u>	REP. SCAN _____ SINGLE BEAM _____ TIME DRIVE <u>15</u> OPERATOR <u>Hausch</u> DATE <u>3-12-85</u>
SAMPLE <u>G1</u> ORIGIN <u>Ma. Teresa Bagueira</u>	REMARKS <u>pastilla</u>	SOLVENT <u>KBr</u> CONCENTRATION _____	CELL PATH _____ REFERENCE <u>one</u>



SAMPLE \_\_\_\_\_ REF. NO. \_\_\_\_\_ 4541

ABSCISSA EXPANSION _____	ORDINATE EXPANSION _____ % T _____ ABS _____	SCAN TIME <u>12</u> MULTIPLIER <u>1</u> SLIT PROGRAM <u>N</u>	REP. SCAN _____ SINGLE BEAM TIME DRIVE <u>12</u> OPERATOR <u>Mariela</u> DATE <u>3-12-84</u>
SAMPLE <u>Caranjanina 64</u> ORIGIN <u>Gilda Ramires</u>	REMARKS <u>postilla</u>	SOLVENT <u>KBr</u> CONCENTRATION _____	CELL PATH _____ REFERENCE <u>aire</u>

aproximadamente en  $1675\text{ cm}^{-1}$ . La banda que aparece en  $1000\text{ cm}^{-1}$  se debe al alargamiento C-O es intensa y ancha, se puede confundir con el alargamiento C-N, el cual se encuentra entre las frecuencias de  $1030\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ . La banda que corresponde al alargamiento N-H debería aparecer entre  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  pero se opacan debido al alargamiento O-H.

### 3.3 PRUEBAS TOXICOLÓGICAS A LA CANAVANINA AISLADA

#### 3.3.1 Toxicidad aguda. DL50.

Esta prueba se realizó con el fin de ver si la canavanina poseía una acción tóxica administrándose a ratones y comprobar si el efecto letal en los ratones, que se atribuye a la semilla de cacahuanano, se debe al aminoácido canavanina.

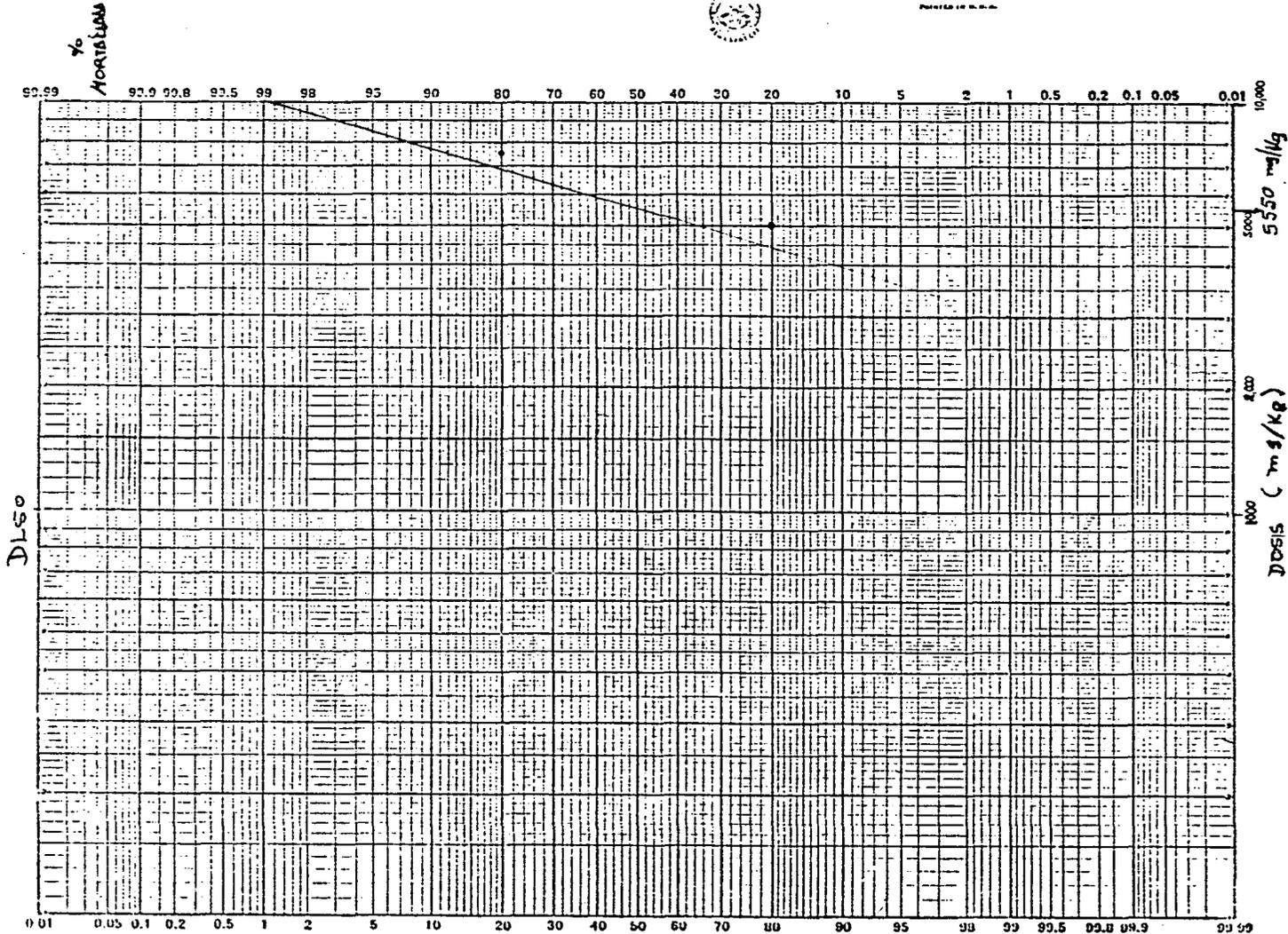
Este estudio se dividió en dos partes; primero una prueba global para saber aproximadamente entre que concentraciones se encuentra el cero y el cien por ciento de mortalidad, además para comparar con el estandar de canavanina. La segunda parte del estudio es para fijar el cero y el cien por ciento de mortalidad teniendo como base la primera parte.

