



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTIMACION DE LA TOXICIDAD AGUDA Y  
CUANTIFICACION DE ALCALOIDES TOTALES EN  
*Erythrina americana* EN DIFERENTES FASES  
DE DESARROLLO.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A  
ROSA IMELDA MORENO ENRIQUEZ



MEXICO, D.F.



300185

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Jurado Asignado:

<b>Presidente</b>	Prof. Ángela Sotelo López
<b>Vocal</b>	Prof. Bernardo Lucas Florentino
<b>Secretario</b>	Prof. Lucía Cornejo Barrera
<b>1er. Suplente</b>	Prof. Inés Miranda Martínez
<b>2do. Suplente</b>	Prof. Rosa María Argote Espinosa

Sitio donde se desarrolló el Tema:

Laboratorio 111. Departamento de Farmacia. Conjunto E. Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor: M. en C. Ángela Sotelo López.

Supervisor Técnico: M. en C. Rosa María Argote Espinosa.

Sustentante: Rosa Imelda Moreno Enríquez.



The image shows three handwritten signatures, each written on a horizontal line. The top signature is in cursive and appears to read 'Ángela Sotelo'. The middle signature is also in cursive and appears to read 'Rosa María Argote'. The bottom signature is in a more stylized cursive and appears to read 'Rosa Imelda Moreno Enríquez'.

*Hoy te doy gracias, Señor  
por la luz y por el día,  
por mis ratos de dolor  
y por toda mi alegría.*

*Por los padres que me diste,  
y también por mi hermano  
por lo que de mí hiciste  
y por mis sueños logrados.*

*Por los que mucho me aman,  
por los que nada me quieren,  
por los que feliz me aclaman,  
por los que a veces me hieren.*

*Por la dicha, por la paz,  
por la unidad y el amor,  
por todo cuanto me das,  
hoy te doy gracias Señor.*

## AGRADECIMIENTOS

*Primero que nada quiero agradecer a Dios y a mis padres, por haberme dado la vida y por permitirme llegar hasta aquí.*

*También a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), que a través del proyecto IN-202998 brindó el apoyo económico para la realización de este trabajo.*

*A mi Maestra Celina por brindarme palabras de aliento cuando más lo necesité.*

*A la M. en C. Ángela Sotelo López por confiar en mí para realizar este proyecto y por sus consejos y apoyo.*

*Al M. en C. Lino Reyes Trejo por su amistad y ayuda en todo momento así como por todos sus consejos.*

*Al Dr. Marcos Soto, al M. en C. Bernardo Lucas Florentino y a Lucy Cornejo por las observaciones y las correcciones realizadas a este trabajo.*

*A Rosita Argote y Lety Gil por toda su paciencia y ayuda durante el tiempo que estuve en el laboratorio 111, además de brindarme su valiosa amistad.*

*Al Personal del Bioterio, especialmente Lucy, Héctor y Dr. Atonatiu por todo el apoyo brindado.*

*A toda mi familia (los de sangre y los de corazón), por todo su apoyo y por aguantarme tantos años; por supuesto que esto incluye a toda la familia Vilchis, a mi tío Beto, a todos los de la familia Moreno (no crean que porque están un poquito lejos, no los recuerdo eh!), a la familia Córdoba, a la familia Enríquez y a mi madrina Irma.*

*A todos mis amigos y Compañeros de la Facultad, pero de manera muy especial a:*

*Nancy por todo lo que hemos compartido dentro y fuera de las aulas, por el gran equipo que formamos en todos los sentidos.*

*A Amalia por ser mi confidente y cómplice en muchas cosas, y por conocerme tan bien.*

*A Caty por ser más que una amiga y tener el gran don de saber escuchar.*

*A Ale por escucharme, aconsejarme y ser el mejor amigo del mundo, y*

*A Juan por estar ahí cuando más lo necesité.*

*También quiero agradecer a mis amigas de toda la vida Delia, Ma. Luisa y Lucy por compartir todo conmigo desde la infancia hasta hoy.*

*A todos mis amigos y compañeros del Lab. 111, especialmente a Vero, Gerardo, Alfredo y Miguel por los momentos que compartimos juntos y por hacer el tiempo que pasé en el laboratorio agradable e inolvidable.*

*A la Sra. Vicky y por tener siempre una palabra de aliento y una sonrisa que te hace sentir mejor.*

*Y de manera especial a Vero y Nan por las fotos que aparecen en este trabajo.*

## DEDICATORIAS

*Quiero dedicar este trabajo a Mis Padres: Mamá y Papá, gracias por su apoyo, sus consejos y sobre todo por su paciencia y su confianza. Por enseñarme que lo más importante en la vida es ser responsable y honesto, sobre todo con uno mismo. Por sus desvelos y ayuda en todos los sentidos. Los amo y quiero que sepan que este es un triunfo de ustedes y para ustedes.*

*A mi hermano, gracias por ser mi compañero de todos estos años, te quiero mucho.*

*A toda la Familia Vilchis, en especial La Güera, Chabe y Tita, por ser MI familia y por que gran parte de lo que soy se los debo a ustedes.*

*Todos mis tíos y primos, en especial mi tío Beto por todo su apoyo y cariño.*

*A quienes por desgracia no están conmigo físicamente pero que estoy segura que donde se encuentren nos cuidan y protegen: Papi Gus, Tío Memo y Edgar, siempre los llevaré en mi corazón.*

CON TODO MI AMOR

ROSA

CAPITULOS	PAGINAS
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	5
III. ANTECEDENTES	
- Leguminosas	8
- <i>Erythrina americana</i>	10
- Alcaloides	13
- Alcaloides en <i>Erythrina americana</i>	15
- Pruebas Toxicológicas	17
IV. METODOLOGÍA	
- Diagrama General de Trabajo	22
- Muestras de Estudio	23
- Animales para la prueba de toxicidad	23
- Acondicionamiento de las muestras	25
- Determinación de la Dosis Letal Media	27
- Cuantificación de Alcaloides	30

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
- Pruebas preliminares de toxicidad	37
- Pruebas de toxicidad aguda	40
- Cuantificación de alcaloides	41
VI. CONCLUSIONES	47
ANEXO A. Determinación de Humedad de Acuerdo al Método AOAC 934.01	50
ANEXO B. Método de la "Culebra Japonesa" para la Distribución de Animales	53
ANEXO C. Definiciones Utilizadas para el Estudio de Toxicidad Aguda	55
ANEXO D. Técnica para Determinación de Alcaloides. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del Año 2000	57
VII. BIBLIOGRAFÍA	64

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

Debido a la escasez de alimentos, generada principalmente por el aumento de la población así como al bajo poder adquisitivo de la mayoría, lo que provoca que no puedan consumir de alimentos de alto valor nutritivo como son las proteínas de origen animal; se han estudiado fuentes no convencionales de éstos, como son las proteínas de origen vegetal.

El alto costo de los alimentos de origen animal se debe, principalmente, a la alimentación de éstos ya que dentro de los múltiples problemas que enfrenta la ganadería nacional, destaca el abasto deficiente de granos y forrajes para la alimentación animal.<sup>(1)</sup> Por lo que la búsqueda de nuevas fuentes de alimentación es muy importante sobre todo en época de sequía, en la cual el forraje es escaso para el ganado.

Las leguminosas han sido uno de los cultivos comestibles practicados por el hombre y ocupan un lugar muy importante en la alimentación mundial. Contienen aproximadamente dos veces más proteínas que los cereales y la mitad de las proteínas de la carne magra, además son una buena fuente de isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina; así como lisina. Sin embargo, las leguminosas son deficientes en aminoácidos azufrados, por lo que una dieta mejor se logra con una mezcla de cereales y leguminosas. Desafortunadamente, estas semillas contienen factores antinutricionales como hemaglutininas, inhibidores de tripsina, taninos, saponinas, alcaloides y otros factores tóxicos que si no son inactivados o eliminados ejercen efectos indeseables en su valor nutricional. (2)

En el estudio de las leguminosas se ha realizado un seguimiento a la *Erythrina americana* que es un árbol usado con frecuencia en la ornamentación debido a sus flores decorativas, y que se propaga fácilmente mediante estacas. Se encuentra ampliamente distribuida en México y en fase de domesticación, además requiere de escasos recursos para su desarrollo. (3)

En estudios anteriores sobre las semillas de este árbol se ha encontrado que tiene un alto contenido de proteína y grasa, pero también diversos factores antinutricionales, algunos de los cuales al ser termolábiles se pueden eliminar con la cocción. Sin embargo contiene una cantidad significativa de alcaloides que se encuentran en mayor proporción en las semillas en su forma madura, seguida de las vainas y las flores. Se ha logrado la cuantificación de alcaloides en las semillas maduras de éste árbol por cromatografía de gases y la identificación de éstos por espectrometría de masas. También se han realizado estudios de toxicidad, por vía intraperitoneal, con extractos de alcaloides provenientes de semillas maduras de *Erythrina americana*, encontrándose que sus alcaloides son altamente tóxicos. (4)

Hasta el momento no hay estudios de toxicidad donde se considere la semilla completa, que es la manera en que se consumiría esta leguminosa, tampoco se han realizado estudios en los que la administración se realice por vía oral, los cuales nos permitirían clasificar la semilla toxicológicamente y determinar si puede usarse como un potencial alimento. Por otro lado, no siempre se cuenta con la infraestructura necesaria para realizar la cuantificación de alcaloides por cromatografía de gases, por lo que es importante considerar métodos alternativos como son la gravimetría y la titulación.

En este trabajo se realizaron estudios de toxicidad aguda, mediante administración oral, para diferentes muestras de *Erythrina americana* (ejote, germinado y semilla madura). También se propone la cuantificación de alcaloides en estas muestras por el método de titulación; para lo cual se adaptó la técnica para titulación de alcaloides de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del 2000<sup>(5)</sup> hasta encontrar las condiciones de trabajo óptimas; se verificó la reproducibilidad del método y la exactitud de la titulación.

Finalmente, se cuantificaron los alcaloides presentes en las muestras de *Erythrina americana* (semilla madura, germinado y ejote) y los resultados permitieron clasificar las muestras de acuerdo a su toxicidad y de esta manera definir si alguna de ellas podría ser susceptible a emplearse como alimento para animales.

# **CAPITULO II**

## **OBJETIVOS**

### GENERAL

- ⇨ Determinar la toxicidad aguda y cuantificar los alcaloides presentes en la semilla madura, el ejote y el germinado de *Erythrina americana*, con la finalidad de clasificarla de acuerdo a su toxicidad y determinar si puede ser considerada como potencial alimento para animales.

