

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Validación de la técnica de alcaloides totales por titulación y
estudios de citotoxicidad en colorin (*Erythrina americana*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Vanessa Torres Mendoza

MÉXICO, D.F.

2006



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:

Presidente Prof. Angela Sotelo López

Vocal Prof. Pedro Valle Vega

Secretario Prof. Inocencia Maria de Lourdes Flores Tellez

1er sup. Prof. Leticia Gil Vieyra

2do sup. Prof. Rosa Maria Argote Espinosa

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111 Edificio E Facultad de Química UNAM

Laboratorio 202 Edificio B Facultad de Química UNAM

Asesor del tema

Supervisor técnico

Angela Sotelo López

José Dolores Solano Becerra

Sustentante

Vanessa Torres Mendoza

AGRADECIMIENTOS

A la M en C. Ángela Sotelo López, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por su apoyo, confianza y ejemplo.

Al M en C. José Solano Becerra, por sus enseñanzas, paciencia y amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo económico brindado en la realización de este proyecto.

A la UNAM por los valores y conocimientos que me heredó durante estos años de ser orgullosamente Universitaria

A la Facultad de Química por la formación académica que me permitirá desarrollarme profesionalmente.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme la vida, por darme la oportunidad de elegir mi camino y por permitirme vivir los momentos buenos y no tan buenos.

A MI MAMÁ Y A MI PAPÁ

Por su cariño, ejemplo, apoyo y comprensión día a día. Gracias por creer en mí, por enseñarme a siempre dar lo mejor y por impulsarme a lograr mis sueños.

A MI PRIMA SOFÍA

Por darle un giro a mi vida, “peque” siempre tendrás a tu “hermanita mayor” para cuidarte y aconsejarte.

A MI FAMILIA

Por su cariño, apoyo y comprensión incondicional.

A TODOS LOS QUE CONOCÍ EN EL LABORATORIO 111

Por las enseñanzas y palabras de aliento. Gracias por hacer más ligero el trabajo diario y por brindarme su amistad.

A FERNANDO E HIRAI

Por brindarme su amistad desde los primeros instantes en la Facultad, espero sigamos acumulando recuerdos.

A ARMANDO Y ENRIQUE

Por demostrarme que los hermanos no son sólo los que comparten la misma sangre. Gracias por su cariño y consejos.

A MIS AMIGOS

LOS NO QUÍMICOS, por estos años de amistad y apoyo.

LOS QA´S, por todos los momentos que vivimos dentro y fuera del salón de clases.

LOS QFB´S, por recordarme que para ser amigos no es necesario el compartir clases. Gracias por “adoptarme”.

LOS DEL GRUPO DE AFROANTILLANO, porque unos minutos en el escenario implican muchos mas fuera de él. Gracias por compartirme su alegría y entusiasmo.

A SALVADOR

Porque de tu mano la vida se ve mucho mejor. Gracias por el amor, apoyo y confianza que me das cada día. Sabes que tuyo es mi corazón.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos	3
3. Antecedentes	4
3.1 Leguminosas	4
3.2 <i>Erythrina americana</i>	5
3.3 Alcaloides en <i>Erythrina americana</i>	7
3.4 Validación	11
3.5 Estudios de citotoxicidad	16
4. Parte experimental	18
4.1 Recolección de muestras	18
4.2 Acondicionamiento de muestras	19
4.3 Modificación a la técnica de extracción	19
4.4 Extracción y cuantificación de alcaloides	20
4.5 Validación de la técnica de extracción	23
4.6 Ensayos de citotoxicidad	28
4.6.1 Citotoxicidad en líneas celulares humanas	28
4.6.2 Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	36
5. Resultados y discusión	42
5.1 Adaptaciones a la técnica de extracción	42
5.2 Validación de la técnica de extracción	44
5.3 Contenido de alcaloides totales	54
5.4 Ensayos de citotoxicidad	56
6. Conclusiones	71
7. Bibliografía	73
8. Anexos	79
A. Validación	79
B. Contenido de alcaloides totales	88
C. Mantenimiento de líneas celulares	90
D. Ensayo de citotoxicidad	92

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas ocupan un lugar muy importante en la alimentación mundial ya que representan una fuente de proteína accesible a la población cuando no se pueden consumir alimentos de alto valor nutritivo como son las proteínas de origen animal. Sin embargo, estas semillas contienen factores antinutricionales y factores tóxicos que si no son inactivados o eliminados ejercen efectos indeseables en su valor nutricional.

Dentro del estudio de las leguminosas se ha realizado el seguimiento del colorín o *Erythrina americana*, un árbol perenne de tamaño mediano, usado como ornamento en jardines debido a sus hermosas flores rojas. Este árbol es conocido por las propiedades sedativas de sus semillas, flores, hojas y corteza, la cuales son atribuidas a los alcaloides presentes en las mismas.

Estudios anteriores han revelado que las semillas, la semilla germinada y el ejote de *Erythrina americana* tienen gran valor nutrimental, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas de destoxificación y de cuantificación por cromatografía de los alcaloides presentes en las mismas.

En el presente trabajo se realizó el proceso de validación de la técnica de extracción y cuantificación de alcaloides totales por titulación en colorín, desarrollada a partir de la Farmacopea Mexicana. Dicha metodología representa una alternativa si no se cuenta con la infraestructura necesaria para su cuantificación.

Por otro lado, los extractos de alcaloides de colorín han sido objeto de estudios toxicológicos en diversos organismos. Hasta el momento no se ha reportado su efecto tóxico a nivel celular, por lo que en este trabajo se hicieron los estudios de citotoxicidad de los extractos de flor, semilla inmadura y semilla de colorín en dos líneas celulares humanas y en células normales humanas. Estos estudios nos dieron más información sobre la toxicidad de los alcaloides de colorín y ayudarán a determinar su potencial uso como alimento.

2. OBJETIVOS

General:

Validar la técnica de alcaloides totales por titulación y realizar los ensayos de citotoxicidad de los extractos de flor, semilla inmadura y semilla de colorín (*Erythrina americana*).

Particulares:

- Optimizar la técnica de alcaloides totales por titulación adaptada de la Farmacopea.
- Desarrollar los parámetros que llevarán a la validación de la técnica de alcaloides totales por titulación.
- Obtener los extractos de alcaloides de flor, semilla inmadura y semilla de colorín por la técnica validada.
- Determinar el contenido de alcaloides totales en flor, semilla inmadura y semilla de colorín (*Erythrina americana*) por titulación.
- Realizar los ensayos de citotoxicidad de los extractos de alcaloides de colorín en las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix HeLa y de eritroleucemia K-562.
- Desarrollar la técnica de aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica CMSP.
- Realizar el ensayo de citotoxicidad de los extractos de alcaloides de colorín en CMSP.
- Obtener los valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria de la proliferación del 50 % del cultivo celular) para los extractos de flor, semilla inmadura y semilla de colorín.

3. ANTECEDENTES

3.1 Leguminosas

La familia Leguminosae o Fabaceae está distribuida en más de 650 géneros y se puede encontrar en los más variados hábitats.

Son plantas cuyas semillas se encuentran en vainas. Sus nódulos radiculares, en simbiosis con bacterias, tienen la capacidad de fijar el nitrógeno, lo cual les da importancia agrícola y nutricional.

El elevado contenido proteico en sus semillas las convierte en la principal fuente de proteína vegetal para la mayor parte de herbívoros y omnívoros, y entre estos últimos, para el hombre.[1,2] Son fuente importante de hierro, fósforo, calcio, tiamina y aportan cantidades apreciables de niacina y energía. Aportan buena cantidad de aminoácidos como isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina, además de tener un alto contenido de lisina. Son deficientes en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína.

Muchos factores antinutricionales se encuentran presentes en semillas de leguminosas. La cocción, además de alterar la textura y mejorar el sabor, ayuda a eliminar algunos de estos factores.

Las leguminosas son también empleadas como forrajes, como fuente de colorantes naturales y de gomas de amplio uso en la industria, brindan maderas preciosas y maderas duras para la construcción y fabricación de muebles y algunas aportan materias primas para la industria química y farmacéutica. [3]

3.2 Erythrina americana

Erythrina americana también conocida como colorín, Zompantle o Patol, se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En México se cultiva en terrenos tropicales y medianamente fértiles.

Es un árbol perenne de hasta 10 metros de alto, su tallo es amarillento e irregular; sus hojas son grandes, trifoliadas y con espinas. Su follaje es frondoso y verde claro; en ocasiones se ven ejemplares únicamente con flores, las cuales son de color rojo, alargadas y distribuidas en racimos piramidales. (Figura 1) Su fruto es una legumbre de aproximadamente 20 cm de largo y 2 cm de ancho, con estrangulamiento que limita los lóculos donde se alojan las semillas, que son de color rojo vivo, escarlata o naranja. Su floración y fructificación se da de marzo a abril.[4,5]

Este árbol es usado como ornamento en jardines debido a sus hermosas flores rojas. Su madera se emplea para elaborar artesanías y es conocido por las propiedades sedativas de sus semillas, flores, hojas y corteza. La semilla molida se emplea para curar el dolor de muelas, mientras que las hojas en infusión se emplean para aliviar las molestias de la eripsela, así como antipirético y antivaricoso. [4,6]

En algunas partes de México las flores son consumidas fritas o hervidas lo que elimina la mayoría de los alcaloides presentes en ellas. El alto contenido de alcaloides en las semillas impide su consumo por humanos y animales. [3,4,6]

FIGURA 1 Colorín (*Erythrina americana*)



Árbol



Flor



Colorín

Grabado en cobre 30x30 cm
Eugenia Marcos Turnbull 2000



Ejote y semilla inmadura



Semilla

3.3 Alcaloides en *Erythrina americana*

El término alcaloide fue introducido para designar a las sustancias naturales que reaccionan como bases. [7] Constituyen un grupo de compuestos de estructura compleja con un átomo de nitrógeno involucrado en un heterociclo el cual les da el carácter básico.

Resultan de interés porque presentan actividad farmacológica, fisiológica y psicológica significativa en humanos y animales. [3]

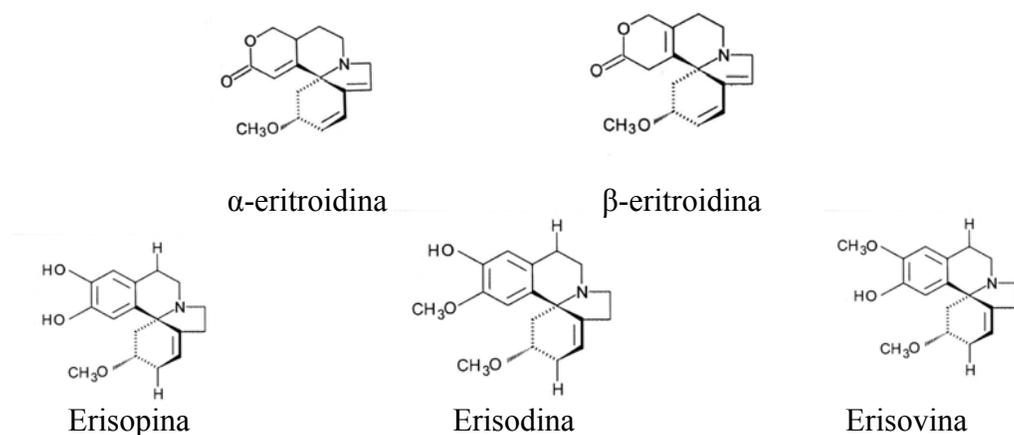
Son tóxicos y mayoritariamente de origen vegetal. Suelen estar localizados en corteza, raíces, hojas, frutas y semillas. Pueden existir libres, en estado de sales o como N-óxidos, combinados con azúcares (ramnosa, galactosa y glucosa) o en forma de ésteres ácidos. [3,8]

Para su extracción se aprovechan sus propiedades de solubilidad, es decir, que en su forma libre son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos; y cuando están en forma de sal son solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos. Su detección se realiza mediante reacciones de precipitación que se basan en la capacidad de los alcaloides de combinarse con metales y metaloides como el bismuto, mercurio, tungsteno y yodo.[7,9]

Se sabe muy poco sobre la función de los alcaloides en los vegetales. Se ha sugerido que actúan como sustancias protectoras contra la agresión de depredadores; que son metabolitos de desecho; que actúan como sustancias de reserva o como reguladores de crecimiento.