Los resultados de la primera parte fueron los siguientes: - En el lote 1 no hubo mortalidad. En el lote 2 los ratones se aletangaron, y se murieron dos a las 24 horas. En el lote 3 no hubo ningún ratón muerto. En el lote 4 se presentó aletargamiento, pero a las 24 horas todos los animales estaban vivos. Los resultados de la segunda parte se muestran en el cuadro 3.3.

A los resultados se les efectuó un análisis estadístico; prueba de  $(\text{Chi})^2$ . El porcentaje de los ratones muertos, de cada dosis, fueron corregidos por el método de Miller y Tainter ... (7) (10) (26), graficando en papel log-probit, la gráfica se encuentra en la figura 3.2.



PRINTED IN U.S.A.



En la prueba estadística, la  $(\text{Chi})^2 \text{ exp} < (\text{Chi})^2 \text{ crítica}$ , por lo que no hay heterogeneidad de los datos en el trazado de la gráfica.

CUADRO 3.3

Resultados de la segunda parte. Toxicidad aguda - DL50.

Lote #	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml/g peso)	Muertos Tratados	% Mortalidad	%Mortalidad Corregida
1	2500	0.01	0/5	0	0.12
2	5000	0.02	2/10	20	34
3	7500	0.03	4/5	80	88
4	10000	0.04	5/5	100	99

CUADRO 3.4

Rangos de toxicidad en ratón

Rango de Toxicidad	Denominación usual	Dosis letal media (DL50)
1	Extremadamente tóxico	1 mg/Kg
2	Altamente tóxico	1-50 mg/Kg
3	Moderadamente tóxico	50-500 mg/Kg
4	Ligeramente tóxico	0.5-5 g/Kg
5	Prácticamente no tóxico	5-15 g/Kg
6	Relativamente inocuo	15 g/Kg

Deichmann, W.B. and Gerarde H.W. Toxicology of drugs and chemicals. Academic Press, N.Y. (1969). (44)

La dosis letal media (DL50) se obtiene de la gráfica, de la figura 3.2, graficando la dosis (mg/Kg) contra el porcentaje de mortalidad. En el cuadro 3.4 se muestran los rangos de toxicidad de acuerdo a la dosis letal media (DL50). La DL50 para la muestra de sulfato de canavanina se encuentra entre los límites de ligeramente tóxico y prácticamente no tóxico. Por lo anterior no puede tomarse a la canavanina como la responsable de la fuerte toxicidad de la semilla de cacahuanano.