### PARTICULARES

- ⇨ Determinar, mediante pruebas preliminares de toxicidad, las dosis de *Erythrina americana* que se emplearán para la prueba de toxicidad aguda.
- ⇨ Realizar pruebas de toxicidad aguda para la semilla madura, el germinado y el ejote de *Erythrina americana*.
- ⇨ Adaptar el método de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del año 2000 para la cuantificación de alcaloides por titulación, para emplearla en muestras de *Erythrina americana*.
- ⇨ Probar la reproducibilidad del método utilizando la semilla madura de *Erythrina americana* y probar el porcentaje de recuperación por medio de un estándar de alcaloide conocido.
- ⇨ Cuantificar los alcaloides presentes en las muestras.

# **CAPITULO III**

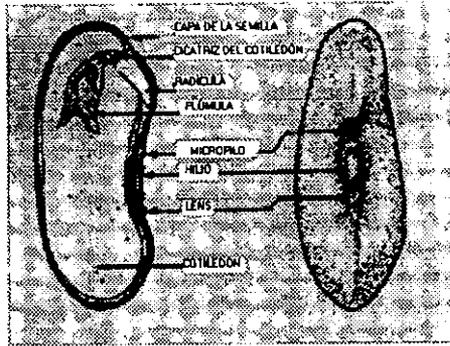
## **ANTECEDENTES**

**LEGUMINOSAS.**

Leguminosas es el nombre común de una familia botánica (*Leguminosae*), que comprende cerca de 650 géneros y más de 18 mil especies de las cuales en México se han registrado casi 1500 y de éstas sólo 20 se aprovechan en alimentación humana. (3)

Son plantas cuyas semillas se encuentran en vainas, algunas de las cuales pueden presentar dehiscencia, es decir que cuando alcanzan la madurez se abren por ambas costuras o bien ser indehiscentes (que no se abren), como el cacahuete o el tamarindo. Sus nódulos radiculares contienen bacterias que fijan en el suelo el nitrógeno atmosférico, a ello se debe el que la mayoría de ellas proporcione una gran parte de la proteína mundial que ingieren personas y animales (aportan el 20%). Son fácilmente adaptables de crecer bajo una amplia variedad de condiciones climáticas.

Aunque las leguminosas y sus semillas difieren mucho en tamaño, forma y color, sus estructuras son muy parecidas; una cubierta delgada pero dura envuelve a una semilla con un pequeño embrión que dará origen a la raíz, el tallo y a un par de hojas. Hay también un ojo o hilio y una especie de endospermo, los cotiledones, que almacenan el material alimenticio de la semilla (Figura 1). (6,7)



**Figura 1.** Esquema de una semilla de leguminosa

Estas semillas son fuentes importantes de hierro, fósforo, calcio, tiamina y aportan cantidades apreciables de niacina y energía. Son buena fuente de aminoácidos como isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina; además de tener un alto contenido de lisina. Presentan deficiencia en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína, pero una suplementación con alimentos ricos en estos aminoácidos (cereales) eleva su valor nutricional. (3,7)

Muchos factores antinutricionales como inhibidores de proteasas, lectinas, aminoácidos no proteicos, alcaloides, saponinas y glucósidos cianogénicos se encuentran en semillas de leguminosas. Algunos de estos factores pueden ser eliminados durante la cocción de las semillas; además este proceso gelatiniza el almidón, altera la textura y mejora el sabor, pero esto se logra solamente en un medio neutro o alcalino, los ácidos tienen un efecto contrario y endurecen las paredes celulares y si se adiciona un exceso de álcali las paredes celulares se desintegran tanto que las proteínas y vitaminas pasan al agua de cocción. (6,7)

La utilidad de las leguminosas es muy amplia, muchas de ellas son excelentes forrajes, fuentes de colorantes naturales y gomas de amplio uso en la industria, brindan maderas preciosas, maderas duras para la construcción y fabricación de muebles, algunas aportan materias primas para la industria química y farmacéutica. (3)

### *Erythrina americana.*

El género *Erythrina* pertenece a la familia *Leguminosae* y comprende cerca de 115 especies de amplia distribución en las regiones tropicales del mundo. Una gran cantidad de estas especies se encuentran en el sur de México (27 especies) y América Central. Este género se describe en la literatura como productor de forraje, madera para manualidades; un árbol de soporte para cultivos trepadores, un árbol que da sombra para café, cacao u otros cultivos y un árbol ornamental. Los árboles de *Erythrina* producen biomasa que mejora la estructura de la tierra, adiciona nitrógeno, ayuda al control de la maleza, reduce la erosión y evaporación y facilita la infiltración de agua. (8,9)

La especie *Erythrina americana* Miller (Figura 2) es también conocida con los nombres de Tzon-pantli, Colorín, Patol, Chocolín, Madre Chontal, Chacmolé y Pureque. Es un árbol perenne de tamaño mediano; se usa con frecuencia en ornamentación pues sus flores puntiagudas, brillantes y decorativas se agrupan en los extremos de las ramas. Las hojas trifoliadas son de color verde claro, de 7.5 a 10 cm de largo y casi triangulares. Las flores, de color rojo vivo, aparecen en racimos en forma de cono en los extremos de las

ramas; sus estambres salen fuera del pétalo enrollado. Con frecuencia estas flores se cocinan y comen como legumbres o se preparan como ensalada.<sup>(10)</sup>

El fruto es una legumbre como de 20 cm de largo y 2 cm de ancho, con estrangulamiento que limitan los lóculos donde se alojan las semillas las cuales crecen de 2 a 6; su color es rojo vivo, escarlata o naranja como las flores, su testa es lisa y brillante. Estas semillas se enhebran en collares y las usan los niños en sus juegos además de tener propiedades venenosas que se emplean para destruir animales nocivos y como agentes hipnóticos. La corteza y tallos tienen propiedades venenosas y se emplean como estupefacientes para los peces. La corteza del árbol da una tintura amarilla; la madera, suave y ligera se usa para tallar pequeñas figuras e imágenes y para otros fines.

Este árbol se propaga fácilmente por estacas y se encuentra distribuido en América Central, en México se han sembrado en Ciudad Universitaria y en los jardines del Pedregal de San Ángel. Crecen silvestres en la carretera a Cuemavaca y en los alrededores de Tepoztlán y en el camino a Taxco. Se ven también en los estados de Veracruz, Chiapas y Yucatán.<sup>(2,10)</sup>



**Figura 2.** Árbol de *Erythrina americana*

### *ALCALOIDES.*

La palabra alcaloide se deriva del término "álcali vegetal" usado originalmente para describir un grupo de bases de origen vegetal. Los alcaloides constituyen un grupo de compuestos de estructura compleja con un átomo de nitrógeno involucrado en un heterociclo, este nitrógeno actúa como base y resultan de interés porque se ha encontrado que presenta actividad farmacológica, fisiológica y psicológica significativa en humanos y animales.

Se encuentran distribuidos en diversas familias de plantas y en varias partes de ellas como las semillas, raíces, hojas, frutos y corteza, en forma de sales de ácidos orgánicos, combinados con azúcares (ramnosa, galactosa y glucosa) o en forma de ésteres de ácidos. Es común observar que la composición de los alcaloides puede variar con las condiciones ambientales como son, el nivel de nutrientes de la tierra, el tipo de tierra, pH, altitud, drenaje, luz y tensión. (3,8,11)

Los alcaloides tienen pesos moleculares que varían entre 100 y 8 900 g/mol; son sólidos cristalizables, raramente coloreados. Son muy poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares o poco polares y en alcoholes. El carácter básico depende de la disponibilidad del doblete libre de nitrógeno, los agrupamientos electrofílicos adyacentes al átomo de nitrógeno disminuyen su basicidad y los de carácter contrario la aumentan. El sistema heterocíclico puede permitir una basicidad variable; con 6 electrones  $\pi$  el nitrógeno está dotado de un doblete disponible y su carácter es básico; cuando el doblete del nitrógeno participa en la aromaticidad, el alcaloide no es básico. (12)

La nomenclatura de los alcaloides no es muy exacta, pero los que tienen un anillo heterocíclico son frecuentemente llamados *alcaloides verdaderos* y los que no tienen esos anillos se llaman *protoalcaloides*. Sus precursores son casi siempre aminoácidos; otras unidades multicarbonadas pueden ser incorporadas en la estructura final de algunos alcaloides. Los alcaloides, con o sin anillos, heterocíclicos que no son derivados de aminoácidos son llamados *pseudo alcaloides*.<sup>(13)</sup>

La función de los alcaloides en plantas es aún materia de controversia, sin embargo entre las funciones que se han sugerido están:

- ☛ Son productos nitrogenados de excreción de plantas.
- ☛ Actúan como reserva de nitrógeno, pero hay poca evidencia de que sean utilizadas en condiciones de deficiencia de éste.
- ☛ Actúan como reguladores del crecimiento en particular como inhibidores de la germinación.
- ☛ Actúan como sustancias protectoras, evitando ataques de animales o insectos.
- ☛ Ayudan a mantener un balance iónico en virtud de su poder quelante. <sup>(13,14)</sup>

Los alcaloides encontrados en las semillas, raíces y corteza de plantas son aislados por extracción con ácidos diluidos (clorhídrico, sulfúrico, acético) o con alcohol. Si los alcaloides están presentes como sales, éstos son liberados por tratamientos con hidróxido de calcio antes de la extracción. Los alcaloides individuales son usualmente separados de mezclas complejas por métodos cromatográficos.<sup>(14)</sup>

### *ALCALOIDES EN Erythrina americana.*

El árbol de *Erythrina americana* ha sido una de las plantas más estudiadas debido a su alto contenido de alcaloides en las semillas y a su actividad farmacológica.<sup>(15)</sup> Los estudios han generado diversos resultados: En 1934, Arzac<sup>(17)</sup> reporta un porcentaje de alcaloides en semilla de *Erythrina americana* de 1.498 y Barrera<sup>(16)</sup>, en 1958 encontró 1.63% de alcaloides en semillas de esta leguminosa, ambas determinaciones fueron realizadas por gravimetría.

Sotelo y colaboradores<sup>(18)</sup>, en 1993 cuantificaron los alcaloides de semillas de *Erythrina americana* por cromatografía de gases y los identificaron por espectrometría de masas; estos investigadores reportan 0.53% de alcaloides, de los que se identificaron la erisovina, erisodina, eritravina y  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina, siendo éste último el más abundante. Jiménez<sup>(11)</sup>, en 1994 cuantificó alcaloides en la semilla de esta planta por titulación y encontró 12.4370 mg de alcaloides/g de muestra (1.2437%).