La actividad farmacológica de los alcaloides es diversa, actúan como depresores o estimulantes, tienen acción curarizante, de anestésicos locales, como antifibrilantes, antitumorales y amebicidas, entre otras. [7]

Los alcaloides de *Erythrina americana* están formados por un doble anillo de carbono conteniendo un átomo de nitrógeno. Causan parálisis y la muerte al bloquear los receptores de acetilcolina en las uniones sinápticas neuromusculares. Se han identificado principalmente los siguientes: erisovina, erisodina, erisopina, α y β -eritroidina, siendo los dos últimos los responsables de sus efectos tóxicos, tranquilizantes y narcóticos. [10,11]



En 1981, Aguilar y colaboradores, estudiaron los alcaloides en la flor de *Erythrina americana*. Identificaron α y β -eritroidina en 0.034 y 0.11 % respectivamente. A estos les atribuyen la actividad hipnótica de los extractos de la flor. [12]

Sotelo y colaboradores, en 1993, cuantificaron los alcaloides de *Erythrina americana* por cromatografía de gases y los identificaron por espectrometría de masas reportando 0.53 % de alcaloides. Así mismo concluyen que las semillas de *Erythrina americana* tienen gran valor nutricional debido a su alto contenido de proteína, grasa y a su adecuado perfil de aminoácidos. [13]

En 1996, García Mateos y colaboradores midieron el contenido de nitrógeno proteico, y no proteico en flores, ejotes, semillas y vaina sin semilla de *Erythrina americana*, así como el

tipo de alcaloides en los diferentes estado de desarrollo. Encontraron que el contenido de nitrógeno proteico aumenta al pasar de flor a semilla, mientras que el nitrógeno no proteico disminuye con la maduración. Así mismo identificaron por cromatografía la presencia de β -eritroidina como el alcaloide mayoritario en todos los tejidos examinados y la existencia de erisovina y erisodina únicamente en tejidos maduros. [14]

En 1998, García- Mateos y colaboradores, cuantificaron y determinaron la composición de alcaloides en semilla, flores, hojas y cortezas de seis especies de *Erythrina* mediante cromatografía de gases. Reportaron 1.27 mg de alcaloides/ 100 g de muestra seca en la semilla de *Erythrina americana*. [15]

García-Mateos y colaboradores, en 2000, realizaron estudios de toxicidad de los extractos hexánico y metanólico de las semillas de *Erythrina americana* en diferentes organismos (*Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Bacillus cereus*, *Panagrellus redivivus*). Se identificó la presencia de α y β -eritroidina en todas las fracciones, y en la fracción de alcaloides liberados que resultó ser más tóxica se identificó erisopina, erisodina y erisovina. El crustáceo *Daphnia magna* y el nematodo *Panagrellus redivivus* presentaron mayor sensibilidad. [16]

Garín- Aguilar y colaboradores, en 2001, estudiaron el efecto de los extractos hexánico y metanólico de *Erythina americana* en el comportamiento agresivo de ratas, así como DL₅₀ vía intraperitoneal de los mismos. Encontraron que en una dosis de 3 mg / kg las fracciones disminuyen la agresividad de las ratas. [17]

Moreno E., en 2001, utilizó 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*. Reportó en semilla un contenido 1.056 g de alcaloides / 100 g de muestra seca y en el caso del ejote de 0.670 g de alcaloides/ 100 g de muestra seca. Así mismo realizó pruebas de toxicidad aguda vía oral en ratas obteniendo un DL₅₀ de 12 000 mg/ kg de peso corporal para semilla madura y de 78 000 mg/ kg de peso corporal para el ejote. [3]

Sánchez-Herrera y colaboradores, en 2001, estudiaron el contenido y distribución de alcaloides en las flores (cáliz y corola) de *Erythrina americana*. Encontraron que el extracto de cáliz contiene mayor contenido de alcaloides que la corola. En ambos extractos se detectaron α y β -eritroidina mayoritariamente, 8-oxo- α -eritroidina, y eritrinina en menor proporción. También se identificaron eritralina y cristamidina en cáliz y erisodina en corola. [18]

Sotelo y colaboradores, en 2003, investigaron el valor nutritivo y toxicológico de las semillas, las semillas germinadas y de los ejotes de *Erythrina americana* en muestras crudas y hervidas. Concluyeron que debido a la calidad proteica y al bajo contenido de alcaloides las semillas secas hervidas y los ejotes hervidos pueden ser utilizados para alimentación animal. [6]

3.4 Validación [19-22].

Para conocer el contenido de un componente en una muestra se emplea una metodología de medición. Para demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo se recurre a la validación.

La validación de un método se define como el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Esto permite obtención de resultados confiables y cercanos al valor real.

La validez de un método se expresa mediante la evaluación de los siguientes parámetros:

Precisión

Es el grado de concordancia que existen entre resultados individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

Se expresa como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV)

La precisión del sistema es determinado al analizar una solución a un solo nivel de concentración y por sextuplicado. El coeficiente de variación debe ser menor a 1.5 %

La precisión del método o precisión intermedia se obtiene al analizar por triplicado una muestra homogénea o sustancia de referencia en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. El coeficiente de variación debe ser menor al 2 %.

Linealidad

Es la proporcionalidad existente entre la concentración del analito y la respuesta que genera. Generalmente se usa el modelo de la ecuación de la línea recta para su evaluación. También se determina el intervalo dentro del cual se cumple dicha proporcionalidad

La linealidad del sistema es la proporcionalidad de estándares de referencia en el sistema de cuantificación. Se obtienen curvas de calibración en las que se relaciona la respuesta que genera el analito (Y) con la concentración de soluciones estándar del mismo (X). Las curvas de calibración se preparan con al menos 5 niveles de concentración del estándar, con cada nivel, al menos por triplicado.

A través del método de cuadrados mínimos se obtiene la ecuación que describe la tendencia, así como el coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m) y la ordenada al origen (b). El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0,98 para considerar apropiado el modelo lineal.

Además se estima el intervalo de confianza de la pendiente, el cual no debe incluir el cero, pues implicaría que no existe ninguna proporcionalidad entre la respuesta y la concentración. También se calcula el intervalo de confianza de la ordenada al origen, que cuando incluye el cero, se considera adecuado analizar las muestras comparando su respuesta con la generada por un estándar en un solo nivel de concentración.

La linealidad del método es el comportamiento entre la concentración del analito en la muestra y la respuesta obtenida, descrito mediante la ecuación de la línea recta. En este parámetro se debe abarcar la metodología involucrada en la preparación de la muestra.

Se puede evaluar de dos maneras:

- Al conocer la totalidad de los componentes de la matriz donde se encuentra el analito, se prepara un placebo y se adiciona el analito a cuantificar en tres niveles de concentración y por triplicado.
- Al no conocer todos los componentes de la matriz, se utiliza la muestra sin adicionar y adicionando el analito en tres niveles más de concentración, cada uno por triplicado. En cada nivel se debe mantener constante la cantidad de muestra con el fin de restar este resultado de las muestras adicionadas.

Se reporta la cantidad recuperada (Y) en función de la cantidad adicionada (X). Utilizando el método de estimación de mínimos cuadrados, se calcula el valor de la pendiente (m), la ordenada al origen (b), y el cociente de determinación (r^2) que debe ser mayor a 0.98. También se calcula el intervalo de confianza para la pendiente, que debe de incluir el uno, y el intervalo de confianza para la ordenada al origen que debe incluir el cero.

Especificidad

Es la capacidad del método analítico de obtener respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra. La prueba se realiza mediante el análisis de un blanco de la matriz biológica

Exactitud

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del analito. Se realizan al menos seis determinaciones.

El intervalo de confianza para la media del porcentaje de recobro debe incluir el 100 % o el promedio aritmético del porcentaje de recobro debe estar incluido dentro del intervalo dado para el tipo de análisis que se realiza.

Repetibilidad

Esa la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, condiciones, etc.)

Sensibilidad

Es la mínima cantidad que puede producir un resultado significativo. Se define mediante los siguientes parámetros:

- Límite de detección: Es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada en la muestra, más no necesariamente cuantificada, en las condiciones establecidas.
- Límite de cuantificación: Es la mínima concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables.

Estos parámetros pueden ser determinados en base a la relación señal /ruido o mediante la curva de calibración.

3.5 Estudios de citotoxicidad

Todos los seres vivos estamos constituidos por células, las cuales se derivan del crecimiento y división de otras células ya existentes. Las células hijas producidas por divisiones mitóticas entran en caminos separados de desarrollo para formar tejidos, órganos y sistemas.

Una de las formas para llegar a entender los procesos bioquímicos de las células ha sido mediante el estudio de su comportamiento *in Vitro*.

El cultivo de tejidos incluye el cultivo de órganos y células. El cultivo celular se refiere al cultivo derivado de células dispersas obtenido de un tejido por métodos enzimáticos, mecánicos o químicos.

Cuando se logra mantener células aisladas de un organismo vivo durante un tiempo prolongado, a través de varias generaciones se forman las líneas celulares.

El trabajo desarrollado en las ciencias médicas permitió el establecimiento de cultivos de tejidos normales y patológicos obtenidos de humanos. La demostración de que a partir de tumores humanos se pueden producir líneas celulares, aumentó el interés en su uso en la investigación.

Actualmente la aplicación de las técnicas de cultivo de células ha permitido entre otras utilidades, la predicción de la susceptibilidad de las células a drogas, hormonas, agentes inmunológicos, etc. [23]

El ensayo de citotoxicidad permite estudiar el efecto tóxico de una sustancia sobre un tipo determinado de células.

La citotoxicidad es un evento *in vivo* complejo, que se puede expresar mediante una gran variedad de eventos, desde muerte celular hasta complejas aberraciones metabólicas donde no puede darse muerte celular, sólo un cambio funcional. [24]

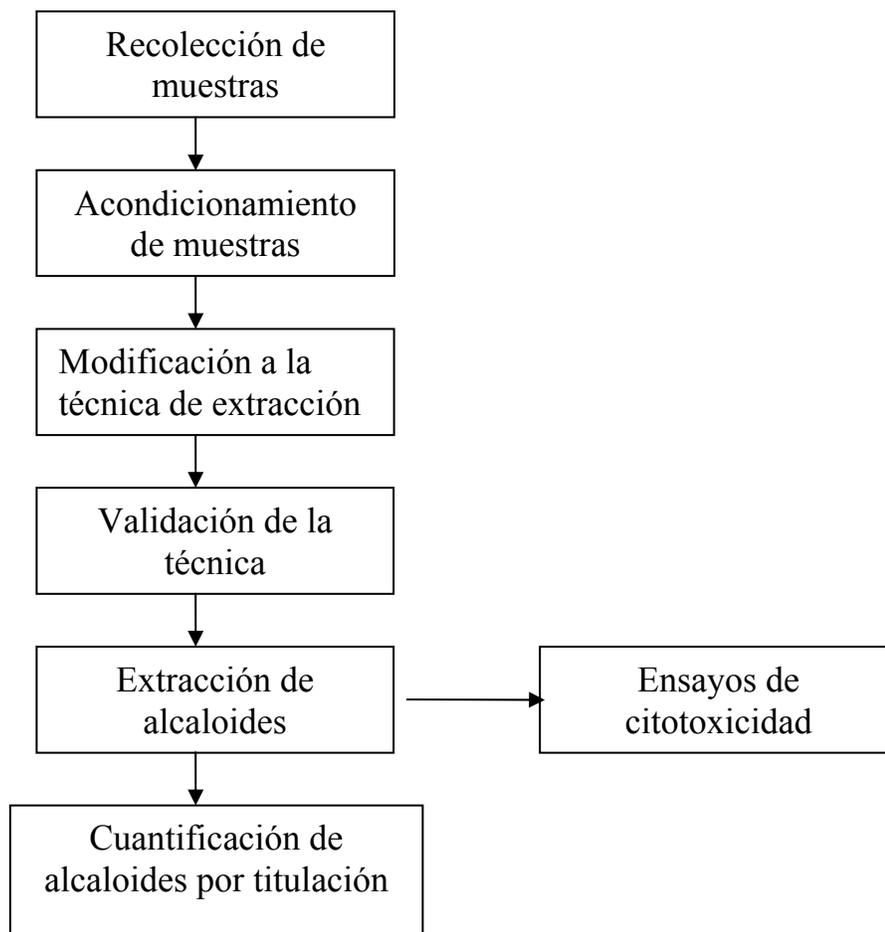
El ensayo consiste en la exposición del cultivo celular al compuesto citotóxico por un periodo de tiempo determinado y la posterior medida de la viabilidad celular.