Con la DL50 se puede obtener el potencial de toxicidad (pT), en donde la representa el potencial o toxicidad inherente de una sustancia expresada para determinadas condiciones. Por definición, pT es la inversa del logaritmo base 10 de la dosis de una sustancia (expresada en moles por kilogramo) que produce un determinado efecto,  $pT = -\log T$ , T es la dosis molar, pudiéndose calcular con la DL50 y el peso molecular de sulfato de canavanina. Este concepto ha sido propuesto por Luckey y Venugopal para disponer de un parámetro que evalúe la toxicidad de las sustancias de una manera más exacta de las conocidas. (44)

En el cuadro 3.5 se muestra el pT de diversas sustancias y el sulfato de canavanina. Al compararse el pT de sulfato de canavanina resulta ser éste, uno de los más bajos tomando en cuenta que si el pT es 1,2 o 3 veces mayor que el de sulfato de canavanina, se debe a que es 10, 100 ó 1000 veces respectivamente más tóxico que el sulfato de canavanina. El pT de sulfato de canavanina se puede comparar en toxicidad con el del ácido nicotínico y NaCl.

## CUADRO 3.5

Potencial de toxicidad (pT) de diversas sustancias y de sulfato de canavanina.

Sustancia	pT (mol/Kg)
HCN	3.95
Adrenalina	4.66
Parati6n	4.74
Estricnina	5.53
Botulinica D	15.49
Ac. Nicot6nico	1.82
NaCl	1.35
Ac. Pantot6nico	2.39
Aspirina	2.56
T6tanos	13.60
Cafe6na	2.89
SO <sub>4</sub> -canavanina	1.69

Luckey y Venugopal J.Tox. and Env. Health, 1977, 2,633. (44)

Para tener una mejor comparaci6n de la toxicidad de la canavanina, se compar6 con un extracto metan6lico de la semilla de cacahuanano, obtenido en un experimento anterior no reportado, efectuando una prueba de paralelismo. Los datos de muestran en el cuadro 3.6

## CUADRO 3.6

Prueba de paralelismo entre canavanina  $SO_4$  y el extracto metanólico de cacahuanano.

	$SO_4$ -canavanina	Ext.metanólico de cacahuanano
DL50	5550	1200
½DL50	1.207	1.335
S	1,301	1,854
½S	1.112	1.390

Al efectuar la prueba de paralelismo, con los datos anteriores, resultó que tanto para la DL50 como para la S existe diferencia significativa en prueba de paralelismo. Simplemente observando los valores de la DL50, en el cuadro 3.6, se puede apreciar que es mucho más bajo en la semilla que en el  $SO_4$ -canavanina, por lo tanto hay mayor toxicidad en la semilla de cacahuanano, esto confirma lo ya mencionado anteriormente, la toxicidad de la semilla de cacahuanano no se debe exclusivamente a la presencia de canavanina en ésta, esta toxicidad es causada por la presencia de otros factores.

### 3.3.2 Determinación de actividad antibiótica.

Esta prueba se realizó con el fin de saber si la canavanina tenfa acción antibiótica.

Al efectuarse la prueba con penicilina, se observó que ésta formaba halo de inhibición proporcional a la concentración de las soluciones de la curva estandar, al compararse con el  $\text{SO}_4$ -canavanina se vió que éste no formó halo de inhibición, por lo tanto no presentó actividad antibiótica para *S. aureus*. Lo mismo sucedió con las pruebas para tricomicina, facitracina y griseofulvina.

Como las pruebas se efectuaron con una concentración alta de canavanina, 50 mg/ml de  $\text{SO}_4$ -canavanina, se concluye que la canavanina no tiene efecto antibiótico.