En 1996, García-Mateos y colaboradores<sup>(8)</sup> determinaron, por cromatografía de gases, la concentración de alcaloides en flores, vaina inmadura de 30 días, vaina inmadura de 45 días y vaina madura, tanto a las semillas como a la vaina sola de *Erythrina americana*. Se encontró que las flores tenían 1.10% de alcaloides, entre los cuales se encontraban el N-óxido de eritristemina,  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina, así como un alcaloide no identificado; en la vaina inmadura de 30 días se cuantificaron 0.39% de alcaloides, que se identificaron como N-óxidos de eritartina y eritristemina, y  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina. En las semillas de la vaina inmadura de 45 días se encontraron 0.17% de alcaloides que eran

erisodina, N-óxido de eritartina y  $\alpha$ -eritroidina; en la vaina de esta misma fase ese encontró un porcentaje de alcaloides de 0.64 y se identificaron la erisodina, erisovina, erisotrina, N-óxidos de eritartina y eritristemina y  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina. Finalmente, en la fase de vaina madura, se encontró en la semilla 1.05% de alcaloides, los cuales se identificaron como erisodina, erisovina,  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina; mientras que en la vaina se encontró un porcentaje de alcaloides de 0.27, siendo éstos erisodina, 11 $\beta$ -metoxieritralina, 11 $\beta$ -hidroxierisovina, eritratidina y  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina. Estos resultados nos indican que el tipo de alcaloides, varía dependiendo del estado de maduración de la leguminosa.

En 1998, García-Mateos y colaboradores<sup>(15)</sup> reportan 1.27 mg de alcaloides/100 g de muestra seca en la semilla de *Erythrina americana* y en 1999<sup>(9)</sup> reportan 1.05 mg de alcaloides/100 g de muestra seca para las semillas de éste árbol, e identificaron nuevamente a la erisovina, eritroidina,  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina, y reportan a la  $\alpha$ -eritroidina como el alcaloide más abundante, todas las determinaciones las realizaron por cromatografía de gases. En el año 2000, Garín-Aguilar y colaboradores<sup>(4)</sup>, determinaron 0.571% de alcaloides en las semillas de *Erythrina americana*.

Todos estos estudios nos indican que los alcaloides encontrados en *Erythrina americana* son, principalmente, erisodina, erisovina,  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina; siendo la  $\beta$ -eritroidina la más abundante. Sin embargo dependiendo del estado de maduración de la leguminosa, el tipo y concentración de alcaloides se modifica. La importancia del estudio de estos alcaloides radica en que se ha descrito que tienen actividad curariforme, además de ser anticonvulsivos, agentes hipotensivos e hipnóticos y anestésicos.<sup>(4)</sup>

### *PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.*

La toxicología es el estudio de la naturaleza y el mecanismo de los efectos tóxicos de agentes físicos y químicos en organismos vivos y otros sistemas biológicos. El objetivo principal de la toxicología es establecer el uso seguro de los agentes químicos. (19, 20) La toxicología tiene un amplio campo de aplicación: Tiene que ver con estudios de toxicidad de sustancias químicas y procesos físicos usados en medicina, en la industria de alimentos, en agricultura y en la industria química.

El toxicólogo se encarga de la determinación de los límites de exposición seguros y evaluación de riesgos, estas determinaciones implican estudios integrales de las propiedades tóxicas, la demostración de dosis que no producen efectos negativos observables, establecimiento de relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta, y estudios quimiobiosintéticos y de biotransformación.

La toxicidad es una propiedad inherente de una sustancia, la naturaleza y el grado de manifestaciones tóxicas en un organismo expuesto a la sustancia depende de diversos factores como dosis, tiempo o duración de la exposición; factores del hospedante como es la especie, raza e individuo, sexo, estado hormonal, edad, estado nutricional, enfermedades; factores ambientales como son los físicos (temperatura) y sociales (manejo de animales, alojamiento individual o en grupos, tipos de jaula); así como de los tipos de interacción con otra sustancia química. (19)

En el diseño de una prueba toxicológica deben considerarse diversos factores que pueden influenciar los resultados experimentales como son:

- ✓ Información sobre la pureza y estabilidad del producto químico que se probará.
- ✓ Modelo biológico.
- ✓ Sexo y edad de la especie a ensayar.
- ✓ Planear la duración de la exposición y las vías de administración.
- ✓ Incluir un grupo de animales control que estará en las mismas condiciones que los animales tratados, a los cuales se les administrará el vehículo o un placebo.
- ✓ Incluir un número suficiente de animales en la prueba de toxicidad para contemplar la influencia de la variación en la susceptibilidad individual y poder obtener resultados confiables estadísticamente.

Los métodos de prueba de toxicidad se dividen por lo general en tres tipos:

1. Estudios de toxicidad aguda, implican una sola administración de la sustancia química bajo el control de una prueba o varias administraciones en un periodo de 24 horas. La mayoría de estos estudios se diseñan para determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de una sustancia tóxica, que se define como la dosis del compuesto que produce la muerte en 50% de los animales.
2. Estudios de toxicidad a corto plazo (subagudos o subcrónicos), hay administraciones repetidas en un periodo de aproximadamente el 10% de la duración de vida del animal de prueba.

3. Estudios de toxicidad a largo plazo (crónicos), implican administraciones repetidas en un periodo de toda la vida de los animales de prueba o una fracción importante de ella.<sup>(19,21)</sup>

Hasta el momento se han realizado diversos estudios toxicológicos sobre *Erythrina americana*, en 1934 Arzac<sup>(17)</sup> realizó un estudio farmacodinámico en el cual probó diferentes extractos de la semilla de *Erythrina americana* por vía intramuscular en cuyos y conejos, también por vía digestiva en perros y encontró que los extractos de *Erythrina americana*, como el curare, son tóxicos por vía hipodérmica, tienen acción sobre los nervios motores y la muerte es debida a asfixia por paro de los centros motores; sin embargo no son tóxicos por vía digestiva.

Guerrero<sup>(2)</sup>, en 1982 realizó estudios toxicológicos, mediante la determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), encontrando que la DL<sub>50</sub> del extracto salino de la semilla de *Erythrina americana* cruda, es de 1352.38 mg/kg de peso; mientras que el extracto salino de la semilla de *Erythrina americana* cocida fue de 1539.44 mg/kg de peso corporal, y del aceite de esta semilla de 6700 mg/kg, todas las dosis son reportadas por vía intraperitoneal. Se observó que los animales, durante este estudio, morían por convulsiones y en aquellos que recibieron dosis menores a las letales no se produjeron convulsiones, pero sí un aletargamiento y posterior recuperación.

En 1993, Sotelo y colaboradores<sup>(18)</sup> reportaron una  $DL_{50}$ , por vía intraperitoneal, de extractos salinos de semillas de *Erythrina americana* de 1375 mg/kg de peso corporal. En 1995 Conca<sup>(22)</sup> realizó un estudio de toxicidad subaguda (durante 42 días), con el aceite de la semilla de colorín, encontrándose que por vía oral este extracto lipídico ejerció un efecto tóxico a nivel de sistema nervioso central, el cual se vio reflejado en una conducta agresiva y nerviosa por parte de los animales.

Garín-Aguilar y colaboradores<sup>(4)</sup>, en el año 2000, realizaron pruebas de toxicidad aguda en extractos de semillas de colorín; encontrando que la  $DL_{50}$ , por vía intraperitoneal, de la fracción de alcaloides libres en hexano (donde se encuentran la erisovina, y  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina) fue de 40.37 mg/kg; la de la fracción de alcaloides libres en metanol ( $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina) de 38.54 mg/kg y para los alcaloides liberados con HCl, que hidroliza alcaloides esterificados (erisodina, erisovina y erisopina), fue de 39.69 mg/kg. También encontraron que estos extractos pueden tener efectos tranquilizantes y sedativos, además de disminuir el comportamiento agresivo en ratas.

Por el momento no se han realizado estudios de toxicidad con la semilla como se consumiría, sólo se han realizado para extractos de alcaloides; por lo tanto en este trabajo se propone la determinación de la dosis letal media de diferentes muestras de colorín en la forma en que se consumirían normalmente.

# **CAPITULO IV**

## **METODOLOGÍA**

A continuación se muestra el diagrama general de trabajo para esta investigación y posteriormente se explica cada uno de los pasos de manera detallada.

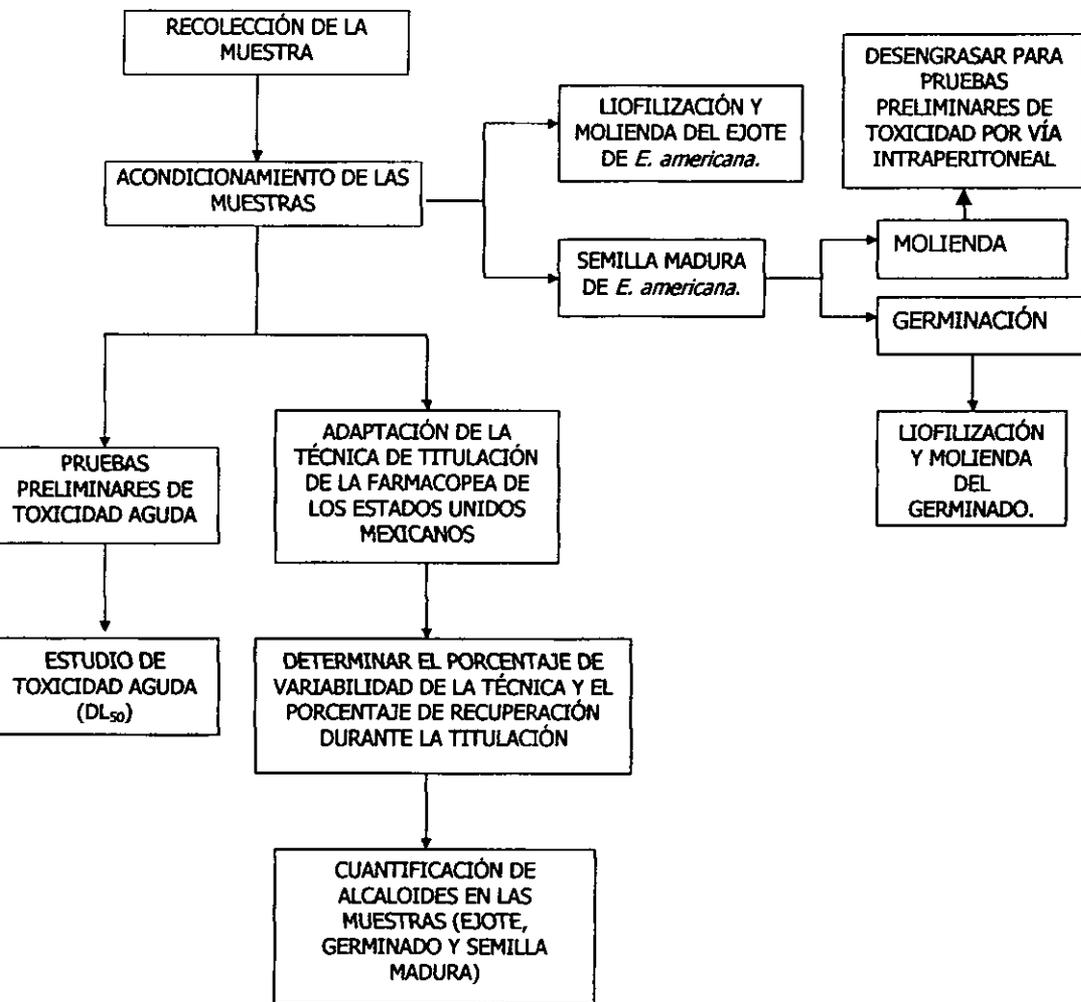


Diagrama general de trabajo

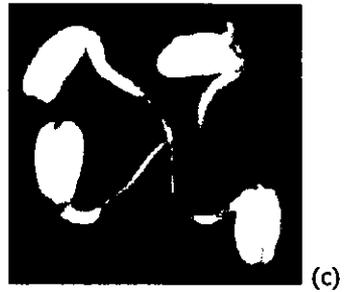
### MUESTRAS DE ESTUDIO (Figura 3)

- ♣ Las semillas maduras y el ejote de *Erythrina americana* se recolectaron del árbol que se encuentra frente al edificio B de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, debido a que ese árbol está caracterizado botánicamente.
- ♣ Para obtener el germinado de la semilla de *Erythrina americana* se lavan las semillas maduras con hipoclorito de sodio al 10%, se enjuagan con agua destilada y se lijan, con una lija para madera, cerca del hilio para adelgazar la cáscara. Se coloca en un recipiente una capa de algodón húmedo y se ponen las semillas. Se dejan en la oscuridad en un lugar templado aproximadamente por 10 días, manteniendo húmedo el algodón.