Los ensayos que se utilizan para medir la viabilidad de células después de su exposición a un compuesto citotóxico son principalmente los llamados indirectos. Con ellos se mide la capacidad de la célula para seguir realizando algunos procesos metabólicos como la síntesis de ADN, de proteínas o la capacidad de realizar respiración aeróbica, en el caso del ensayo del MTT. [25]

La técnica del MTT, descrita por Mossman en 1983, se basa en la capacidad de las células viables de reducir, principalmente por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, a la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, soluble en agua y de color amarillo, a formazan, de color púrpura e insoluble en agua,. El número de células viables o sobrevivientes es directamente proporcional a la cantidad de formazan producido. El producto se puede solubilizar en DMSO para dar una solución colorida que puede medirse espectrofotométricamente con un lector de placas de 96 pozos. [26-29]

4. PARTE EXPERIMENTAL

A continuación se presenta un diagrama general de trabajo y posteriormente se explica detalladamente cada paso.



4.1 Recolección de muestras

Las flores, los ejotes y semillas de colorín fueron recolectados de árboles caracterizados en el campus de Ciudad Universitaria, UNAM.

4.2 Acondicionamiento de las muestras

Las flores se sometieron a un secado a 60 ° C.

Los ejotes se abrieron y se separaron las semillas inmaduras de las vainas. A las semillas inmaduras se les realizó una premolienda y se secaron a 60 ° C.

Las flores, semillas inmaduras y semillas de colorín (*Erythrina americana*) se molieron y pasaron a través de mallas desde 2.0 mm hasta 0.5 mm.

Se determinó humedad de acuerdo al método de la AOAC 934.01 [30]

4.3 Modificación a la técnica de extracción

Se realizó la extracción y cuantificación de alcaloides en semilla de colorín con la técnica de la Farmacopea [31] y la técnica modificada para buscar si había diferencia significativa entre ambas. Se buscó reducir el tiempo de agitación así como otra alternativa de solvente de extracción al purificar los alcaloides.

Técnica original	Modificaciones propuestas
Agitar la muestra con 50 ml de metanol alcalinizado por 8 h, filtrar al vacío. Agitar con otros 50 ml de metanol alcalinizado por 16 h, filtrar al vacío y juntar las dos porciones Cloroformo como disolvente de extracción en purificación:	a) Agitación como en la técnica original. Diclorometano o éter de petróleo como disolvente en purificación. b) Agitar la muestra con 100 ml de metanol alcalinizado por un periodo de 16 h. Filtrar al vacío. Disolvente de extracción en purificación: cloroformo c) Agitación como en b) y disolvente de extracción escogido en a)

4.4 Extracción y cuantificación de alcaloides.

Para la cuantificación de alcaloides en *Erythrina americana* se empleó la técnica con la modificación b).

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

Reactivos.

- H₂SO₄ 0.02 N valorado
- Solución indicadora, Rojo de Metilo.
- H₂SO₄ 1.00 N ($\rho = 1.84$ g/ml)
- NH₄OH concentrado.
- Sulfato de sodio anhidro.
- Metanol Q.P: (para extracción)
- Metanol R.A.(para titulación)
- Éter etílico R.A.
- Cloroformo R.A.

Procedimiento

1. Se pesaron 5 gramos de muestra molida y se pasaron a través de una malla de 0.5mm
2. Fueron adicionados 100 ml de metanol previamente alcalinizado a $\text{pH } 9 \pm 1$, con hidróxido de amonio.
3. Se mantuvo en agitación (300-500 rpm con agitador magnético en parrilla de agitación) durante 16 horas.
- 4.-Después de éstas se filtró con ayuda de vacío usando papel Whatman. No. 2.
5. El vaso y el residuo se lavaron con 20 ml de metanol alcalinizado.
6. El disolvente se evaporó, casi a sequedad, por medio del rotavapor ($T=50^{\circ}\text{C}$)
7. El extracto se disolvió en 15 ml de éter y 5 ml de H_2SO_4 1.00 N.
8. Se filtró a través de papel Whatman No. 2, recibiendo en un embudo de separación. Se hizo la extracción recuperando la fase acuosa (inferior).
9. La fase orgánica (superior) se extrajo tres veces con 5 ml de H_2SO_4 cada vez. Se reunieron las fases acuosas con la anterior y se vertieron en un embudo de separación.
10. Se adicionaron 25 ml de cloroformo y se realizó la extracción, recuperando la fase acuosa (superior)
11. Se hizo tres veces la extracción de la fase orgánica (inferior) con 5 ml de agua y 5 ml de ácido cada vez. Las fases acuosas se reunieron con la anterior y fueron extraídas dos veces con 10 ml de cloroformo.
12. La fase acuosa (superior) se recuperó y filtró a través de papel Whatman No.2, enjuagando el papel y el embudo con 2 ml de agua.
13. La fase obtenida se alcalinizó con NH_4OH concentrado hasta un $\text{pH} > 9$.
14. Posteriormente se realizó tres veces la extracción de la fase alcalinizada con 35 ml de cloroformo cada vez, recuperando la fase orgánica (inferior).

15. Ésta fase se secó con sulfato de sodio anhidro en polvo durante la noche y se evaporó en rotavapor ($T = 40^{\circ} \text{C}$) a sequedad.

Para la cuantificación de alcaloides:

1. El residuo se redisolvió con 3 ml de metanol (uno por uno), trasvasando cuantitativamente en un matraz Erlenmeyer que contenía 7 ml de agua destilada.
2. Se adicionó una gota de indicador rojo de metilo y se tituló con H_2SO_4 0.02 N valorado.

Cálculos

Se reportó como β -eritroidina:

$$g \text{ de } \beta - \text{eritroidina} / 100 g \text{ de muestra} = \frac{(A - B)(N_{\text{H}_2\text{SO}_4})(0.27332^*)(100)}{(g \text{ de muestra})}$$

A = ml de H_2SO_4 0.02 N valorado gastados por la muestra.

B = ml de H_2SO_4 0.02 N valorado gastados por un blanco (7 ml de agua y 3 ml de metanol)

* Este es el peso molecular de la β -eritroidina / 1000.

4.5 Validación de la técnica de extracción.

Se partió de los criterios marcados en la Guía de validación de métodos analíticos del 2002.

[19] Se empleó como sustancia de referencia al sulfato de atropina debido a que este alcaloide presenta una estructura similar a la β -eritroidina y por ser sustancia oficial de referencia de la Secretaría de Salud. Así mismo, se utilizó a la semilla como muestra a analizar, considerando su contenido de alcaloides de 0.571 %.

Como la técnica analiza 5 gramos de muestra, se consideró que su contenido de alcaloides era de 0.0285 g

A continuación se describen los parámetros de desempeño evaluados:

Precisión del sistema

Se pesó seis veces el equivalente al 100 % del contenido de alcaloides en la muestra, 0.0285 g y se midió la respuesta analítica.

Se calculó la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV)

Criterio de aceptación: $CV \leq 1.5 \%$

Linealidad de sistema

Se pesaron por triplicado 5 niveles equivalentes al contenido de alcaloides en la muestra de sulfato de atropina. El intervalo fue de $\pm 20\%$, teniendo como punto central el equivalente a 100 % de alcaloides.

Contenido de alcaloides %	Sulfato de atropina (g)
80	0.0228
90	0.0257
100	0.0285
110	0.0314
120	0.0343

Se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición.

Se reportó la relación concentración vs. respuesta analítica. Se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)).

Criterios de aceptación: $r^2 \geq 0.98$ y IC (β_1) no debe incluir el cero.

Especificidad

Se analizaron alubias blancas por ser una muestra similar a la semilla de colorín. Se acondicionó y se sometió a análisis como lo indicó el método.

Criterio de aceptación: La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

Exactitud y repetibilidad del método

Se prepararon 6 muestras de semilla adicionadas de sulfato de atropina utilizando la mitad de la muestra que requiere el método (2.5 g semilla, con 0.0143 g de alcaloides) y se adicionó el sulfato de atropina (0.0142 g) hasta completar lo que representara el 100 % de alcaloides en la muestra.

Se calculó el porcentaje de recobro, el promedio aritmético (Z) la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional (IC(μ)) del porcentaje de recobro.

Criterio de aceptación:

El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98 – 102 %.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor al 2 %

Linealidad de método

Se prepararon muestras adicionadas en tres niveles de contenido de alcaloides (80, 100 y 120 %). Cada nivel por triplicado. Se mantuvo constante la cantidad de muestra en todos los casos (2.5 g semilla, con 0.0143 g de alcaloides).

%	Alcaloides (g)	Alcaloides de muestra(g)	Sulfato de atropina (g)
80	0.0228	0.0143	0.0085
100	0.0285	0.0143	0.0142
120	0.0343	0.0143	0.0200

Se sometieron a análisis como lo indica el método. Se determinó la cantidad recuperada del analito.

Se reportó la relación cantidad adicionada vs. cantidad recuperada. Se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$), y el coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$)

Se calculó el porcentaje de recobro de cada muestra adicionada, el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$) del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación:

Cantidad adicionada vs. cantidad recuperada

$$r^2 \geq 0.98$$

$IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad

$IC(\beta_0)$ no debe incluir el cero

El $CV_{y/x}$ de la regresión no debe ser mayor al 2 %.

Porcentaje de recobro

El $IC(\mu)$ debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo 98-102 %.

Precisión del método

Al no contar con un segundo analista se analizó por triplicado la muestra de semilla en dos días diferentes. Se reportó el contenido de todas las muestras.

Se calculó la media aritmética, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido.

Criterio de aceptación: $CV \leq 2 \%$

Límite de detección

Se determinó las respuesta de una muestra blanco (alubias) y la de la muestra analítica (semilla de colorín). Se determinó aquella cantidad de analito que genera una respuesta con respecto al blanco en una proporción de por lo menos 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección.

Límite de cuantificación

Se determinó las respuesta de una muestra blanco (alubias) y la de la muestra analítica (semilla de colorín). Se determinó aquella cantidad de analito que genera una respuesta con respecto al blanco en una proporción de por lo menos 10 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de cuantificación.

4.6 Ensayos de citotoxicidad

4.6.1 Citotoxicidad en líneas celulares humanas [25,32]

Las líneas celulares empleadas fueron:

HeLa : línea de adenocarcinoma de cervix.

K-562 : línea de eritroleucemia humana.

Éstas fueron donadas amablemente por la Dra. Angelina Quintero del Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Química UNAM.

Los procedimientos de manipulación de los cultivos celulares y de preparación de soluciones se realizaron en condiciones de esterilidad en un gabinete de seguridad con flujo laminar vertical (VECO) con excepción del conteo celular. El material empleado fue limpio y estéril.

El cultivo celular de cada una de las líneas celulares se mantuvo en incubación a 37 °C, 5% CO₂ y una atmósfera de humedad relativa del 95 % en incubadora (Forma Cientific Model 3110). Los cultivos celulares ocupaban una superficie (confluencia) entre el 80 y 90 % del área de las placas de cultivo al iniciar los ensayos de citotoxicidad.

Se emplearon extractos de flor, semilla inmadura y semilla de colorín provenientes de 10 g de muestra. Los extractos se obtuvieron mediante la técnica descrita previamente realizando dos extracciones independientes de 5 g de cada muestra y juntando las fases orgánicas de la última extracción (paso 14 de la técnica) para evaporarlas juntas (paso 15).

Los extractos se redisolvieron en 2.5 ml de agua acidificada con HCl concentrado a pH = 4 y se esterilizaron por filtración con una membrana de 0.45 μm (Millipore HAWP 01300).

De cada solución se realizaron diluciones considerando que el extracto se disolvería previamente en un volumen de 50 μl que posteriormente se llevaría a un volumen final de 250 μl .

Para semilla

Dilución	μl extracto	μl de medio DMEM
1:10	25	25
1:20	12.5	37.5
1:30	8.33	41.66
1:40	6.25	43.75
1:50	5	45

Para semilla inmadura y flor

Dilución	μl extracto	μl de medio DMEM
1:10	25	25
1:20	12.5	37.5
1:30	8.33	41.66
1:40	6.25	43.75
1:80	3.125	46.875

Se prepararon de cada dilución 625 μl . Se realizaron seis repeticiones por dilución en cada línea celular agregando 50 μl por cada pozo. Con el dato obtenido del contenido de alcaloides por titulación de cada órgano se obtuvo la concentración de los alcaloides totales en los extractos a probar. Para obtener la concentración final por pozo se consideró que el volumen final fue de 250 μl .

Se incluyeron en cada ensayo un control de disolvente, en el cual se agregó 25 µl de agua acidificada y 25 µl de medio de cultivo D-MEM por pozo, así como un control negativo, en el cual se agregó 50 µl de medio de cultivo D-MEM.