### 3.3.3 Citotoxicidad.

Se efectuó esta prueba para terminar si el  $\text{SO}_4$ -canavanina tenía algún efecto tóxico inmediato en células de linfocitos humanos.

En el cuadro 3.7 se muestran los resultados de la viabilidad expresada en por ciento. Observando los resultados se puede apreciar que la viabilidad disminuye al aumentar el tiempo de contacto con la solución de canavanina a cualquier concentración, pero al observar la viabilidad al aumentar la concentración ésta no siempre disminuye como se esperarfa, por ejemplo en el tiempo 0 debería haber mayor viabilidad con 10 g de canavanina que con 100 g.

CUADRO 3.7

Viabilidad en porciento de las células tratadas con  $\text{SO}_4$ -canavanina

t (min)	Concentración $\text{SO}_4$ -canavanina ( $\mu\text{g}$ )					
	100	50	10	5	1	0
0	96.33	96.00	94.33	94.33	96.33	99.00
30	72.00	68.66	68.00	82.33	91.00	87.33
60	53.66	59.66	67.00	71.66	63.66	76.33

y sucede lo contrario, para poder sacar información de los datos se efectuó un análisis de varianza ANOVA con repeticiones para analizar todos los datos, tanto hileras como columnas y la interacción entre éstas. En el cuadro 3.8 se muestra el resultado del análisis, los tres valores de la varianza resultan superiores a los valores críticos (probabilidad del 0.05%), por lo tanto se encuentra diferencia significativa tanto en hileras (factor tiempo) como en columnas (factor concentración) y la interacción de éstas. La mayor diferencia se encontró con el factor tiempo, o sea que al aumentar el tiempo de contacto del  $\text{SO}_4$ -canavanina con las células de linfocitos disminuye la viabilidad a cualquier concentración. Para el factor concentración también se obtuvo diferencia significativa, pero para poder obtener una mayor información se hizo una prueba múltiple de medias, que permite analizar hasta qué concentración de  $\text{SO}_4$ -canavanina se ve afectada la viabilidad de las células, esta prueba se realizó con una proba-

bilidad del 0.05%. Los resultados se muestran en el cuadro 3.9.

### CUADRO 3.8

#### Resultados del análisis de varianza

Fuente de variación	V	C (crítica) p(0.05)	Resultado
Hileras (factor A)	138.46		V > C
Columnas (factor B)	8.9628	2.48	V > C
Interacción (A . B)	3.7346	2.11	V > C

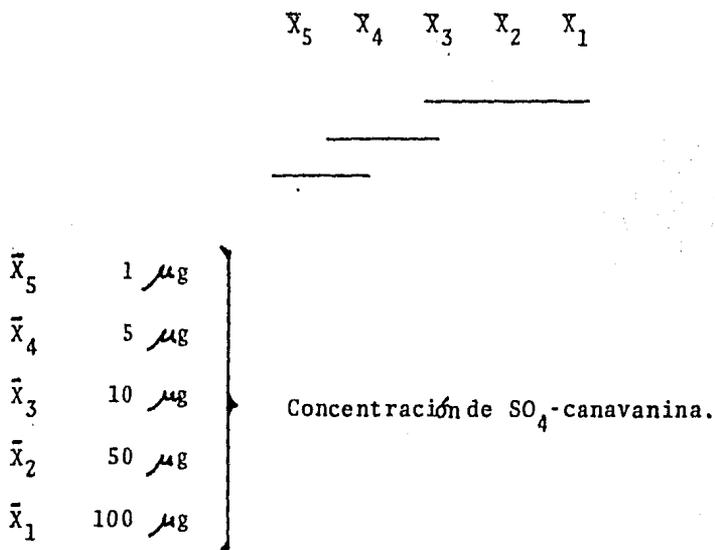
Factor A tiempo  
Factor B concentración