### ANIMALES PARA LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA

Se emplearon 150 ratones hembra blancos, Cepa CFW, entre 5 y 6 semanas de edad y un peso entre 20 y 25 g. Los animales se distribuyeron en lotes de tres para las pruebas preliminares de toxicidad y en lotes de 6 para las pruebas de toxicidad aguda.

Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas: temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa de 45-55%, 18 cambios de aire por hora y periodos de 12 horas de luz/oscuridad.



**Figura 3.** (a) Ejote, (b) Semilla madura y (c) Germinado de la semilla de *Erythrina americana*.

### ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

#### *Equipos empleados:*

- ☞ Molino marca Thomas-Wiley, Modelo 4
- ☞ Molino marca Cyclone, modelo C5M564026
- ☞ Parrilla de agitación Thermolyne, modelo SP-13025
- ☞ Centrífuga Dynac
- ☞ Liofilizadora Labconco 4.5

#### *Muestras.*

Las semillas de *Erythrina americana* se molieron y pasaron a través de una malla de 1.0 mm, posteriormente se molieron mas finamente usando una malla de 0.5 mm. Esto se realizó debido a que la semilla es muy dura y requirió de una doble molienda.

El ejote y el germinado se liofilizaron, molieron y pasaron a través de una malla de 0.5 mm.

A todas las muestras se les determinó humedad de acuerdo al método de la AOAC 934.01.<sup>(23)</sup> El método puede consultarse en el Anexo A.

Para definir el rango de dosis para la prueba de toxicidad aguda se realizaron pruebas preliminares de toxicidad con extractos salinos de alcaloides de la semilla seca, administrados por vía intraperitoneal (dosis 1375 mg/kg de peso corporal), para lo cual la muestra se acondicionó de la siguiente manera:

Se pesaron 0.6876 g de semilla madura desengrasada y molida, se adicionaron 20 ml de Solución Salina Isotónica (NaCl 0.9%), se agitó, mediante agitador magnético, a 800 rpm en parrilla de agitación, durante 60 min. Se dejó 16 horas en refrigeración y posteriormente se centrifugo a 2700 rpm por 15 min y se filtró. El sobrenadante se inyectó a los animales de estudio.

Para las pruebas de toxicidad por vía oral (preliminares y de DL<sub>50</sub>), las muestras se acondicionaron como se indica a continuación:

Se pesó la cantidad necesaria para cada dosis, de las muestras de semilla seca y germinado y se agregó carboximetilcelulosa al 0.2% hasta lograr una suspensión. Las muestras se prepararon el mismo día en que se utilizaron.

El objetivo principal era observar el efecto tóxico del material en forma integral, sin embargo en el ejote no se logró, como en la semilla, una buena suspensión debido a su alto contenido de fibra (23.79 % respecto a 15.3% de la semilla madura<sub>(18,24)</sub>); por lo que se decidió realizar un extracto para administrarlo a los animales y de esta manera tener una idea del efecto que tendría el ejote de manera integral. El extracto se preparó de la siguiente manera: A  $\frac{3}{4}$  partes del peso de la muestra necesaria para la dosis se le adicionaron 30 ml de metanol a pH 2 y se agitaron toda la noche a 300 rpm. Se filtraron por medio de vacío con papel Whatman No. 541 y se lavó el residuo dos veces con metanol acidificado, se evaporó a sequedad, se adicionó el  $\frac{1}{4}$  restante de muestra y se disolvió en carboximetilcelulosa al 0.2%.

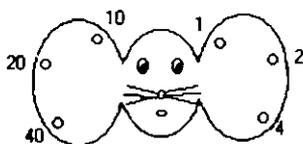
### METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL<sub>50</sub>)<sup>(25)</sup>

Se realizaron pruebas preliminares de toxicidad para la semilla madura, por vía intraperitoneal (dosis de 1375 mg/kg de peso corporal) y por vía oral (dosis de 1375, 3000, 6000, 10000 y 15000 mg/kg de peso corporal), empleando tres ratones por lote. Se decidió emplear la dosis de 1375 mg/kg de peso corporal debido a que en estudios anteriores esta dosis se encontró como la DL<sub>50</sub> de un extracto salino de semillas maduras de *Erythrina americana*.<sup>(18)</sup> Para el germinado se probaron las dosis preliminares de 8,000, 10000, 12500 y 15000 mg/kg de peso corporal y para el ejote se probó la dosis de 15000 mg/kg de peso corporal. Para estas dos muestras sólo se realizaron pruebas por vía oral.

Las dosis que se definieron para el estudio de toxicidad aguda fueron: Para la semilla madura 6000, 8000, 10000 y 15000 mg/kg de peso corporal; para el germinado 10000, 12500, 15000 y 18000 mg/kg de peso corporal y para el ejote 8000, 10000, 12500 y 15000 mg/kg de peso corporal. Para cada muestra se manejó un lote control al cual se le administró Carboximetilcelulosa al 0.2% y todos los animales fueron administrados por vía oral.

Para realizar las pruebas de toxicidad se siguió el siguiente procedimiento:

**Distribución de los animales.** Una vez que se tiene la dotación de animales se les dejó en ayuno por 12 horas, para lo cual se les suprime el alimento y solamente se les deja agua. Los ratones se marcaron con un horador especial de acuerdo a la siguiente anotación acumulativa:



Los animales marcados se repartieron en los diferentes lotes de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (Anexo B), y se colocaron 6 ratones por lote en una misma jaula.

**Administración.** La vía de administración que se empleó para el estudio de DL<sub>50</sub> fue la oral, se realizaron pruebas preliminares las cuales se hicieron por vía oral y una por vía intraperitoneal, que fue con la dosis de 1 375 mg/kg de peso corporal.

Para la dosificación se debe considerar que el máximo volumen para administrar ratones, tanto por vía oral como por vía intraperitoneal, es de 1 ml, por lo tanto se definió una dosificación de 4D como 0.04 ml/g de peso corporal. Para calcular la concentración de la solución de las muestras se consideró la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg muestra/ml)} = \frac{\text{Dosis (mg muestra/g de peso corporal)}}{0.04 \text{ ml/g de peso corporal}}$$

Para conocer el volumen para administrar a los animales, se multiplicó el peso del animal (en g) por la dosificación.

$$\text{volumen a administrar} = \text{Peso del animal (g)} \times 0.04 \text{ ml/g de peso corporal}$$

**Observaciones.** Una vez administrado el agente tóxico, se restituyó el alimento y se dejó a los animales en observación durante las primeras 10 horas y a las 24, 48 y 72 horas con

el fin de verificar el efecto de los alcaloides de *Erythrina americana*, para lo cual se evaluaron características clínicas como son: Lordosis, cifosis, ataxia, pilo erección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, disnea, hipoxia etc. (Las definiciones pueden consultarse en el Anexo C) y se anotó el porcentaje de mortalidad de cada lote. En el caso de las pruebas por administración intraperitoneal, a los animales muertos se les realizó una necropsia para su evaluación morfológica y se compararon con los animales del grupo control, que fueron sacrificados para este propósito.

**Evaluación de los datos.** La dosis letal media se calculó de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon<sup>(26)</sup>, en el cual se realizan gráficas en papel logarítmico-probabilidad, en la escala logarítmica se colocan las dosis y en la escala probits el porcentaje de mortalidad, se realiza una prueba de  $\text{CHI}^2$  para verificar la homogeneidad de los datos y una vez obtenidos datos homogéneos se interpola al 50% de mortalidad.

CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

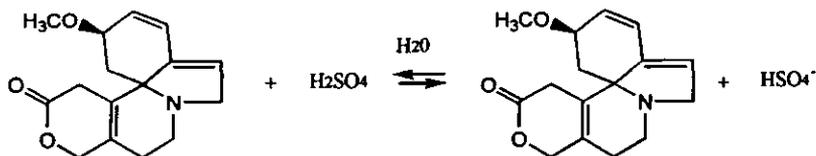
Para la técnica de cuantificación de alcaloides se siguió la reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del 2000<sup>(5)</sup>, se cuantificaron por triplicado los alcaloides en la semilla madura de *Erythrina americana* con la técnica original. Posteriormente se adaptó esta técnica hasta encontrar las condiciones de trabajo óptimas, para lo cual se realizaron las siguientes modificaciones:

FARMACOPEA	MODIFICACIÓN
* Pesar el equivalente a 100-200 mg de alcaloides presentes en la muestra.	* Se pesaron 5 g de muestra.
* Para la extracción se deja macerar la muestra, con el disolvente alcalinizado, de 12 a 24 horas con agitación ocasional o un periodo corto con agitación continua. Al término se deja sedimentar y se decanta el disolvente.	* La muestra con el disolvente alcalinizado se agita en Parrilla de Agitación durante 8 horas, al término de éstas se filtra con vacío. Se adiciona al residuo más disolvente alcalinizado y se deja en agitación por 16 horas más. Se filtra con ayuda de vacío para recuperar el disolvente que contiene los alcaloides.
* Después de la extracción no se menciona cómo se recupera el extracto de alcaloides.	* Se evapora el disolvente por medio de rotavapor, para recuperar el extracto de alcaloides.
* Disolver el extracto de alcaloides en 15 ml de éter y 5 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1 N. Evaporar el éter por medio de agitación y filtrar la solución ácida a través de papel filtro, recibiendo en un embudo de separación.	* Redisolver el extracto de alcaloides en 15 ml de éter y 5 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 N. Filtrar a través de papel filtro, recibiendo en un embudo de separación.
* La solución alcalinizada se extrae con el disolvente adecuado, empleando un volumen menor de la mitad de la solución alcalina.	* La solución alcalina se extrajo con cloroformo, empleando ¾ partes del volumen obtenido de ésta.
* No se menciona la utilización de sulfato de sodio anhidro.	* La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro antes de evaporar el disolvente en rotavapor.
* Para titular se redissuelve el residuo con 2 ml de metanol.	* Se redisolvió el residuo en 3 ml de metanol, y se adicionaron a 7 ml de agua destilada para realizar la titulación.