Soluciones

▪ Medio de cultivo D-MEM

Medio D-MEM (Gibco)	Un sobre (10 g) Cat. No. 31600-026
Antibiótico-antimicótico (Gibco)	10 ml
HEPES (Sigma)	2.2 g
L-Piruvato (Gibco)	10 ml
Aminoácidos no esenciales (Gibco)	10 ml
NaHCO ₃ (Sigma)	3.7 g
Agua desionizada estéril	c.b.p. 900 ml
Suero fetal bovino inactivado (Gibco)	100 ml

- Se disolvieron las sales y el contenido de un sobre de medio de cultivo D-MEM en 700 ml de agua desionizada estéril mezclándose con un agitador magnético.
- Se agregaron los reactivos complementarios y se continuó la agitación.
- Se agregó agua desionizada estéril para completar 900 ml.
- Se esterilizó el medio por filtración a través de una membrana Millipore tipo GS de 0.22 µm dentro de la campana de flujo laminar.
- Se colocó una alícuota del medio de cultivo en una caja Petri estéril y se incubó a 37° C como prueba de esterilidad.

- Se hicieron alícuotas del medio de cultivo en botellas de vidrio estéril y se refrigeró.
- Antes de usarse, por cada 90 ml de medio D-MEM se complementó con 10 ml de suero fetal bovino inactivado.

- PBS-EDTA

NaCl (J.T. Baker)	8.00 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	1.44 g
KCl (J.T. Baker)	0.20 g
EDTA disódico (Sigma)	0.37 g
Agua desionizada	c.b.p. 1L

- Las sales se disolvieron en el agua desionizada sin orden especial
- Se llevó a volumen de 1 L
- Se ajustó el pH con una solución 0.1 M de NaOH o de HCl hasta 7.4.
- Se esterilizó en autoclave y se mantuvo en refrigeración.

- Reactivo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltretrazolio)

Se pesaron 25 mg de MTT (SIGMA) y se disolvió en 10 ml de solución de PBS-EDTA Se conservó en refrigeración a resguardo de la luz.

Procedimiento

I Obtención de células de un cultivo celular establecido (cosecha)

- f) El medio de cultivo DMEM y el PBS-EDTA se atemperaron a 37° C con Baño María.
- g) Se decanto el medio de cultivo de las placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Corning) que contenían las líneas celulares.
- h) Se realizó un lavado con 3 ml de PBS-EDTA, el cual se descartó.
- i) Se agregó de 1 a 2 ml de PBS-EDTA a la placa de cultivo y se incubó 5 minutos.
- j) Con ayuda de una micropipeta de 1 ml se resuspendió cuidadosamente el PBS-EDTA para desprender las células adheridas. El cultivo se disgregó hasta obtener una suspensión homogénea y células individuales

II Conteo celular en la cámara Neubauer

- f) La cámara de Neubauer (Hematocitómetro) se limpió con etanol al 70 %, se secó y colocó en posición horizontal
- g) De cada cultivo celular se realizaron diluciones 1:5 de la suspensión homogénea con PBS-EDTA o Medio D-MEM y se homogeneizaron
- h) Se tomó una alícuota de la suspensión celular y se llenó la cámara por capilaridad.
- i) La cámara se colocó sobre el microscopio invertido (Olympus Mod. CE-0849) y se contaron las células localizadas en los 8 cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos.

j) Al obtener el promedio de las ocho cuadrículas se aplicó la siguiente fórmula:

$$S = 5 (P) (1 \times 10^4)$$

Donde:

S= células en un mililitro de suspensión

5= factor de dilución

P= promedio de células encontradas en los 8 cuadrantes de la cámara de Newbauer.

1×10^4 = Factor que comprende el volumen de la cámara

III Cultivo celular en placas de 96 pozos.

- k) Se agregó un volumen de suspensión celular de 30 a 50 μ l para tener aproximadamente 7000 células en cada pozo en una placa de cultivo de 96 pozos (Corning)
- l) Se agregó medio de cultivo DMEM c.b.p. 200 μ l a cada pozo. Las placas se incubaron por 24 horas.

IV Exposición a los extractos.

- m) Al término de la incubación, se agregaron los extractos a probar, los cuales se diluyeron con medio de cultivo de tal manera que se agregaron 50 μ l más por cada pozo para tener un volumen final de 250 μ l y obtener la concentración deseada.
- n) Las placas se incubaron por 48 horas

V Viabilidad por MTT

- o) A la placa de cultivo se le adicionó 20 µl por cada pozo una solución de MTT a una concentración de 2.5 mg/ml.
- p) Se incubaron las células en contacto con la solución de MTT por un mínimo de 4 horas.
- q) Se removió el medio con MTT decantando la placa.
- r) Se resuspendieron los cristales de Formazan sedimentados en el fondo de la caja con 250 µl de DMSO para las líneas celulares tumorales Se leyeron las placas con un lector de 96 pozos con un filtro de 550 nm.

VI Obtención del porcentaje de inhibición de la proliferación celular

Los resultados de absorbancia obtenidos se capturaron en una hoja de cálculo (Excel). Se obtuvieron los valores promedio de absorbancia para el control solo, el control de disolvente y para cada uno de los tratamientos a las diferentes concentraciones.

El porcentaje de de inhibición celular se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \left[1 - \frac{\bar{x} \text{ abs problema}}{\bar{x} \text{ abs control}} \right]$$

Donde:

$\bar{x} \text{ abs problema}$ = absorbancia promedio del tratamiento

$\bar{x} \text{ abs control}$ = absorbancia promedio del control

Para calcular el valor de IC_{50} para cada uno de los extractos en las células empleadas se procedió a graficar el % inhibición promedio vs. Concentración de alcaloides totales en una hoja de cálculo del programa Origin 5.0, donde se realizó un análisis de regresión no lineal utilizando la ecuación de Boltzman. Posteriormente se interpoló el valor de concentración de alcaloides al 50 % de inhibición celular, obteniendo así el IC_{50} .

El valor final de IC_{50} de cada extracto se reporta como el promedio de tres experimentos independientes.

4.6.2 Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (CMSP).[33-36]

En este caso se realizaron diluciones considerando que el extracto se disolvería previamente en un volumen de 100 μ l ahora con Medio RPMI que posteriormente se llevaría a un volumen final de 200 μ l.

Se emplearon las siguientes diluciones de los extractos a probar:

Dilución	μl extracto	μl solución PHA	μl de medio RPMI
1:5	40	10	50
1:20	10	10	80
1:40	5	10	85
1:80	2.5	10	87.5

Se prepararon de cada dilución 350 μ l. Se realizaron tres repeticiones por dilución en cada línea celular agregando 100 μ l por cada pozo. Para obtener la concentración final por pozo se consideró que el volumen final fue de 200 μ l. Con el dato obtenido del contenido de alcaloides totales por titulación de cada órgano se obtuvo la concentración de los mismos en los extractos a probar. El momento de exposición de las CMSP a los extractos se describe más adelante.

Se incluyeron en cada ensayo un control de disolvente, en el cual se agregó 100 μ l de agua acidificada por pozo, así como un control negativo, en el cual se agregó 100 μ l de medio de cultivo RPMI.

Soluciones.

- Medio de cultivo RPMI-1640

Medio RPMI (Gibco)	El contenido de un sobre (10 g)
Dextrosa	2.5 g
NaHCO ₃ (Sigma)	2.0 g
L-Piruvato (Gibco)	10 ml
Antibiótico-antimicótico (Gibco)	10 ml
Aminoácidos no esenciales (Gibco)	10 ml
Agua desionizada estéril	c.b.p. 900 ml
Suero fetal bovino inactivado (Gibco)	100 ml

- Se disolvieron las sales y el contenido de un sobre de medio de cultivo en 700 ml de agua desionizada estéril mezclándose con un agitador magnético.
- Se agregaron los reactivos complementarios y se continuó la agitación.
- Se agregó agua desionizada estéril para completar 900 ml
- Se esterilizó el medio por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 µm dentro de la campana de flujo laminar.
- Se realizaron alícuotas del medio de cultivo en botellas de vidrio estéril y se refrigeró.
- Antes de usarse el medio se complementó por cada 90 ml de medio con 10 ml de suero fetal bovino inactivado.

- Hystopaque-1077 (SIGMA H-8889)

- PBS

NaCl (J.T. Baker)	8.00 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	1.44 g
KCl (J.T. Baker)	0.20 g
Agua desionizada	c.b.p. 1L

- Las sales se disolvieron en el agua desionizada sin orden especial
- Se llevó a volumen de 1 L
- Se ajustó el pH con una solución 0.1 M de NaOH o de HCl hasta 7.4.
- Se esterilizó en autoclave y se mantuvo en refrigeración

- Solución de fitohemaglutinina (PHA)

PHA Lectina de *Phaseolus vulgaris*

(SIGMA L-8754)	2 mg
Solución de PBS	5 ml

- Se pesó la PHA en un tubo eppendorf de 2 ml y se disolvió con 1 ml de PBS.
- Se traspasó a un tubo cónico de 15 ml
- Se agregó otro mililitro al tubo eppendorf para recuperar todo la PHA.
- Se traspasó al mismo tubo cónico de 15 ml
- Se llevo a 5 ml con solución de PBS.

Procedimiento

1.- Aislamiento de CMSP

- A. Se obtuvieron por venopunción de 25 a 30 ml de sangre periférica de donadores adultos sanos en condiciones de ayuno con sistema vacutainer en tubos estériles con EDTA al 0.5 % (Becton Dickinson Vacutainer No. 366352), agitando cada tubo suavemente.
- B. El volumen conocido de sangre se transfirió a un tubo cónico de 50 ml y se agregó la misma cantidad de Solución de PBS. Se mezcló suavemente.
- C. En tubos cónicos de 15 ml se agregaron 3 ml de Histopaque 1.077 y posteriormente se adicionó por goteo sobre las paredes del tubo de 6 ml de la mezcla anterior
- D. Se centrifugó a 1200 FCR durante 40 minutos en una centrífuga (Heraeus Mod. Megafuge 1.0). Al final de la centrifugación se obtuvieron tres fases: la fase inferior, con un color rojo intenso que correspondía a eritrocitos y plaquetas; la fase intermedia transparente correspondiente al Histopaque-1077, y la fase superior con un color rojo pálido correspondiente al plasma. Lo que nos interesó fue la fase intermedia entre estas dos, que es un anillo blanco que contiene las CMSP.
- E. Con una pipeta Pasteur se succionó cuidadosamente el anillo blanco de cada tubo y se transfirió a un solo tubo cónico de centrifuga.
- F. Se le adicionó 5 ml de PBS y se centrifugó a 1000 FCR durante 10 minutos
- G. Posteriormente se retiró el sobrenadante con Pipeta Pasteur.
- H. El botón celular de CMSP se resuspendió suavemente con 5 ml de PBS y se centrifugó nuevamente a 1000 FCR durante 10 minutos.

- I. El sobrenadante fue retirado con Pipeta Pasteur, y el botón celular se resuspendió suavemente con 5 ml de PBS y se centrifugó nuevamente a 1000 FCR durante 5 minutos
- J. Se retiró el sobrenadante con Pipeta Pasteur.
- K. El botón celular se resuspendió con 10 ml de medio de cultivo RPMI (Gibco-Invitrogen) con 10 % de SFB

2.- Conteo celular

- L. Se realizó el conteo en la cámara Newbauer como se describe para líneas celulares en II

3. Cultivo en placas de 96 pozos.

- M. En cada uno de los pozos fueron colocadas 3×10^5 CMSP en una suspensión celular de 100 μ l.

4. Exposición a los extractos

- N. Se agregaron los extractos a probar en las cantidades descritas previamente y 10 μ l de solución de PHA. Se diluyeron con medio de cultivo RPMI de tal manera que se agregaron 100 μ l más por cada pozo para tener un volumen final de 200 μ l y obtener la concentración deseada del extracto con 20 μ g/ml de PHA.
- O. Se incubaron las placas por 48 horas.

5. Viabilidad por la técnica del MTT y obtención del porcentaje de inhibición de la proliferación celular.

- P. Al finalizar la incubación se midió la viabilidad por la técnica del MTT y se obtuvo el porcentaje de inhibición de la proliferación celular como se describió para las líneas celulares en V y VI.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Adaptaciones de la técnica de extracción

Modificación a: Uso de diferentes solventes de extracción para la purificación de alcaloides.

Tabla 1

Disolvente	g alcaloides/ 100 g B.S.
Cloroformo	0.605
Diclorometano	0.525
Éter de petróleo	0.032

En la tabla 1 se muestran los resultados del cambio de disolvente de extracción después de realizar la determinación por triplicado. El uso de diclorometano nos permitió obtener el contenido de alcaloides mas cercano al obtenido con cloroformo por lo cual se escogió como solvente de comparación en la modificación c.