### CUADRO 3.9

#### Resultados de la prueba múltiple de medias

5 vs 1 :	12.221	4.031	$\mu_5 \neq \mu_1$
5 vs 2 :	11.239	3.791	$\mu_5 \neq \mu_2$
5 vs 3 :	9.131	3.399	$\mu_5 \neq \mu_3$
5 vs 4 :	1.134	2.858	$\mu_5 = \mu_4$
4 vs 1 :	11.096	3.791	$\mu_4 \neq \mu_1$
4 vs 2 :	10.114	3.442	$\mu_4 \neq \mu_2$
4 vs 3 :	2.107	2.858	$\mu_4 = \mu_3$
3 vs 1 :	3.090	3.442	$\mu_3 = \mu_1$
3 vs 2 :	2.107	2.858	$\mu_3 = \mu_2$
2 vs 1 :	0.928	2.858	$\mu_2 = \mu_1$

Para poder entender mejor los resultados de la prueba múltiple de medias, que se muestran en el cuadro 3.9, se representan gráficamente. De esta manera es más fácil analizar los resultados, en el esquema que se muestra a continuación, se puede observar que al aumentar la concentración de  $1 \mu\text{g}$  a  $5 \mu\text{g}$  no se encuentra diferencia significativa en cuanto a la viabilidad, pero al aumentar la concentración a  $10 \mu\text{g}$  ya se tiene diferencia significativa, con concentraciones mayores de  $10 \mu\text{g}$  ya no se tiene diferencia significativa, o sea que al aumentar la concentración arriba de éste valor la viabilidad ya no se ve afectada.



## 4.- C O N C L U S I O N E S .

En el presente trabajo se estableció un método de obtención de canavanina a partir de cacahuanano (*Gliricidia sepium*).

El contenido de canavanina en la semilla de cacahuanano fué notablemente superior (aproximadamente el doble) al que se ha concentrado en la semilla de Jack bean (*Canavalia ensiformes*), que es la fuente para obtener este aminoácido en forma comercial (Sigma Co. St. Louis Mo. USA)

La canavanina se obtuvo como sulfato por el procedimiento empleado para su extracción.

En cuanto a toxicidad, su dosis letal media (DL50)=5550 mg/Kg, se encuentra entre los rangos de ligeramente tóxico y prácticamente no tóxico. Además no se encontró acción antibiótica y en cuanto a la prueba de citotoxicidad, se encontró que afecta la viabilidad de las células ligeramente.

Con este trabajo se comprobó que la canavanina no es la responsable de la toxicidad que la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*) tiene sobre roedores y otros animales.

Se propone continuar la investigación sobre los posibles compuestos tóxicos responsables de la toxicidad de semilla, encontrar la forma de eliminarlos, para poder aprovechar esta leguminosa en la alimentación animal y posiblemente humana, por ser una leguminosa de buena calidad ya que su contenido de proteína es muy alto (más del 40%) y además por ser una leguminosa muy abundante en el país.

## 5.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bayliss G. J.  
Effect of the arginine analog canavanine on the synthesis of epstein-barr virus-induced proteins in superinfected raji cells.  
J. Virol., Mar., 41 (3); 1109-11, 1982
- 2.- Bell D.  
The affect of canavanina on herpes simplex virus replication.  
J. Gen. Virol., 22: 319-30, 1974.
- 3.- Bell E. A.  
Canavanine and related compounds in leguminosae.  
Biochem. J., 70: 617, 1958.
- 4.- Code of Federal Regulation  
Food and Drug. Titulo 21 Chap I  
Penicilina - Part 440.81A pag. 337, 1978
- 5.- Code of Federal Regulation  
Food and Drug. Titulo 21 Chap I  
Bacitracina - Part 448.10 pag. 589, 1978
- 6.- Code of Federal Regulation  
Food and Drug. Titulo 21 Chap I  
Tricomocina - Part 449.150 pag. 607, 1978.
- 7.- Blanc Ochoa José Fernando  
Estudio de los componentes químicos, nutricionales y toxicológicos de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*).  
Tesis, Fac. de Química UNAM, 1979.