El método original puede observarse en el Anexo D y la técnica modificada se presenta a continuación.

Este método se basa en la extracción de los alcaloides, aprovechando sus propiedades de solubilidad en un sistema de disolventes y su posterior valoración, por volumetría, empleando un ácido. Esto puede realizarse gracias a las propiedades básicas de los alcaloides.

*Reacción.*



*Reactivos.*

- ☞ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N valorado.
- ☞ Solución Indicadora, Rojo de Metilo.
- ☞ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00 N (ρ = 1.84 g/ml).
- ☞ NH<sub>4</sub>OH concentrado.
- ☞ Sulfato de Sodio Anhidro.
- ☞ Metanol Q.P. (para extracción).
- ☞ Metanol R.A. (para titulación).
- ☞ Éter etílico R.A.
- ☞ Cloroformo R.A.

### *Procedimiento.*

1. Pesar 5 gramos de muestra molida y pasarla a través de una malla 0.5 mm.
2. Adicionar 50 ml de metanol previamente alcalinizado a pH  $9 \pm 1$ , con hidróxido de amonio.
3. Agitar (300 – 500 rpm con agitador magnético en una parrilla de agitación) durante 8 horas, después de éstas filtrar con ayuda de vacío usando papel Whatman No. 541.
4. Al residuo adicionar nuevamente 50 ml de metanol alcalinizado y agitar 16 horas más. El filtrado guardarlo en refrigeración.
5. Filtrar con ayuda de vacío (en el mismo embudo y con el mismo papel del día anterior), recibiendo el filtrado en el matraz que se guardo en refrigeración. Lavar el vaso y el residuo con 20 ml de metanol alcalinizado.
6. Evaporar el disolvente, casi a sequedad, por medio de rotavapor ( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ).
7. Disolver el extracto en 15 ml de éter y 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.00 N.
8. Filtrar a través de papel Whatman No. 541, recibiendo en un embudo de separación. Extraer recuperando la fase acuosa (inferior).
9. Extraer tres veces la fase orgánica (superior) con 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y verter en un embudo de separación.
10. Adicionar 25 ml de cloroformo y extraer, recuperando la fase acuosa (superior).
11. Extraer tres veces la fase orgánica (inferior) con 5 ml de agua y 5 ml de ácido cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y extraer dos veces con 10 ml de cloroformo.

12. Recuperar la fase acuosa (superior) y filtrarla a través de papel Whatman No. 2, enjuagando el papel y el embudo con 2 ml de agua.
13. Alcalinizar con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado hasta un pH > 9
14. Extraer tres veces con 35 ml de cloroformo cada vez, recuperando la fase orgánica (inferior).
15. Secar con sulfato de sodio anhidro y evaporar en rotavapor ( $T = 40^\circ\text{C}$ ).
16. Redisolver el residuo con 3 ml de metanol (uno por uno), trasvasando cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer que contiene 7 ml de agua destilada.
17. Adicionar una gota de indicador rojo de metilo y titular con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  valorado.

**NOTA.** Esta es una determinación cuantitativa, así que se debe enjuagar el material empleado con los disolventes adecuados en cada paso.

### *Cálculos.*

Se reporta como  $\beta$ -eritroidina:

$$\text{g de } \beta\text{-eritroidina/100 g de muestra} = \frac{(A - B) (N_{\text{H}_2\text{SO}_4}) (273.32^*) (100)}{(\text{g de muestra}) (1000^{**})}$$

A = ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gastados por la muestra.

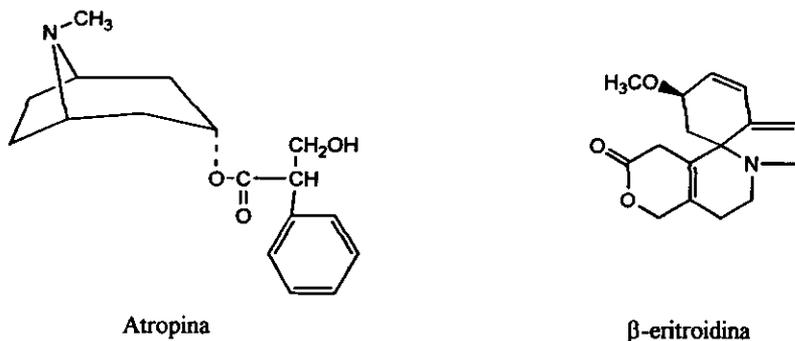
B = ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gastados por un blanco (7 ml de agua destilada y 3 ml metanol).

\* Este es el peso molecular de la  $\beta$ -eritroidina.

\*\* Para realizar el cambio de unidades (mg a g).

Este método se repitió 7 veces con la semilla madura, con el fin de determinar la reproducibilidad de la técnica. Los resultados se analizaron estadísticamente, calculando media, desviación estándar y coeficiente de variabilidad.

Se calculó el porcentaje de recuperación durante la titulación, empleando sulfato de atropina (Sustancia Oficial de Referencia de la Secretaría de Salud), debido a que éste alcaloide muestra una estructura similar a la  $\beta$ -eritroidina, al presentar su grupo amino libre, lo que permite la titulación con ácido. En la Figura 4 pueden observarse las estructuras de la atropina y la  $\beta$ -eritroidina.



**Figura 4.** Estructura de la Atropina y la  $\beta$ -eritroidina

El sulfato de atropina se pesó y disolvió en 5 ml de agua y 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.0 N; se alcalinizó, a pH 9, con hidróxido de amonio y se extrajo con cloroformo (3 x 7.5 ml), recuperando la fase orgánica. Esta fase se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el disolvente y se tituló como se indica en la técnica anterior. Esta determinación se repitió 3 veces y a los resultados se les determinó media, desviación estándar, coeficiente de variabilidad y porcentaje de recuperación, para el cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Cantidad de atropina determinada por titulación}}{\text{Cantidad de atropina pesada al inicio}} \times 100$$

Con la técnica establecida se cuantificaron, por triplicado, los alcaloides presentes en la semilla madura, el germinado y el ejote de *Erythrina americana* y los resultados se analizaron estadísticamente mediante media, desviación estándar, coeficiente de variabilidad y se compararon para determinar si existía diferencia significativa entre ellos por medio de un ANOVA (Análisis de Varianza).

# **CAPITULO V**

**RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN**

### *Pruebas preliminares de toxicidad.*

Para las pruebas preliminares por vía intraperitoneal (dosis 1375 mg/kg de peso corporal), se observó un porcentaje de mortalidad del 33.33%. Es importante mencionar que al momento de administrarles a los animales el extracto salino, se presentó lordosis y aletargamiento; los animales continuaron aletargados por 6 horas y presentaron dificultad para respirar; entre las 24 y 30 horas después de la administración murieron 4 animales, a los cuales se les practicó una necropsia, y se encontró que en todos existía una porción del intestino (duodeno) con un color y un líquido de color amarillo, el corazón y los pulmones se encontraban congestionados; en los animales control sacrificados no se observaron estos problemas.

Los resultados obtenidos de las pruebas preliminares de toxicidad, por vía oral, pueden observarse en la Tabla 1, la cual indica que la semilla madura obtuvo un porcentaje de mortalidad de 0% para las dosis de 1375, 3000 y 6000 mg/kg de peso corporal y un porcentaje de 66.66% para las dosis de 10000 y 15000 mg/kg de peso corporal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1.** Tabla Dosis-Respuesta (vía oral) para las pruebas preliminares de toxicidad en muestras de *Erythrina americana*.

MUESTRA	DOSIS (mg/kg p. c.)	ANIMALES TRATADOS/ANIMALES MUERTOS	PORCENTAJE DE MORTALIDAD
Semilla madura	1375	10 / 0	0.00
	3000	3 / 0	0.00
	6000	3 / 0	0.00
	10000	3 / 2	66.66
	15000	3 / 2	66.66
Germinado	1375	6 / 0	0.00
	8000	6 / 0	0.00
	10000	6 / 1	16.66
	12500	5 / 0	0.00
	15000	6 / 1	16.66
Ejote	1375	6 / 0	0.00
	15000	3 / 2	66.66

Los animales morían después de aproximadamente 5 minutos de haber realizado la administración, presentaban convulsiones leves, anoxia y finalmente muerte, los que no morían en ese tiempo se recuperaban totalmente aunque hubieran presentado dificultad para respirar y/o convulsiones. A los animales que murieron se les practicó una necropsia, observándose que tenían los pulmones congestionados y el hígado ligeramente más oscuro que un animal del grupo control que fue sacrificado.

Las diferencias en los resultados obtenidos por vía intraperitoneal y por vía oral se deben a la vía de administración utilizada. Hay que recordar que la toxicidad de un compuesto depende de la biodisponibilidad (fracción de la dosis ingerida que alcanza la circulación general), del mismo.<sup>(27)</sup> La administración por vía intraperitoneal representa un sitio selectivo de administración, en el cual un químico puede primero ser translocado al hígado por circulación vía porta<sup>(22)</sup>. En el caso de la administración por vía oral, existe la

barrera gastrointestinal; y la estabilidad del agente químico al pH del estómago, las enzimas del estómago y del intestino y a la flora intestinal es de gran importancia ya que las modificaciones que tenga el compuesto dependerá su absorción y por lo tanto su toxicidad.

En el caso de los alcaloides contenidos en *Erythrina americana* se observa que por vía intraperitoneal causan un efecto dañino, mientras que esa misma dosis por vía oral no presenta el mismo efecto, esto puede deberse a que estos alcaloides se destruyen por el pH del estómago o bien las modificaciones que sufren impiden que se absorban y por lo tanto que ejerzan un efecto tóxico.

Otro aspecto que se debe considerar es que en el estudio de Sotelo (1993)<sup>(18)</sup>, donde se reporta el dato de 1375 mg/kg de peso corporal; se realiza la administración de un extracto salino de los alcaloides contenidos en la semilla de *Erythrina americana*, mientras que en el presente proyecto se administró la harina de las diferentes muestras, mediante una suspensión en carboximetilcelulosa, por lo que la concentración de alcaloides fue menor en nuestro caso y por lo tanto el efecto observado no fue el mismo.