Modificación b: Disminución del tiempo de agitación y comparación entre cloroformo

Tabla 2 Extracción con cloroformo y 16 h de agitación.

Muestra	H₂SO₄ 0.02 N (ml)	g alcaloides/ 100 g B.S
1	5.35	0.60190434
2	4.98	0.5696278
3	4.77	0.54268412

Promedio = 0.571

Desviación estándar = 0.0296

Coefficiente de variación (CV) = 5.1%

Primero se probó la disminución del tiempo de agitación utilizando cloroformo como disolvente de extracción (Tabla 1 y 2). Los resultados se sometieron a una prueba de t de

student con nivel de significancia de 0.05, encontrando que no existe diferencia significativa entre el tiempo de agitación

Modificación c: Disminución del tiempo de agitación y diclorometano como solvente de extracción para la purificación de alcaloides.

Tabla 3 Extracción con diclorometano y 16 h de agitación

Muestra	H₂SO₄ 0.02 N (ml)	g alcaloides / 100 g B.S
1	4.15	0.48684508
2	4.25	0.48803753
3	4.54	0.51310232

Promedio= 0.496
Desviación estándar= 0.0148
CV= 2.98%

Se probó con 16 horas de agitación junto con el uso de diclorometano como disolvente de extracción en la purificación de alcaloides (Tabla 3).

Se hizo una prueba de t de student con nivel de significancia de 0.05, entre los resultados de 16 horas de agitación empleando cloroformo y diclorometano como disolvente de extracción. Se encontró que existe diferencia significativa entre el empleo de solventes lo cual ya se percibía desde los resultados obtenidos previamente (Tabla 1). Esto sirvió para comprobar que el cloroformo tendría que seguir siendo utilizado como solvente de extracción al purificar los alcaloides.

De las modificaciones propuestas se logró la propuesta b, que pretendía reducir el tiempo de agitación. Esta modificación ayudará a optimizar el tiempo invertido en la cuantificación de alcaloides totales.

5.2 Validación de la técnica de extracción.

A continuación se presentan los resultados de los parámetros evaluados. Las fórmulas y cálculos se encuentran en el anexo A.

Precisión del sistema

Tabla 4

Sulfato de atropina (g)	H₂SO₄ 0.02 N (ml)	Sulfato de atropina por titulación(g)
0.0285	3.98	0.0282
0.0289	3.92	0.0278
0.0287	3.93	0.0278
0.0285	3.97	0.0281
0.0287	3.92	0.0278
0.0289	3.91	0.0277

Promedio =0.0279
Desviación estándar =0.0002
CV = 0.7432 %

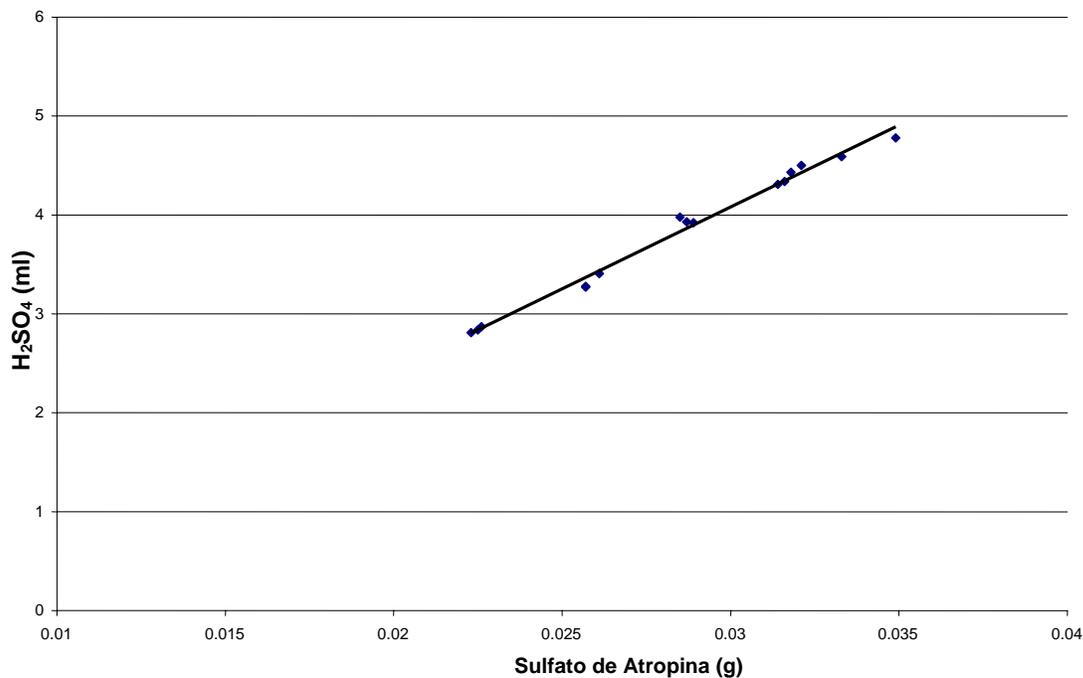
Se analizó por sextuplicado la cantidad de estándar (sulfato de atropina) equivalente al contenido de alcaloides de 5 gramos de muestra. El coeficiente de variación obtenido fue de 0.7432 %, el cual es menor al criterio de aceptación (1.5 %). Esto indica que existe concordancia entre los resultados individuales al aplicar el procedimiento a varias alícuotas de una muestra homogénea.

Linealidad del sistema

Tabla 5

Contenido (%)	X Sulfato de atropina(g)	Y H ₂ SO ₄ 0.02 N (ml)
78.81	0.0225	2.84
79.16	0.0226	2.87
78.11	0.0223	2.81
90.02	0.0257	3.27
91.42	0.0261	3.41
90.02	0.0257	3.28
99.82	0.0285	3.98
101.23	0.0289	3.92
100.53	0.0287	3.93
109.98	0.0314	4.31
111.38	0.0318	4.43
110.68	0.0316	4.34
116.64	0.0333	4.59
119.79	0.0321	4.5
122.24	0.0349	4.78

Gráfico 1 Linealidad del sistema



$$y = 165.56x - 0.8855 \quad R^2 = 0.9898$$

- Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = (155.503773, 175.60705)$$

En la tabla 5 se presentan las cantidades de sulfato de atropina analizadas, equivalentes al 80, 90, 100, 110 y 120 % del contenido de alcaloides en 5 g de semilla, y la respuesta analítica obtenida, es decir, los mililitros de H₂SO₄ 0.02 N gastados en la titulación.

En el gráfico 1 se observa una relación lineal entre la cantidad de sulfato de atropina y la respuesta analítica generada.

Dicha tendencia se ajusta a la ecuación de la línea recta $y = 165.56x - 0.8855$ con un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9898, el cual es mayor al criterio de aceptación (0.98).

El intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)) no incluyó el cero, como lo indica el criterio de aceptación

Especificidad

Tabla 6

Muestra	peso(g)	H₂SO₄ 0.02 N (ml)
Alubias 1	5.086	0.07
Alubias 2	5.1358	0.08
Alubias 3	5.1546	0.08
	promedio	0.08
Blanco	-----	0.08

Se analizó una muestra de alubias blancas por considerarse una matriz similar a la semilla de colorín. Al momento de la titulación también se analizó un blanco de solventes (7 ml de agua y 3 ml de metanol). Se encontró que la señal analítica fue la misma para la muestra de alubias sin contenido de alcaloides así como para el blanco que contenía sólo los solventes, por lo cual se asume que la respuesta del método se debe únicamente al analito en estudio.

Exactitud y repetibilidad

Tabla 7

Atropina adicionada (g) X	Atropina recuperada (g) Y	% recobro Z
0.0146	0.0145	99.4995
0.0146	0.0144	98.5288
0.0143	0.0140	98.1181
0.0142	0.0140	98.3100
0.0142	0.0140	98.8090
0.0143	0.0138	96.6314

Se utilizó como matriz la semilla de colorín en cantidad de 2.51 g para cada caso.

Porcentaje de recobro

Promedio z =98.3161

Desviación estándar =0.9556

Coefficiente de variación = 0.9720 %

- Intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

$$IC(\mu) = (97.3131, 99.3192)$$

En la tabla 7 se presentan los resultados del porcentaje de recobro. Se encontró en promedio una recuperación del 98.3161 %, con un coeficiente de variación es menor a 2 %, por lo cual se considera que el método es repetible.

El intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro no incluyó el valor de 100 % de recuperación, sin embargo el promedio del porcentaje de recobro está dentro del intervalo aceptado para un método volumétrico. (98-102 %)

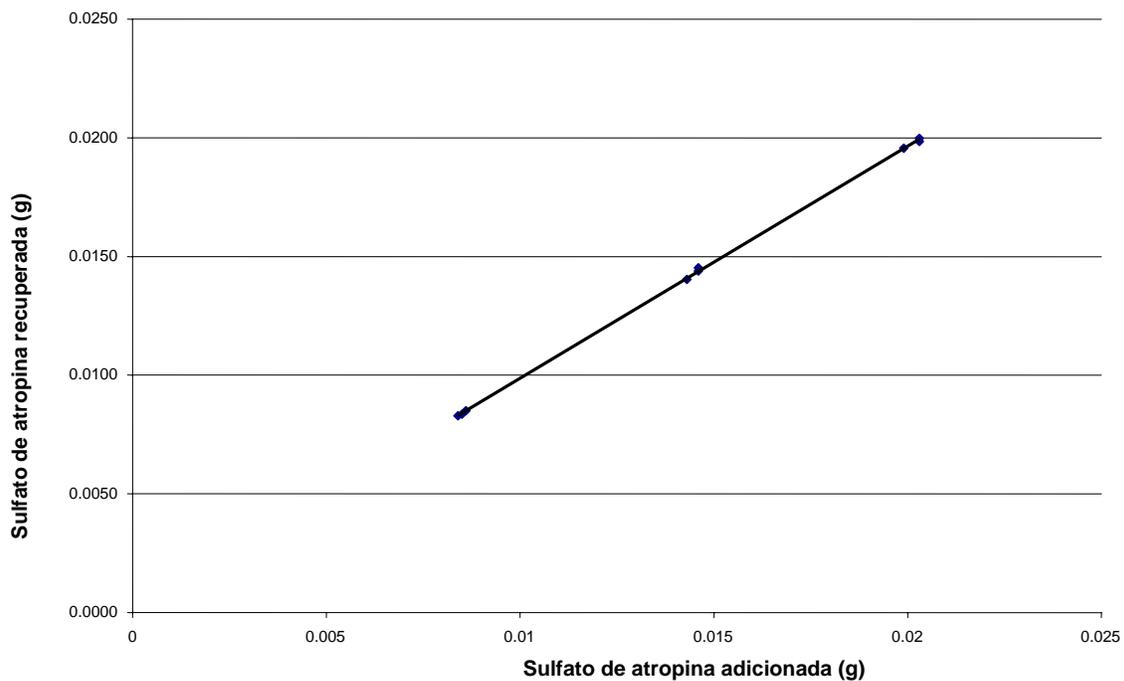
Linealidad del método.

Tabla 8

Muestra	Sulfato de atropina adicionada(g) X	Sulfato de atropina recuperada(g) Y	% recobro Z
1	0.0085	0.0084	98.3746
2	0.0086	0.0085	98.8787
3	0.0084	0.0083	98.7021
4	0.0146	0.0145	99.4995
5	0.0146	0.0144	98.5288
6	0.0143	0.0140	98.1181
7	0.0203	0.0198	97.7421
8	0.0199	0.0196	98.2824
9	0.0203	0.0200	98.4403

Se utilizó como matriz la semilla de colorín en cantidad de 2.51 g para cada caso.

Gráfico 2 Linealidad del método



$$y = 0.9781x + 9E-05$$

$$r^2 = 0.9998$$

- Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = 0.95278, 1.0034$$

- Intervalo de confianza para la ordenada

$$IC(\beta_0) = -2.94E-04, 4.74E-04$$

- Coeficiente de variación de la regresión

$$\text{Promedio } y = 0.0142$$

$$S_{x/y} = 0.00015$$

$$CV_{y/x} = 1.08060$$

Porcentaje de recobro

$$\text{Promedio } z = 98.5074$$

$$S = 0.49629$$

$$CV = 0.5038 \%$$

- Intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

$$IC(\mu) = 98.1259191, 98.8888788$$

En la tabla 8 se presentan los datos obtenidos de cantidad de sulfato de atropina recuperada y de porcentaje de recobro. Se emplearon los niveles de 80, 100 y 120 % de contenido de alcaloides. En el gráfico 2 se observa una tendencia lineal entre las cantidades de sulfato de atropina adicionadas y recuperadas. Dicho comportamiento se expresa mediante la ecuación de línea recta $y = 0.9781x + 9E-05$ con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9998$ mayor al criterio de aceptación (0.98 %).