- 8.- Dahlman D. L., Herald F.  
L-canavanine effects on growth and development of 4 species  
of muscidae.  
Entomol., 72 (5): 678-79, 1979.
- 9.- Dahlman D.L.  
Field test of L-canavanine for control of tobacco horm-worm.  
J. Econ. Entomol., 73 (2): 279-81, 1980.
- 10.- Fabr e René y Truhant René  
Tratado de Toxicología  
Editorial Paraninfo. Madrid, 1976.
- 11.- Fearon W.R. and Bell E.A.  
Canavanine: detection and occurrence in Colutea arborences.  
Biochem. J., 59: 221-24, 1955.
- 12.- Fowden L.  
Toxic amino acids their action as antimetabolites.  
Enzymol., 29: 89, 1967.
- 13.- Galzy P., Dupuy P.  
Uso del crecimiento de levaduras mutantes de canavanina pa-  
ra el control de levaduras en vinos.  
Am. Inst. Nalt. Recherche Agron. Ser. E., 6: 235-42, 1957.
- 14.- Gay W. I.  
Methods of Animal Experimentation  
Academic Press N.Y. Vol. I, 1965.
- 15.- Green Melvin H.  
Antitumor activity of L-canavanine against L 1210 murine -  
leukemia.  
Cancer Res., 40 (3): 535-37, 1980

- 16.- Guerrero Beltrán José Angel, Sigales G.L.  
Determinación de aminoácidos raros y proteína verdadera en leguminosas.  
Tesis, Fac. de Química UNAM, 1982.
- 17.- Hammel J. M  
Stimulation of proteinase biosynthesis by canavanine in -  
*Streptococcus faecalis* var *liquefaciens*.  
*Appl. Microbiol.*, 14: 337-39, May. 1966.
- 18.- Hare J. D.  
Reversible inhibition of DNA synthesis by the arginine analogue canavanine in hamster and mouse cells "in vitro".  
*Exp. Cell. Res.*, 58: 170-74, Nov. 1969.
- 19.- Hayato Kihara  
Enzimatic separation of canavanine o-ureudo homoserina and amonia.  
*J. Biol. Chem.*, 226: 485-95, 1957.
- 20.- Hayato Kihara and Esmond E. Svell  
Peptidos and growth of bacterium relation of inhibition -  
thienylalanine, ethionine and canavanine.  
*J. Biol. Chem.*, 212: 83-94, 1955.
- 21.- Kitagawa M., Tomiyama T.  
A new basic compound in the Jack bean and a correspondig new enzyme.  
*J. Biochem (Japan)*, 11: 256, 1929.
- 22.- Kitagawa M.  
A diamino acid, canavanine, and a mono amino acid, canaline.  
*J. Biochem.*, 25: 23, 1937.

- 23.- Kitagawa M.  
New basic compound in Jack bean, from which urea is split off by a liver enzyme.  
Proc. Imp. Acad. (Japan), 5: 380, 1929.
- 24.- Kreyszig Erwin  
Introducción a la Estadística Matemática.  
Ed. Limusa, México 1976.
- 25.- Kruse Paul F. Jr.  
Efecto competitivo de canavanina en la utilización de arginina en el crecimiento del carcinosarcoma Walker 256 en células "in vitro"  
Cancer Res. Earch., 18: 279-82, 1958.
- 26.- Litchfield J. T. and Wilcoxon F.  
A simplified method of evaluating dose-effect experiments - farmacol.  
Explt, Therp 96: 99-113, 1949.
- 27.- Little Elbert, Wadsworth Fronk  
Arboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes  
Ed. UPR, Puerto Rico, 1967.
- 28.- Martínez Maximino.  
Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas.  
Fondo de Cultura Económica, México 1979.
- 29.- Martínez Maximino  
Las plantas medicinales de México.  
Ed. Botas, México 1939.
- 30.- Martínez Maximino  
Plantas útiles de la flora mexicana.  
Ed. Botas, México 1959.