Los resultados de las pruebas preliminares de toxicidad por vía oral para el germinado y el ejote pueden observarse en la Tabla 1. Todos los animales que murieron presentaron los mismos síntomas que los de la semilla madura, morían en menos de 5 minutos y presentaban convulsiones y anoxia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas de toxicidad aguda.

Los resultados para las pruebas de toxicidad aguda pueden observarse en la Tabla 2. Los animales que murieron lo hicieron de la misma manera que los de las pruebas preliminares, en menos de 5 minutos después de la administración, presentaban convulsiones leves, anoxia y finalmente muerte, los que no morían en ese instante se recuperaban totalmente aunque hubieran presentado los síntomas anteriores.

Tabla 2. Tabla Dosis-Respuesta (vía oral) para la determinación de la Dosis Letal Media en muestras de *Erythrina americana*.

MUESTRA	DOSIS (mg/kg p.c.)	ANIMALES TRATADOS/ANIMALES MUERTOS	PORCENTAJE DE MORTALIDAD
Semilla madura	6000	6 / 0	0.00
	8000	5 / 1	20.00
	10000	6 / 2	33.33
	15000	6 / 4	66.66
Germinado	10000	11 / 1	9.10
	12500	11 / 0	0.00
	15000	11 / 4	36.40
	18000	5 / 1	20.00
Ejote	8000	6 / 1	16.67
	10000	6 / 1	16.67
	12500	6 / 1	16.67
	15000	9 / 2	22.22

Cabe mencionar que los alcaloides presentes en *Erythrina americana* tienen una acción similar que el curare (Conjunto de alcaloides de las plantas de los géneros *Strychnos* y *Chondrodendron*), cuya intoxicación provoca contracciones musculares violentas haciéndose cada vez más leves hasta la parálisis.<sup>(17)</sup> Por otro lado, la  $\beta$ -eritroidina

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tiene acción paralizante en las terminaciones nerviosas de los músculos causando muerte por asfixia consecuencia de la parálisis de los músculos que intervienen en la respiración.

Con los datos anteriores se calculó la DL<sub>50</sub> para cada una de las muestras y los resultados pueden observarse en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Resultados de la evaluación de la Dosis Letal Media por vía oral, para muestras de *Erythrina americana* en diferentes fases de desarrollo.

MUESTRA	DOSIS LETAL MEDIA (DL <sub>50</sub> )
Semilla madura	12 000 mg/kg de peso corporal
Germinado	28 000 mg/kg de peso corporal
Ejote	78 000 mg/kg de peso corporal

Los resultados anteriores, permiten observar que la semilla madura es la más tóxica, seguida del germinado y el ejote, el cual puede considerarse como inocuo a corto plazo, dada su alta dosis letal media, sin embargo falta realizar estudios de toxicidad subaguda o crónica para identificar los efectos a largo plazo y definir su utilización como alimento para animales.

### *Quantificación de alcaloides*

La técnica original permitió obtener una concentración de alcaloides en la semilla seca de  $0.563 \pm 0.093$  g de alcaloides/100 g de muestra, mientras que por la técnica modificada se obtuvieron  $0.715 \pm 0.034$  g de alcaloides/100 g de muestra, es decir que se logró una extracción de aproximadamente un 22% más con la técnica modificada que con la original.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la reproducibilidad de la técnica modificada pueden observarse en la Tabla 4, y los del porcentaje de recuperación durante la titulación, en la Tabla 5. Estos resultados nos indican que la técnica presenta un coeficiente de variabilidad de 4.73%, el cual puede considerarse aceptable y el porcentaje de recuperación fue del 75.47%. El porcentaje de recuperación se considera bajo, sin embargo puede explicarse debido a que la técnica presenta muchos pasos, por lo que si se desea validarla se propone disminuir los pasos, observando los puntos críticos, y de esta manera incrementar la recuperación. Otro aspecto importante es realizar la determinación con  $\beta$ -eritroidina, y no con alcaloides similares, para obtener el porcentaje de recuperación real para los alcaloides presentes en *Erythrina americana*.

**Tabla 4.** Resultados del porcentaje de reproducibilidad de la técnica para la cuantificación de alcaloides en *Erythrina americana*, de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del año 2000

MUESTRA (g)	VOLUMEN DE H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> GASTADO (ml)	g DE ALCALOIDES/100 g DE MUESTRA
5.0082	6.2	0.715
5.0212	6.0	0.690
5.0073	6.8	0.785
5.0123	6.3	0.726
5.0120	6.0	0.692
5.0270	6.1	0.701
5.0008	6.0	0.693
	<b>Promedio</b>	<b>0.715</b>
	<b>Desviación estándar</b>	<b>0.0338</b>
	<b>Coficiente de variabilidad</b>	<b>4.73 %</b>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 5.** Resultados para el porcentaje de recuperación de la técnica para la cuantificación de alcaloides en *Erythrina americana*, de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del año 2000

PESO INICIAL ATROPINA (g)	VOLUMEN DE H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> GASTADO (ml)	ATROPINA OBTENIDA POR TITULACIÓN (g)	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN
0.0175	2.47	0.0138	78.86
0.0174	2.20	0.0122	70.12
0.0031	0.43	0.0024	77.42
<b>Promedio</b>			<b>75.47</b>
<b>Desv. Estándar</b>			<b>4.69</b>
<b>Coef. De variabilidad</b>			<b>6.21 %</b>

Los resultados de la cuantificación de alcaloides presentes en las tres muestras de *Erythrina americana*: Semilla, germinado y ejote, pueden observarse en la Tabla 6 y en la Tabla 7 se muestra una comparación de los resultados reportados en referencias anteriores con los obtenidos en esta investigación.

**Tabla 6.** Resultados de la determinación de alcaloides totales en muestras de *Erythrina americana*, en diferentes fases de desarrollo, mediante la técnica de titulación.

MUESTRA	g DE ALCALOID/100 g DE HARINA (BASE SECA)	g DE ALCALOID/100 g DE MUESTRA FRESCA
<b>SEMILLA MADURA</b>		
1	1.088	1.007
2	1.036	
3	1.043	
<b>Prom. ± Des. Est.</b>	<b>1.056 ± 0.028</b>	
<b>Coef. De variabilidad</b>	<b>2.67 %</b>	
<b>EJOTE</b>		
1	0.628	0.097
2	0.678	
3	0.704	
<b>Prom. ± Des. Est.</b>	<b>0.670 ± 0.039</b>	
<b>Coef. de variabilidad</b>	<b>5.77 %</b>	
<b>GERMINADO</b>		
1	1.110	0.225
2	1.112	
3	1.073	
<b>Prom. ± Des. Est.</b>	<b>1.098 ± 0.022</b>	
<b>Coef. De variabilidad</b>	<b>2.00 %</b>	

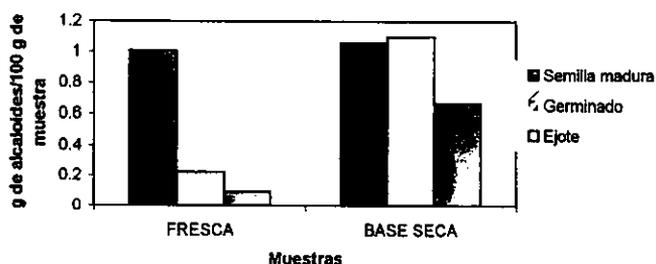
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 7.** Comparación de resultados obtenidos para la cuantificación de alcaloides de semillas de *Erythrina americana*.

REFERENCIA	ALCALOIDES TOTALES (g DE ALCALOIDES/100 g DE MUESTRA SECA)
Arzac (1994)	1.498
Barrera (1958)	1.630
Sotelo (1993)	0.530
García-Mateos (1996)	1.050
García-Mateos (1998)	0.001
García-Mateos (1999)	0.001
Garín-Aguilar (2000)	0.571
<b>Este trabajo</b>	<b>1.056</b>

Para una mejor interpretación de los resultados de cuantificación de alcaloides se muestra la figura 5.

**Figura 5.** Contenido de alcaloides en *Erythrina americana*



La semilla madura es la que presenta un mayor contenido de alcaloides, seguida del germinado, siendo el ejote el que presenta menor contenido de alcaloides. Se realizaron pruebas de Análisis de Varianza con estos resultados, obteniendo que entre la semilla madura y el germinado no existe diferencia significativa, comparando las muestras en base seca; sin embargo al comparar la semilla madura con la muestra de germinado

fresco, se obtiene que sí hay diferencia significativa entre ellos, lo cual es de esperarse, ya que el germinado contiene un alto porcentaje de humedad (79.50%) y el contenido de alcaloides disminuye al considerar esta humedad.

En cuanto al ejote, existe diferencia significativa entre todas las muestras con las que se comparó, siendo ésta la fase que presenta menor contenido de alcaloides, lo cual se debe también al alto contenido de humedad (85.56%) y su gran contenido de fibra (23.79%).

Al comparar los resultados obtenidos anteriormente para la muestra de semilla madura, se observa que el resultado de esta investigación es similar al obtenido por Arzac<sup>(17)</sup>, Barrera<sup>(16)</sup> y García-Mateos (1996)<sup>(8)</sup>, sin embargo difiere del obtenido por Sotelo<sup>(18)</sup> y Garín-Aguilar<sup>(4)</sup>, pero la diferencia no es tan grande como al compararlo con los resultados de García-Mateos (1998 y 1999)<sup>(9,15)</sup>. Las diferencias pueden deberse a la variedad de semillas empleadas, así como a los diferentes métodos de extracción y de cuantificación empleados.

Por otro lado, en cuanto al ejote sólo se tiene el dato de García-Mateos (1996)<sup>(8)</sup>, donde reporta para la vaina inmadura de 30 días, 0.39 g de alcaloides/100 g de muestra seca, y en este trabajo se obtuvieron 0.67 g alcaloides/100 g de muestra seca, pero García-Mateos no especifica si trabajó con la semilla, la vaina o el ejote completo.

Otro aspecto importante a considerar es que al relacionar los resultados de toxicidad aguda y los de cuantificación de alcaloides, se encontró que efectivamente la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

semilla madura es la que contiene el mayor contenido de alcaloides y resulta ser la más tóxica; mientras que el ejote tiene la menor concentración de alcaloides y es el menos tóxico. En cuanto al germinado, se observa que es menos tóxico que la semilla madura a pesar de que en su contenido de alcaloides no existe diferencia significativa; esto puede deberse a un cambio en el tipo de alcaloides durante la germinación, predominando alcaloides tóxicos (como  $\beta$ -eritroidina) en la semilla madura.

Por lo tanto, el ejote podría ser empleado como alimento para animales monogástricos o rumiantes, sin embargo falta realizar un estudio de toxicidad a largo plazo y estudios de digestibilidad para definir su utilización. La semilla madura y el germinado no se consideran aptos para emplearse como alimento debido a su alto contenido de alcaloides.