Se determinó que el intervalo de confianza para la pendiente incluyó la unidad y que el intervalo de confianza para la ordenada incluyó el cero, así mismo, el coeficiente de variación de la regresión determinado fue menor al 2 %, cumpliendo cada uno de ellos con sus criterios de aceptación establecidos.

En el caso del porcentaje de recobro se encontró que el intervalo de confianza para la media poblacional no incluye el valor de 100 % de recuperación, sin embargo, el promedio aritmético del % de recobro se incluye en el intervalo de aceptación para un método volumétrico (98-102 %).

Precisión del método

Tabla 9 Día 1

Semilla	Peso(g)	H₂SO₄ 0.02 N (ml)	g de alcaloides/ 100 g B:S
1v	5.1682	4.69	0.5492
2v	5.1771	4.7	0.5494
3v	5.1515	4.64	0.5451

Promedio =0.5479
Desviación estándar = 0.0024
CV = 0.4437 %

Tabla 10 Día 2

Semilla	Peso(g)	H₂SO₄ 0.02 N (ml)	g de alcaloides/ 100 g B:S
4v	5.0781	4.5	0.5363
5v	5.0447	4.58	0.5494
6v	5.0165	4.55	0.5489

Promedio = 0.5449
Desviación estándar = 0.0074
CV = 1.3659 %

Como no se contó con un segundo analista que contribuyera en el análisis, se consideraron sólo los datos obtenidos en dos días diferentes. El análisis de la muestra de semilla en dos días diferentes tuvo un coeficiente de variación (CV) menor al 2 %, cumpliendo con las especificaciones dadas para un método volumétrico. Si se contaran con datos del segundo analista en dos días distintos, se calcularía el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación con todos los datos y se aplicaría el mismo criterio de aceptación.

Limite de detección (LD)

Tabla 13

Muestra	H₂SO₄ 0.02 N (ml)
Blanco	0.08
3 * blanco	0.24

Tabla 14

Semilla (g)	H₂SO₄ 0.02 N (ml)
1.0059	0.80
0.6092	0.24
0.3411	0.13

En la tabla 13 se muestra el cálculo del límite de detección teórico, que corresponde a la cantidad de analito que genera una respuesta con respecto al blanco en una proporción de por lo menos 3 a 1.

En la tabla 14 se presenta el resultado del análisis de diferentes cantidades de semilla. Se encontró que el **LD** se estima en **0.6092 g** de semilla, que es la cantidad de analito que generó respuesta 3 veces mayor al ruido.

Límite de cuantificación (LC)

Tabla 15

Muestra	H₂SO₄ 0.02 N (ml)
Blanco	0.08
10 * blanco	0.8

Tabla 16

Semilla (g)	H₂SO₄ 0.02 N (ml)
2.5084	2.26
1.0059	0.80
0.6092	0.24

En la tabla 15 se muestra el límite de cuantificación teórico, el cual, representa la cantidad de analito cuya señal sea similar o mayor a la de un blanco en una proporción 10 a 1.

En la tabla 15 se presentan los valores obtenidos al analizar diferentes cantidades de semilla de colorín. El **LC** se estima en **1.0059 g** de semilla, que es la cantidad de analito que generó una respuesta 10 veces mayor al ruido.

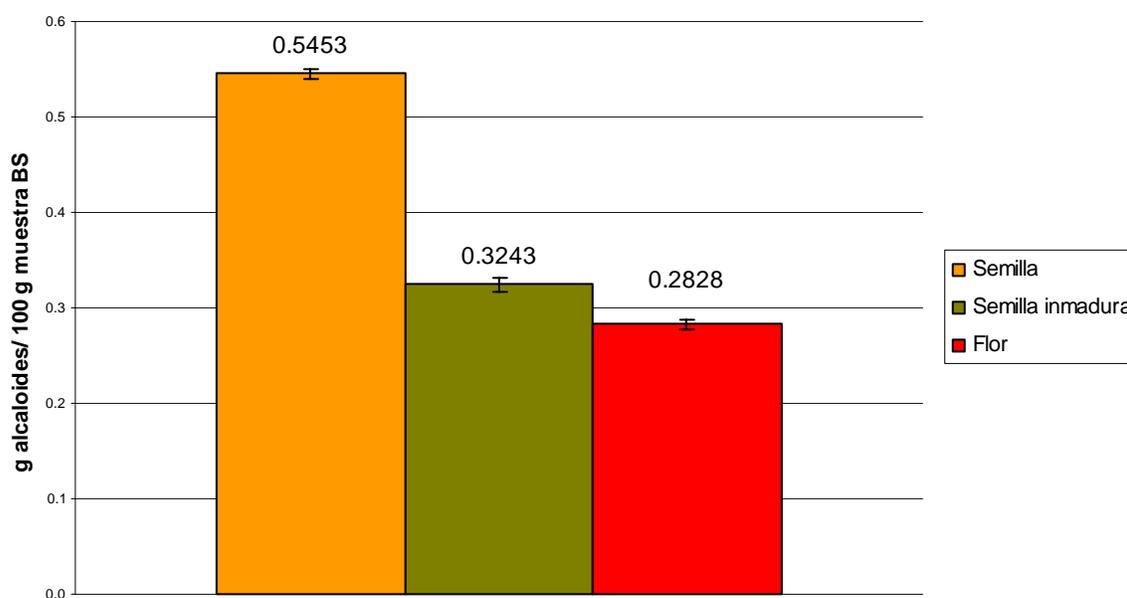
5.3 Contenido de alcaloides totales

Tabla 16

Extracto	g de alcaloides/ 100 g muestra B.S.
Flor	0.2828 ± 0.0057^a
Semilla inmadura	0.3243 ± 0.0068^b
Semilla	0.5453 ± 0.0052^c

Promedio de sextuplicado \pm desviación estándar. Los valores con superíndices diferentes en cada columna presentan diferencia significativa ($p \leq 0.05$)
Los cálculos se presentan en el anexo B.

Gráfico 3 Contenido de alcaloides totales por titulación



El mayor contenido de alcaloides determinado por titulación se encontró en la semilla de colorín; la semilla inmadura presentó un contenido de alcaloides intermedio y el menor fue determinado en la flor. Al realizar el análisis estadístico mediante t de student con un nivel de significancia del 95 % se encontró diferencia significativa entre los tres órganos entre si.

Dichos resultados reflejan que se da un aumento en la concentración de alcaloides al pasar de flor a semilla inmadura y posteriormente a semilla. Este comportamiento ya había sido descrito por García-Mateos y col. en 1996 [14] quienes analizaron la variación de contenido de alcaloides en diferentes estados de desarrollo de *Erythrina americana*. Así mismo, existen otros estudios en los que se ha cuantificado el contenido de alcaloides, encontrando mayor concentración en semillas que en flores (García-Mateos y col. en 1998 [15]) y menor contenido de alcaloides en semilla inmadura que en semillas de colorín. (Sotelo y col. en 2003 [6]).

El contenido de alcaloides totales obtenidos con la técnica previa a la validada en este trabajo fue de 1.056 g/ 100 g de muestra en el caso de semilla (Moreno en 2001 [3]) y de 0.769 g/ 100 g de muestra para la semilla inmadura (Flores en 2003 [37]). Los resultados son mayores a los obtenidos en este estudio. Esto se puede deber, a que en la técnica empleada por ellos, el resultado se corregía con un factor obtenido del porcentaje de recuperación empleando sulfato de atropina. Para obtener ese factor se emplearon cantidades de atropina menores al equivalente en las muestras y no se evaluó el método completo, lo cual podría dar como resultado una sobrestimación de los valores. En este estudio se cuidaron estos detalles y se obtuvo un porcentaje de recuperación cercano al 100% por lo cual los resultados obtenidos son confiables.

En cuanto al contenido de alcaloides reportados por diversos investigadores, difieren entre si, así como, con los obtenidos en el presente estudio. Esto se puede deber a las técnicas de extracción y cuantificación empleadas en cada investigación.

5.4 Ensayos de citotoxicidad

Efecto de extractos de colorín en la proliferación de las células HeLa y K-562 en función de la concentración de alcaloides totales

Gráfico 4 Extractos con alcaloides en HELA

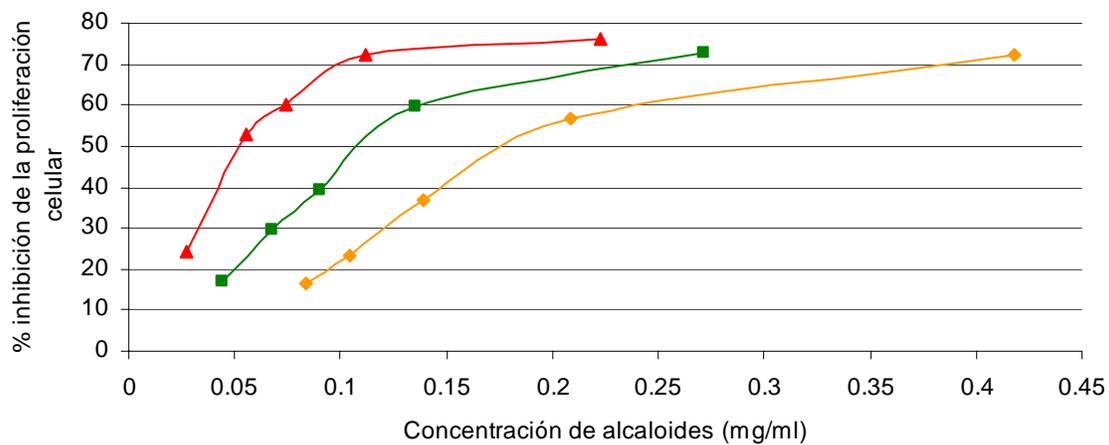


Gráfico 5 Extractos con alcaloides en K562

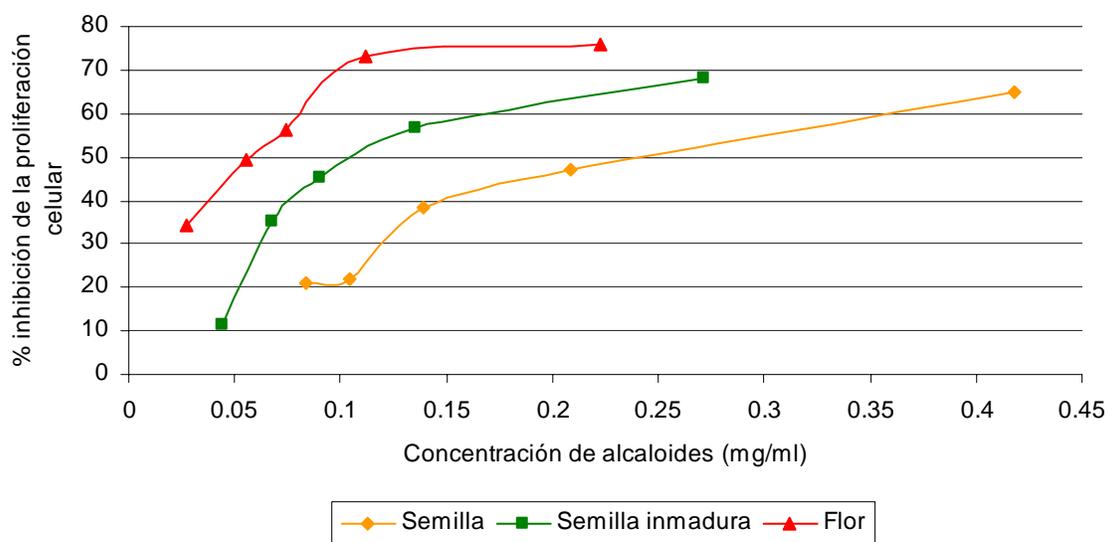
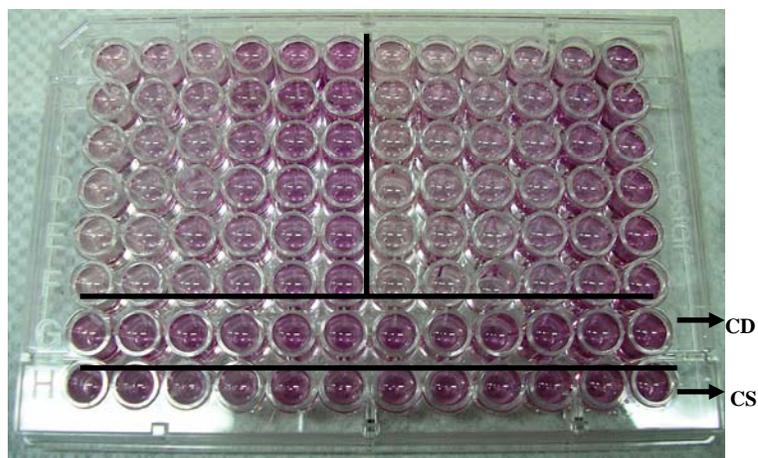


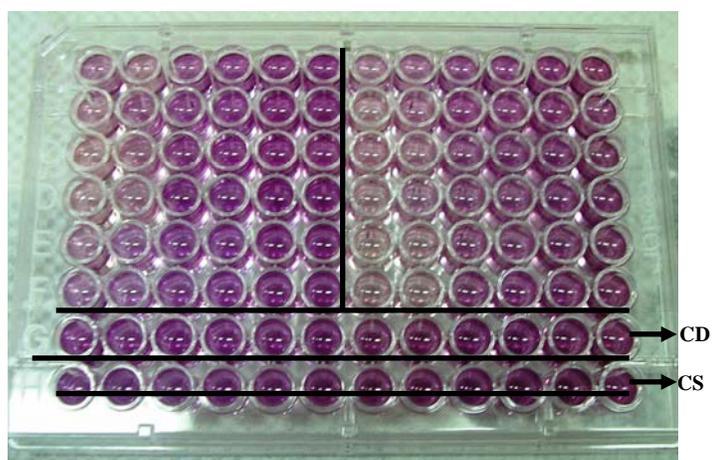
FIGURA 2

Visualización del desarrollo de color en la viabilidad celular por la técnica del MTT en células HeLa y K562.