- 31.- Michael F. Wilson, Bell E. A.  
Aminoacids and B-aminopropionitrilo as inhibitors of seed germination an growth.  
Phytochemistry, 17: 403-06, 1978.
- 32.- Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman D.M. and Hungerford D.A.  
Chromosome preparations of leukocytes cultured from human - peripheral blood.  
Exp. Cell. Res., 20: 613, 1960.
- 33.- Morgan Joseph, Morton Helen  
Requerimientos de arginina en tejido tisular.  
J. Biol. Chem., 233:664-67, 1958.
- 34.- Morrison R., Boyd N.  
Química Orgánica. 3a. edición en español  
Fondo Educativo Interamericano, Bogotá 1976.
- 35.- Murphy , Edwin C. Jr  
Efect of canavanine on murine retrovirus polypeptide formation.  
J. Virol., 33 (3): 954-61, 1980.
- 36.- Myers M. W. and Carter B.J.  
Adeno-associated virus replication the effect of L-canava - nine or a helper virus mutation on accumulation of viral - caprids and progeny single-stranded DNA.  
J. Biol. Chem. 256 (2): 567-70, Jan 25, 1981.
- 37.- Naha P.M.  
Citotoxicity of L-canavanine "in vitro"  
Anticancer Res., 1 (5): 275-78, 1981
- 38.- Naha P. M.  
Reappraisal of L-canavanine as an anti-tumor agent.  
Cell. Biol. Int. Rep., 4 (2): 155-66, 1980.

- 39.- Nyberg David and Christensen  
The synthesis of DL-canaline; DL-canavanine and related  
compounds.  
J. Am. Chem. Soc., 79: 1222, 1957.
- 40.- O'Gorman Helen  
Plantas y flores de México  
Dirección General de Publicaciones, UNAM
- 41.- Pennington T. D., Srukhán José  
Arboles tropicales de México  
INIF, S.A.G., México y FAO, 1969.
- 42.- Rafaeli A., Shalomw Applebaum  
The influence of canavanine and related compounds on the  
water balance system of Locust (*Locusta migratori migrato*  
*rioides*).  
J. Insect, Physiol., 28 (2): 201-04, 1982.
- 43.- Rauki M.  
Semliki forest virus glycoproteins and canavanine.  
Acta, Pathol, Microbiol. Scand. (B), 80: 760-68, 1972.
- 44.- Repetto Manuel  
Toxicología fundamental.  
Ed. Científico-médica, España 1981.
- 45.- Rogers P.  
Effect of arginine and canavanine on arginine messenger  
RNA synthesis.  
Biochem, Biophys. Res. Commun., 44: 1220-26, Sep. 1971.
- 46.- Rosenthal G. A.  
Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine.  
Anal. Biochem., 77 (1): 147-51, Jan. 1977.

- 47.- Schachtele C. F.  
Isolation of a rapidly-sedimenting canavanyl-protein-DNA-membrane complex from *E. coli*.  
*J. Molec. Biol.*, 49: 255-61, Apr. 1970.
- 48.- Schachtele C. F.  
Mechanism of canavanine death in *E. coli*. I effect of canavanine on macromolecular synthesis.  
*J. Molec. Biol.*, 33: 843-60, May. 1968.
- 49.- Simonnet G. M.  
Relation between DNA structure denaturation and *E. coli* - viability after incubation with canavanine.  
*Biochimie*, 54: 55-62, 1972.
- 50.- Smith J. D., Dorothy M. Moore  
Effects of canavanine treatment on herpes virus morphogenesis in cultured cells.  
*Intervirology*, 16 (4): 233-43, 1981.
- 51.- Tennant J, R.  
Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability.  
*Transplantation*, 2: 685-94, 1964.
- 52.- Turner B.L., Harbone J. B.  
Distribution of canavanine in the plant kingdom  
*Phytochemistry*, 6: 863-66, 1967.
- 53.- Wayne W. Daniel  
*Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Ed. Limusa, México 1979.

- 54.- Wilkie D.  
Selective inhibition of mitochondrial synthesis in  
Sacharomyces cerevisiae by canavanine.  
J. Molec.Biol., 47: 107-13, Jan. 1970.
- 55.- Winston R. A.  
Proteins and glycoprotein synthesis in rat liver mito-  
chondria and rat intraneural mitochondria and protein  
synthesis in microsomes in the presence of L-canavanine.  
Chem. Biol. Interact., 3: 131-39, Apr. 1971.
- 56.- Wolff M.H., A. Zoll and K. E. Schneeweis  
Typing of herpes simplex virus strains by analysis of -  
the early proteins.  
Med. Microbiol. Immunol., 170 (4): 241-46, 1982.
- 57.- Yasuhiro Yamada  
Improved synthesis of DL-canavanine.  
Agr. Biol. Chem., 37 (9): 2201, 1973.