# **CAPITULO VI**

# CONCLUSIONES

- ⇒ Por administración oral o intraperitoneal de muestras de *Erythrina americana*, la muerte se produce casi inmediatamente debida a asfixia, consecuencia de la parálisis de los músculos que intervienen en la respiración.
  
- ⇒ La semilla seca de *Erythrina americana* mostró la mayor toxicidad, seguida por el germinado y siendo el ejote prácticamente inocuo en pruebas de toxicidad a corto plazo.
  
- ⇒ La técnica descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para cuantificación de alcaloides por titulación, debe ser adaptada cuando se quiere determinar alcaloides en leguminosas.
  
- ⇒ La técnica adaptada presentó un coeficiente de variabilidad de 4.73% y un porcentaje de recuperación de 75.47%.
  
- ⇒ El contenido de alcaloides totales fue semejante en la semilla y el germinado, siendo más bajo en el ejote.

- ⇒ En el germinado y la semilla madura existe diferencia en la toxicidad aguda, a pesar de que ambas muestras contienen una concentración semejante de alcaloides, lo cual sugiere un cambio en el tipo de alcaloides durante la maduración de la semilla.
  
- ⇒ La semilla madura y el germinado de *Erythrina americana* no se consideran aptos para su utilización como alimento para animales debido a su alta concentración de alcaloides y su alta toxicidad.
  
- ⇒ El ejote de *Erythrina americana* puede considerarse como un potencial alimento para animales, debido a su baja toxicidad y baja concentración de alcaloides. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de toxicidad a largo plazo.

**DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE ACUERDO AL  
MÉTODO AOAC 934.01<sup>(23)</sup>**

*Fundamento.*

Este método se basa en la pérdida de humedad de una muestra cuando a ésta se le aplica calor. Si esta determinación se realiza a presión reducida, el punto de ebullición del agua se abate y es menor el daño que sufre la muestra por efecto de la temperatura.

*Material.*

Estufa de vacío LAB-LINE Instruments, Inc.

Charolas de aluminio.

Desecador.

Balanza analítica Sartorius Tipo A210P.

*Procedimiento.*

Se pone a peso constante la charola de aluminio, introduciéndola en la estufa de vacío de 1 a 2 horas a 60-65 °C. Una vez que está la charola a peso constante, se pesan en la misma de 2 – 5 g de muestra molida y homogénea. Se mete la charola a la estufa de vacío a temperatura entre 60-65 °C durante cuatro horas aproximadamente. Se saca la charola, se coloca en el desecador y se deja enfriar hasta llegar a temperatura ambiente.

Posteriormente se pesa. Se repite el mismo procedimiento hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de más de 0.001 g.

*Cálculos.*

$$\% H = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

P<sub>i</sub> = Peso de la charola mas la muestra húmeda (g)

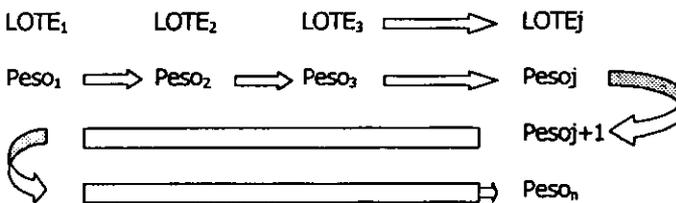
P<sub>f</sub> = Peso de la charola mas la muestra seca (g)

m = Peso de la muestra (g)

**MÉTODO DE "CULEBRA JAPONESA"**  
**PARA LA DISTRIBUCIÓN DE ANIMALES<sub>(28)</sub>**

El método de la "culebra japonesa" se aplica con el objeto de distribuir un conjunto de animales en un determinado número de grupos o lotes de tal forma que se tenga la menor variabilidad posible en los mismos.

En este método, los animales se pesan al azar, posteriormente se ordenan en forma ascendente o descendente (dependiendo de las condiciones del experimento) con base en su peso corporal. Se recomienda pesar un número de animales mayor que al que se vaya a emplear en el estudio, de tal forma que los animales con mayor y menor peso (los extremos superior e inferior de la campana gaussiana) queden eliminados al ajustar el número de animales a sus lugares correspondientes en los lotes. Finalmente, los animales se distribuyen en dichos lotes de manera zigzagueante como se muestra a continuación:



Donde:

$$Peso_1 < Peso_2 < Peso_3 \dots < Pesoj < Peso_{j+1} \dots < Peso_n$$

## DEFINICIONES UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO

### DE TOXICIDAD AGUDA .(29,30,31)

*ANOXIA.* Falta de una cantidad suficiente de oxígeno en el cuerpo. Dificultad para respirar.

*AGRESIVIDAD.* Individuo cuyo patrón conductual se caracteriza por irritabilidad, accesos de ira y actitudes o actos destructivos como manifestaciones de frustración.

*ALETARGAMIENTO.* Estado de somnolencia enfermiza, profunda y prolongada, sin fiebre ni infección.

*ATAXIA.* Inseguridad de movimiento como consecuencia de la falta de una actuación coordinada de los músculos. Es consecuencia de una lesión en el cerebelo, parte que ayuda a controlar el equilibrio.

*CIANOSIS.* Coloración azul-púrpura de las mucosas y de la piel debida a la presencia de cantidades excesivas de hemoglobina reducida en los capilares.

*CIFOSIS.* Curvatura angular de la columna vertebral; la convexidad de la curva es posterior, suele estar en la región torácica y abarca algunas vértebras.

*DISNEA.* Respiración difícil o acelerada.

*ERECCIÓN CAUDAL.* Estado turgente de la cola.

*EXCITACIÓN.* En este estudio fue utilizada como sinónimo de hiperactividad

*HIPOTERMIA.* Estado en el que la temperatura del cuerpo es más baja de lo normal.

*LORDOSIS.* Curvatura hacia adelante de la columna vertebral lumbar.

*PILOERECCIÓN.* Erección del pelo.

---

**TÉCNICA PARA DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES. FARMACOPEA DE  
LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS DEL AÑO 2000 (MGA 0051)<sup>(5)</sup>**

Se basa en la extracción de los alcaloides, aprovechando sus propiedades de partición, en un sistema de disolventes y su valoración posterior por volumetría o gravimetría.

**RECOMENDACIONES ESPECIALES.** Si el residuo del alcaloide obtenido por cualquiera de los métodos de extracción contiene grasa, disolverlo en 15 ml de éter y en 5 ml a 10 ml de solución 0.1 N de ácido sulfúrico o clorhídrico, evaporar el éter con agitación continua con una varilla de vidrio y filtrar la solución ácida a través de papel filtro recibiendo en un embudo de separación. Repetir la extracción del residuo grasoso 2 ó 3 veces con el ácido diluido, lavar perfectamente el papel filtro con el ácido diluido, reunir los lavados con la solución acuosa y continuar en ésta la purificación del alcaloide. Cuando se usen alícuotas, medir el disolvente y la alícuota a la misma temperatura. En el caso de líquidos volátiles realizar la operación a baja temperatura y lo más rápido posible para evitar la pérdida por evaporación. Para el ensayo de extractos fluidos, tinturas y otras preparaciones que contienen alcaloides, es necesario evaporarlos a sequedad; para evitar pérdidas y ayudar a la evaporación, añadir algún material adsorbente. Para este propósito usar pulpa de papel previamente lavada con ácido, álcali, lavada hasta neutralización con agua y secada antes de su uso. Agitar o rotar la solución acuosa con el disolvente inmiscible en un embudo de separación durante 1 minuto. Evitar la agitación prolongada o violenta para evitar la formación de emulsiones, especialmente en soluciones alcalinas. Las hojas de belladona algunas veces contienen saponinas que causan problemas de emulsión, cuando

esto sucede, desechar la porción emulsionada y añadir un exceso de cualquiera de los disolventes. Esto usualmente rompe la emulsión y permite una separación completa. Una emulsión formada puede romperse por la adición de una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro; en este caso, lavar el residuo con una porción adicional del disolvente para remover completamente el alcaloide.

**PROCEDIMIENTO.** Triturar la muestra hasta el tamaño de partícula indicado en la monografía del producto; evitar que la muestra pierda agua durante la trituración. Si es imposible evitar la pérdida de agua, secar la muestra a una temperatura baja, antes de triturarla, anotar la pérdida de agua y hacer la corrección en los cálculos finales. Una vez triturada la muestra, proceder como se indica en *MGA 0891*, seleccionando la malla de acuerdo al tamaño de las partículas o a la indicada en la monografía del producto y no desechar ninguna porción de muestra al tamizarla, a menos que se indique otra cosa. Pesar el equivalente a 100 mg ó 200 mg de alcaloide contenido en la muestra. Cuando la muestra es pastosa deberá pesarse en papel encerado o papel pergamino previamente puesto a peso constante; cortar el papel excedente y transferir el papel con la muestra a un vaso de precipitados que contenga el disolvente o la mezcla de disolventes especificada en la monografía del producto. Pasar el contenido del vaso de precipitados a un embudo de separación, lavar el vaso con el disolvente empleado y adicionar los lavados al embudo de separación.

### EXTRACCIÓN. \*

**MÉTODO No. 1. POR MACERACIÓN.** Tratar la porción de la muestra pesada con el disolvente o mezcla de disolventes indicada en la monografía del producto, alcalinizar la muestra con SR (Solución reactivo) de amoniaco y agitar vigorosamente. Dejar macerar de 12 a 24 horas con agitación ocasional o por un periodo corto con agitación continua. Al término de la maceración dejar sedimentar la muestra y decantar el disolvente que será utilizado en la purificación.

**MÉTODO No. 2. POR PERCOLACIÓN.** Colocar la porción de muestra pesada, en un vaso de precipitados, impregnar con el disolvente o mezcla de disolventes indicados en la monografía del producto, dejar reposar por 5 minutos, alcalinizar la mezcla con SR de amoniaco y mezclar perfectamente. Transferir la mezcla a un percolador cilíndrico, previamente preparado con una porción de algodón en el orificio de salida. Lavar el vaso con una pequeña cantidad de disolvente, adicionar los lavados al percolador. Dejar macerar la mezcla de 1 a 12 horas, dependiendo del alcaloide que se va a extraer; empacar la muestra firmemente con una torunda de algodón y percolar con el disolvente hasta que la muestra quede libre de alcaloides; para comprobar que ya se ha extraído, evaporar a sequedad 4 ml del menstrio sobre BV (Baño de vapor), disolver el residuo en aproximadamente 500  $\mu$ l de solución 0.5 N de ácido clorhídrico, adicionar una gota de SR de Valser (SR de yoduro mercuríco); si la solución es turbia proseguir con la extracción, si es clara, suspenderla. Proseguir con la purificación.