Extracto de semilla Extracto de flor
Dilución
1:10 1:20 1:30 1:40 1:50 CS 1:10 1:20 1:30 1:40 1:80 CS



Extractos de semilla inmadura
Dilución
1:10 1:20 1:30 1:40 1:80 CS 1:10 1:20 1:30 1:40 1:80 CS



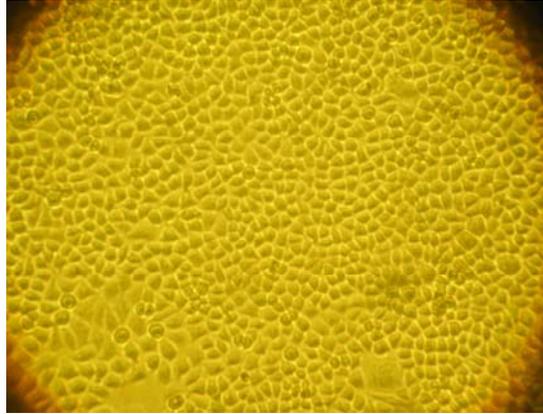
CS: Células sin exposición al extracto
CD: Células expuestas al disolvente (Agua pH = 4)

La intensidad de color es proporcional a la cantidad de células vivas.

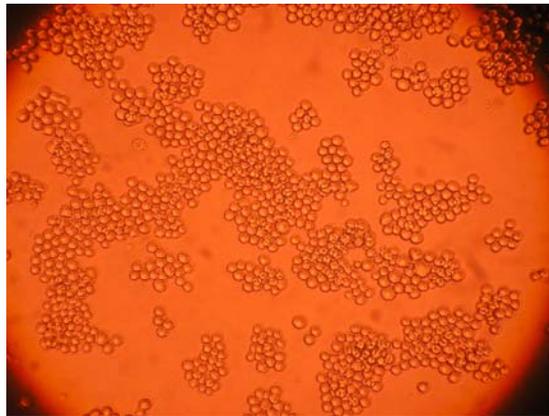
FIGURA 3

Observación al microscopio de las células HeLa y K562 sin tratamiento.

Objetivo 20 x.

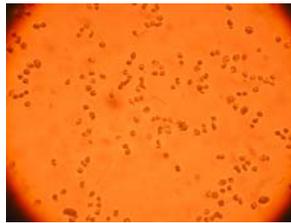


HeLa

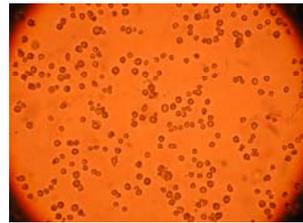


K-562

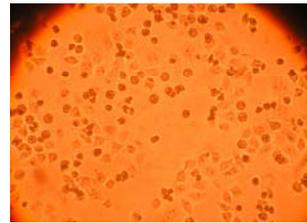
FIGURA 4
Efecto gradual en el número e integridad de las células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de alcaloides
Objetivo 20 x. La observación representa uno de tres experimentos independientes.



0.4178 g alcaloides / ml

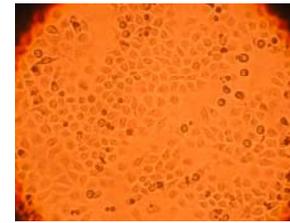


0.2089 g alcaloides/ml

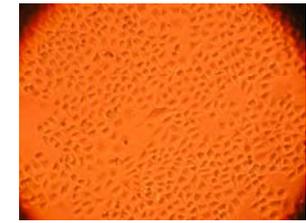


0.1393 g alcaloides/ml

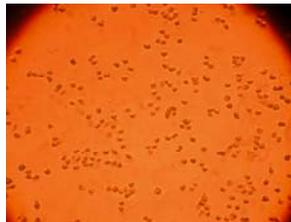
Semilla



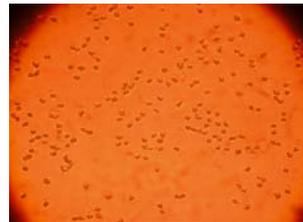
0.1045 g alcaloides/ ml



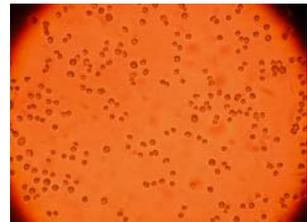
0.0836 g alcaloides/ml



0.2713 g alcaloides/ml



0.1356 g alcaloides/ml

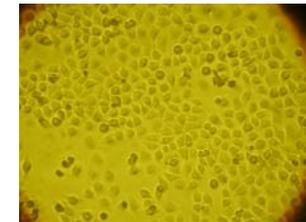


0.0904 g alcaloides/ml

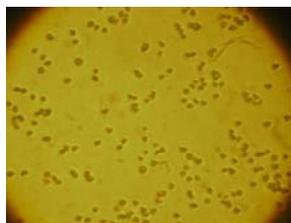
Semilla Inmadura



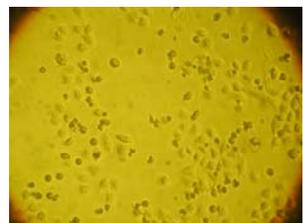
0.0608 g alcaloides/ml



0.0440 g alcaloides/ml



0.2230 g alcaloides/ml



0.1115 g alcaloides/ml



0.0743 g alcaloides/ml

Flor



0.0557 g alcaloides/ml



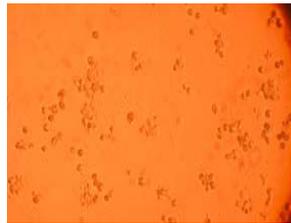
0.0277 g alcaloides/ml

FIGURA 5

Efecto gradual en el número e integridad de las células K-562 expuestas a diferentes concentraciones de alcaloides. Objetivo 20 x. La observación representa uno de tres experimentos independientes.



0.4178 g alcaloides / ml

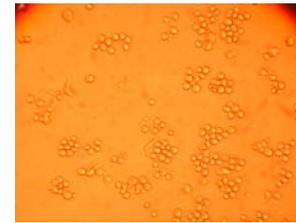


0.2089 g alcaloides/ml

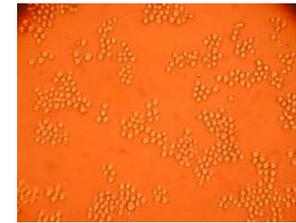


0.1393 g alcaloides/ml

Semilla



0.1045 g alcaloides/ ml



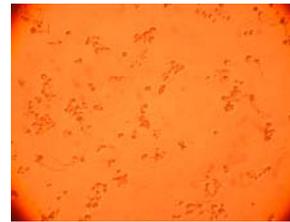
0.0836 g alcaloides/ml



0.2713 g alcaloides/ml

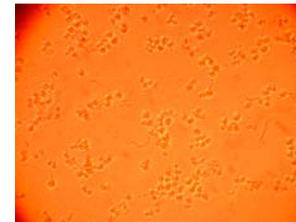


0.1356 g alcaloides/ml

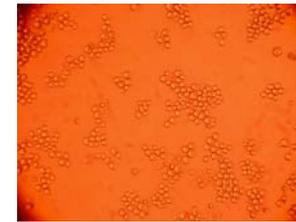


0.0904 g alcaloides/ml

Semilla Inmadura



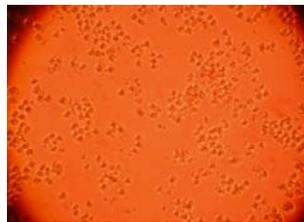
0.0608 g alcaloides/ml



0.0440 g alcaloides/ml



0.2230 g alcaloides/ml



0.1115 g alcaloides/ml

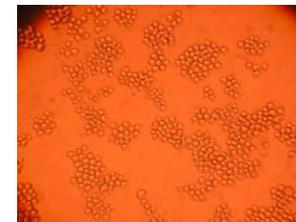


0.0743 g alcaloides/ml

Flor



0.0557 g alcaloides/ml



0.0277 g alcaloides/ml

Efecto de extractos de colorín en la proliferación de las CMSP en función de la concentración de alcaloides totales

Gráfico 6 Extractos con alcaloides en CMSP

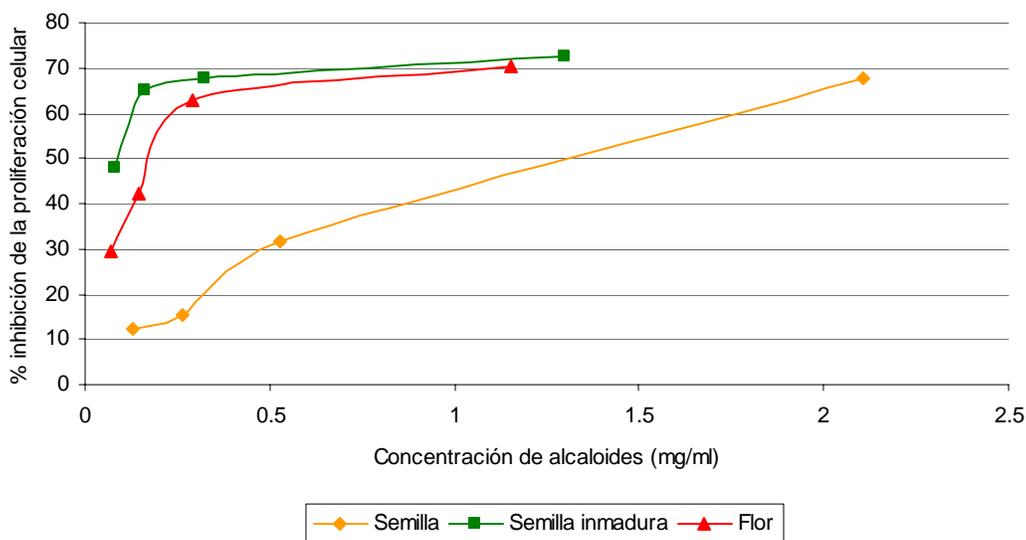
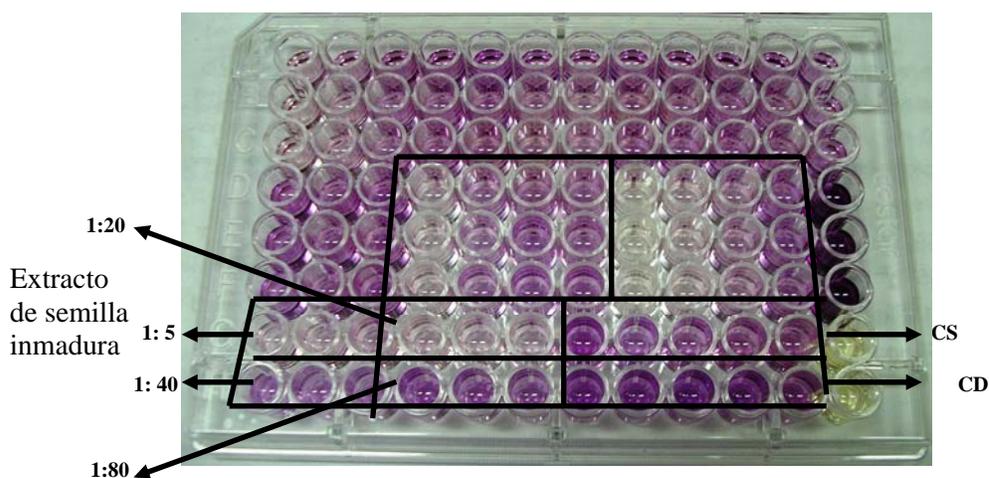