\* En esta investigación sólo se trabajó la extracción por maceración (con las modificaciones indicadas en la página 30); sin embargo el método por extracción continua podría ser más efectivo debido a que existe un cambio continuo del disolvente.

**MÉTODO No. 3. POR EXTRACCIÓN CONTINUA.** Humedecer la muestra pesada con el disolvente indicados en la monografía del producto, mezclar la muestra con una varilla de vidrio y dejar reposar durante 5 minutos; alcalinizar adicionando SR de amoníaco, lavar la varilla con una porción del disolvente, macerar de 6 a 12 horas. Pasar la muestra a un cartucho de extracción y colocarlo en un extractor Soxhlet, empaçar el cartucho con algodón purificado y adicionar suficiente disolvente al receptor del aparato, hacer la extracción del alcaloide por el tiempo indicado en la monografía respectiva o hasta que la extracción sea completa. Proseguir con la purificación.

### **PURIFICACIÓN.**

Verter el extracto obtenido por cualquiera de los métodos anteriores a un embudo de separación, lavar el recipiente que lo contenía con el disolvente o mezcla de disolventes indicados en la monografía del producto, adicionar aproximadamente 12 ml de solución 1 N de ácido sulfúrico y agitar vigorosamente para hacer la extracción del alcaloide. Si la muestra contiene gran cantidad de grasa, adicionar un pequeño volumen de ácido clorhídrico o sulfúrico 0.1 N para prevenir la emulsión de la mezcla. Continuar con las extracciones utilizando 5 ml de agua y 5 ml de solución 1 N de ácido clorhídrico o sulfúrico en cada una, hasta que 0.5 ml del último lavado de ácido no produzca turbidez al adicionarle una gota de SR de Valser (SR de yoduro mercúrico). Si los extractos ácidos no son claros, filtrarlos o agitarlos con una o más porciones de 10 ml de disolvente o mezcla de disolventes indicada en la monografía del producto hasta que la solución sea clara. Lavar el disolvente usado con agua acidificada y adicionar estos lavados a la solución ácida. Alcalinizarla con SR de amoníaco. Continuar la extracción de la solución alcalinizada

con el disolvente o mezcla de disolventes indicados en la monografía del producto, utilizando un pequeño volumen de disolvente en cada extracción, pero que sea menor de la mitad de la solución alcalina. El número de extracciones dependerá del alcaloide de que se trate. Para comprobar que la extracción ya es completa evaporar 1 ml del disolvente de la última extracción y disolver el residuo con 0.5 ml de solución 0.5 N de ácido clorhídrico, adicionar 1 gota de SR de Valser, la solución resultante no debe ser turbia. El material que estuvo en contacto con el alcaloide, se debe lavar perfectamente con el disolvente y adicionar estos lavados a los extractos que lo contienen.

#### **VALORACIÓN.**

**POR TITULACIÓN RESIDUAL.** Evaporar cuidadosamente los extractos combinados del alcaloide, sobre BV o con ayuda de corriente de aire, hasta aproximadamente 10 ml. Adicionar una cantidad medida en exceso de la necesaria de solución 0.02 N de ácido sulfúrico y continuar la evaporación hasta eliminar el disolvente, enfriar la mezcla, adicionar unas gotas de SI (Solución Indicadora) de rojo de metilo y titular el exceso del ácido con solución 0.02 N de hidróxido de sodio. El punto final de la titulación también puede determinarse potenciométricamente.

**POR TITULACIÓN DIRECTA.** Evaporar cuidadosamente hasta sequedad los extractos combinados de alcaloides sobre BV o con ayuda de corriente de aire. Disolver el residuo en aproximadamente 2 ml de metanol o éter previamente neutralizados, calentar la mezcla suavemente si es necesario, adicionar unas gotas de SI de rojo de metilo y titular con solución 0.02 N de ácido sulfúrico hasta que desaparezca el color rosa. Si el alcaloide

no está completamente disuelto, calentar suavemente hasta completa disolución, adicionando 40 ml aproximadamente de agua recientemente hervida y fría, continuar hasta que la titulación sea completa. El punto final de la determinación también puede determinarse potenciométricamente.

**POR GRAVIMETRÍA.** Evaporar cuidadosamente hasta sequedad los extractos combinados del alcaloide, sobre BV o con ayuda de corriente de aire. Si el disolvente final es cloroformo se debe evitar la pérdida del alcaloide durante la evaporación, adicionando una pequeña cantidad de etanol, después que la solución se ha reducido a un volumen aproximado de 1 a 2 ml, continuar la evaporación a temperatura baja, rotando el recipiente, remover los residuos de cloroformo adicionando una pequeña cantidad de etanol o éter previamente neutralizado y continuar la evaporación. Secar los residuos del alcaloide a 105 °C hasta peso constante.

**CALCULOS.** Efectuar los cálculos como se indica en la monografía correspondiente. Para los alcaloides de *Erythrina* se considera la β-eritroidina por ser el alcaloide más abundante.

$$\text{g de } \beta\text{-eritroidina/100 g de muestra} = \frac{(A - B) (N_{\text{H}_2\text{SO}_4}) (273.32^*) (100)}{(\text{g de muestra}) (1000^{**})}$$

A = ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gastados por la muestra.

B = ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gastados por un blanco (7 ml de agua destilada y 3 ml metanol).

\* Este es el peso molecular de la β-eritroidina.

\*\* Para realizar el cambio de unidades (mg a g).

# **CAPITULO VII**

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Hernández P. E., Una perspectiva en la alimentación animal, análisis bromatológico y de constituyentes tóxicos de las compuestas *Polymnia maculata* y *Trigonospermum annuum*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., 1989, pp. 3
2. Guerrero R. L. M., Estudio comparativo de la composición química y los factores tóxicos de dos variedades de *Erythrina* (*Erythrina breviflora* y *Erythrina americana*), Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 1980, pp. 1, 4-6, 15-17, 23-24, 30-33, 36-37.
3. Ramírez R. G., Cambios en la composición química y contenido de tóxicos en el fruto de colorín (*Erythrina americana*) durante su maduración, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 1996, pp. 1-3, 5-10, 22-26.
4. Garín-Aguilar M., Ramírez E., Soto-Hernández M., Valencia del Toro G., Martínez-Vázquez M., Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill on aggressive behavior in rats, *J. ethnopharmacol.*, 2000, 69(2):189-196.
5. Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo 1, México D.F., 7ª edición, 2000, pp. 184-185.

6. Coenders, Química Culinaria. Estudio de lo que les sucede a los alimentos antes, durante y después de cocinarlos, Acribia, Zaragoza, 1996, pp. 93-95.
7. Charley H., Tecnología de Alimentos. Procesos Químicos y Físicos en la Preparación de Alimentos, Limusa, México D.F., pp. 623-633.
8. García-Mateos R., Lucas B., Zendejas M., Soto-Hernández M., Martínez M., Sotelo A., Variation of the Total Nitrogen, Non-protein Nitrogen Content and Types of Alkaloids in Different Stages of Development in *Erythrina americana* Seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44:2987-2991.
9. García-Mateos R., Soto-Hernández M., Martínez-Vazquez M., Villegas-Monter A., Isolation of Alkaloids of *Erythrina* from Tissue Culture, *Phytochem. Anal.*, 1999, 10:12-16.
10. O' Gorman H., Plantas y Flores de México, Dirección General de Publicaciones UNAM, México D.F., 1993, pp. 24-25.
11. Jiménez V. L., Eliminación de los componentes tóxicos de dos semillas del género *Erythrina* y su evaluación bromatológica, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 1994, 1, 3-4, 10, 12-13, 48,59,68-69.

12. Bruneton J., Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia, Acribia, Zaragoza, 1991, pp. 355-366.
13. Goodwin & Mercer, Introduction to Plant Biochemistry, Pergamon Press, Oxford, 2a. Edición, 1983, pp. 480-481, 526-527.
14. Ikan R., Natural Products. A Laboratory Guide, Academic Press, San Diego California, 2ª Edición, 1991, pp. 226-227.
15. García-Mateos R., Soto-Hernández M., Kelly D., Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico, *Bioch. System. Ecol.*, Vol. 26, 1998, pp. 545-551.
16. Barrera E. M. M., Valoración de alcaloides en colorín, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 1958, pp. 30-36, 38-39.
17. Arzac B. M. A., Estudio comparativo de la *Erythrina americana* (colorín común) con el curare, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 1934, pp. 15-29, 35-40, 43-47.
18. Sotelo A., Soto-Hernández M., Lucas B., Giral F., Comparative Studies of The Alkaloidal Composition of Two Mexican *Erythrina* Species and Nutritive Value of the Detoxified Seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41:2340-2343.

19. Lu F. C., Toxicología Básica. Riesgos por exposición a sustancias tóxicas, Harla, México D. F., 1992, pp. 1-7, 55-62, 99-105.
20. Jauge P., Nociones Básicas de Toxicología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, México D.F., 1985, pp. 3-16, 19-23, 29-41, 44-64.
21. Loomis T. A., Essentials of Toxicology, Lea & Febireg, Philadelphia, 3ª edición, 1978, pp. 13-23, 67-79, 195-209.
22. Conca T. A., Evaluación Química y Biológica de la Grasa Cruda y Destoxificada de Dos Semillas de *Erythrina* Mexicanas, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM, México D.F., 1995, pp. 9-10, 51, 72-80.
23. AOAC, Official Methods of Analysis of the AOAC, 15<sup>th</sup> ed., AOAC, Arlington, VA, 1990, Cap. 4, pp. 1.
24. Flores Del Valle N. I., Evaluación nutricional y toxicológica del ejote de colorín (*Erythrina americana*), después de ser sometida a un proceso de cocción, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. (En imprenta).
25. Barastegui A. C., Esquemas y Prácticas de Farmacología, Espax, Barcelona, 1977, pp. 17-46.

26. Litchfield J. T., Wilcoxon F., A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments, *Pharmacol. Exp. Therap.*, 1949, 96:99-113.
27. Derache R., Toxicología y Seguridad de los Alimentos, Ediciones Omega, Barcelona, 1990, pp. 33-62.
28. Téllez G. R., Evaluación de toxicidad aguda y subaguda de la fracción lipídica de la almendra de calabaza (*Cucurbita pepo*), Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 1999, pp. 99-100.
29. Gennaro A., Hart A., Nora J., Stander R., Weiss L., Diccionario Enciclopédico de las Ciencias Médicas, Vol. 1-4, Mc Graw-Hill, México D.F., 4ª Edición, 1984, pp. 154, 269, 495, 518, 712, 1076.
30. García-Pelayo, Gross R., Diccionario Enciclopédico Larousse, Ediciones Larousse, México D.F., 5ª Edición, 1982, pp. 432.
31. Ortiz Q. F., Enciclopedia Médica Familiar, Vol. 3, 4 y 8, Editorial Televisión, México D.F., 1992, pp. 172, 208, 498-499.