FIGURA 6

Visualización del desarrollo de color en la viabilidad celular por la técnica del MTT en CMSP

Extracto de semilla Extracto de flor
Dilución
 1:5 1:20 1:40 1:80 1:5 1:20 1:40 1:80



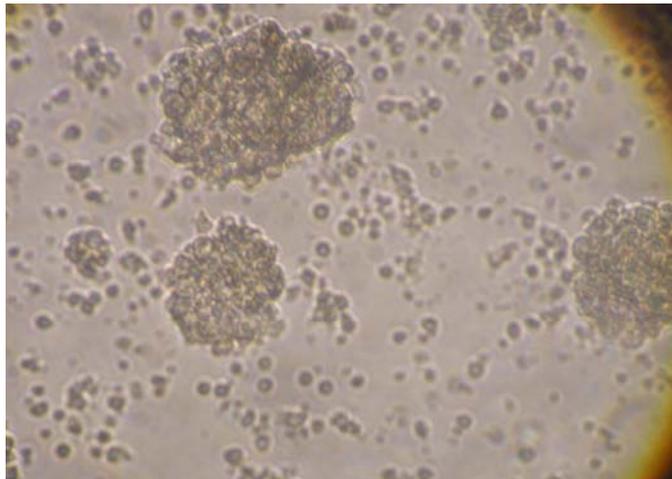
CS: Células sin exposición al extracto
 CD: Células expuestas al disolvente (Agua pH = 4)

La intensidad de color es proporcional a la cantidad de células vivas.

Figura 7

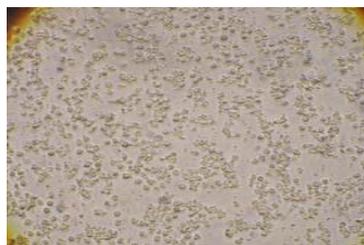
**Observación al microscopio de las Células Mononucleares de Sangre Periférica CMSP
sin tratamiento.**

Objetivo 20 x.

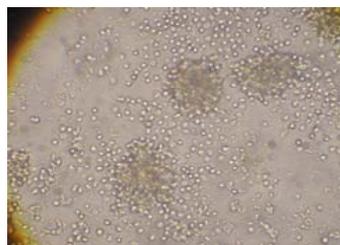


CMSP

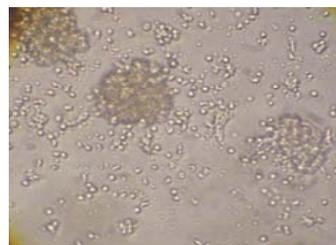
FIGURA 8
Efecto gradual en la proliferación de CMSP expuestas a diferentes concentraciones de alcaloides
Los cúmulos de células representan una mayor proliferación.
Objetivo 20 x. La observación representa uno de tres experimentos independientes.



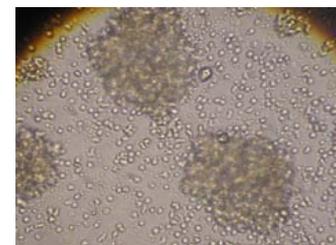
2.1065 mg alcaloides / ml



0.5266 mg alcaloides / ml

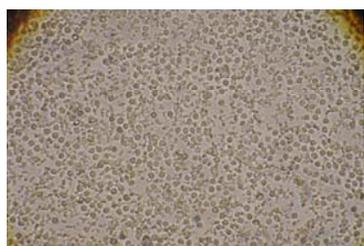


0.2633 mg alcaloides / ml

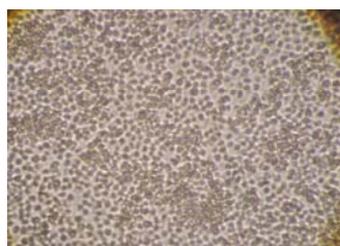


0.1317 mg alcaloides / ml

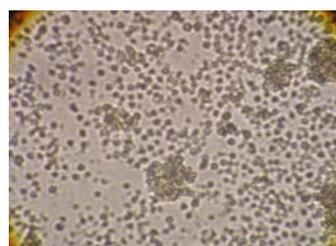
Semilla



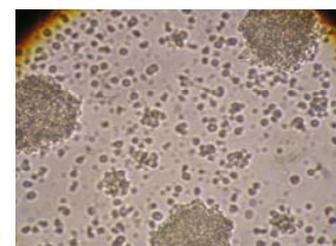
1.2981 mg alcaloides / ml



0.3245 mg alcaloides / ml



0.1623 mg alcaloides / ml



0.0811 mg alcaloides / ml

Semilla Inmadura



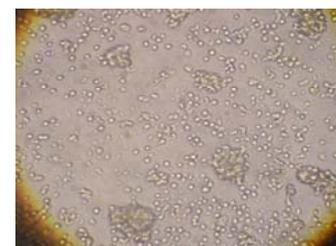
1.1557 mg alcaloides / ml



0.2889 mg alcaloides / ml



0.1445 mg alcaloides / ml



0.0722 mg alcaloides / ml

Flor

En los gráficos 4, 5 y 6 se presenta la inhibición lograda por cada uno de los extractos sobre las células HeLa, K-562 y CMSP. En los tres casos se encontró que hubo un mayor grado de inhibición de la proliferación celular a medida que se aumentaba la concentración de alcaloides.

En el caso de las líneas celulares HeLa y K-562 (Gráficos 4 y 5) se observó el efecto de inhibición de la proliferación celular en un rango de concentración de alcaloides de 0.02 a 0.5 mg/ml. El extracto con mayor efecto tóxico en ambas líneas fue el de flor de colorín, seguido del de semilla inmadura y con menor efecto el extracto de semilla.

Por otro lado, en las CMSP (Gráfico 6) el rango de concentración de alcaloides en el cual se observó la inhibición de la proliferación celular fue de 0.02 a 2.3 mg/ml. Hubo un comportamiento similar entre los extractos de flor y semilla inmadura de colorín, y éstos resultaron ser más tóxicos que el extracto de semilla.

El rango de concentraciones en que se vio el efecto tóxico fue menor en las células tumorales que en las CMSP.

Concentración de alcaloides en los extractos de colorín que inhibió al 50 % la proliferación celular

Gráfico 7 IC₅₀ en HELA

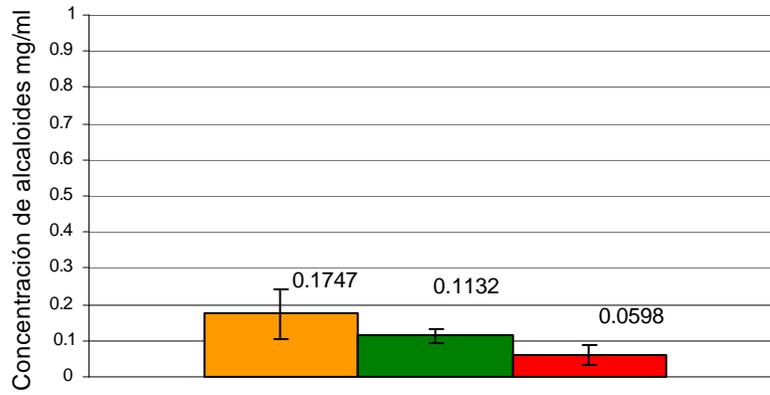


Gráfico 8 IC₅₀ en K562

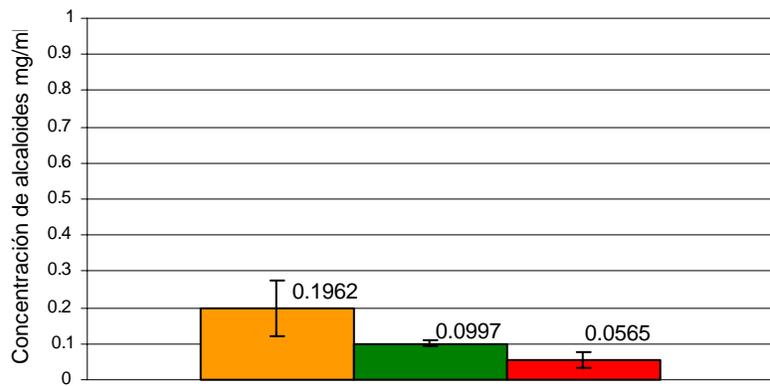


Gráfico 9 IC₅₀ en CMSP

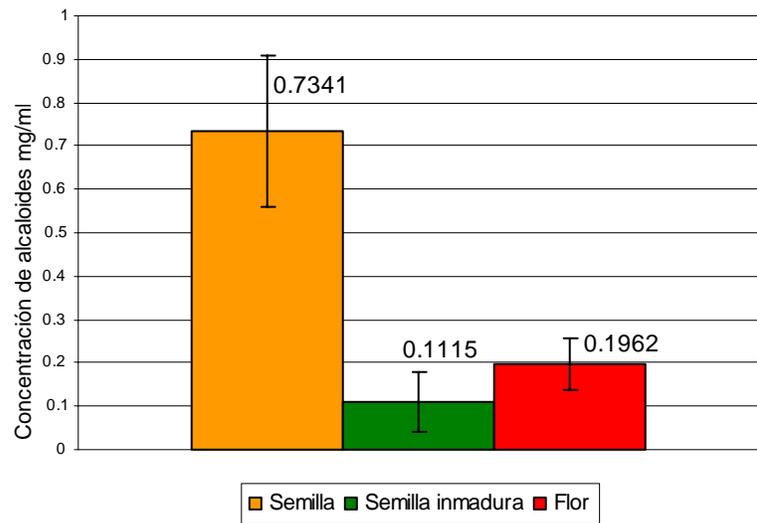


Tabla 17

Extracto	IC₅₀ HeLa	IC₅₀ K562	IC₅₀ CMSP
Flor	0.0598 ± 0.029 ^a	0.0565 ± 0.022 ^a	0.1962 ± 0.0608 ^a
Semilla inmadura	0.1132 ± 0.0197 ^b	0.0997 ± 0.0077 ^b	0.1115 ± 0.0695 ^a
Semilla	0.1747 ± 0.0542 ^b	0.1962 ± 0.0624 ^c	0.7341 ± 0.1752 ^b

Promedio de triplicado ± desviación estándar. Concentración expresada en mg / ml. Los valores con superíndices diferentes en cada columna presentan diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

Los cálculos se presentan en el Anexo D.

En la tabla 17 se resumen los resultados obtenidos de IC₅₀ para cada órgano en cada tipo de célula (Gráficos 7,8 y 9).

Para las células HeLa y K-562 se obtuvieron resultados similares para cada órgano. Se encontró el menor valor de IC₅₀ para el extracto de flor, seguido del de semilla inmadura y el más alto para semilla. Entre menor sea el valor de IC₅₀, mayor es el efecto tóxico del extracto, por lo cual el extracto de flor fue el más tóxico en la líneas celulares.

En la línea celular HeLa, la toxicidad de los extractos de semilla inmadura y semilla de colorín fue similar, mientras que para K-562 el extracto de semilla inmadura fue más tóxico que el extracto de semilla de colorín.

Por otro lado, en las CMSP no hubo diferencia significativa entre los valores de IC₅₀, y por tanto de toxicidad, entre los extractos de flor y semilla inmadura de colorín. Éstos resultaron ser más tóxicos que el extracto de semilla de colorín. Cabe destacar que aunque la tendencia de toxicidad fue similar entre las líneas celulares y las CMSP, la toxicidad fue menor en las últimas, lo que nos habla de una menor sensibilidad a los alcaloides.

A través de diversas investigaciones, se han logrado identificar la composición de los extractos de alcaloides de *Erythrina americana* de varios órganos (Tablas 18, 19 y 20). La mayoría de ellos coincide en que los alcaloides mayoritarios en el extracto son β -eritroidina, seguido de α -eritroidina, por lo cual se les ha asignado el efecto tóxico.

Tabla 18 Alcaloides identificados en flor de colorín.

α -eritroidina	Aguilar M.I., <u>et.al.</u> en 1981 [12]
β -eritroidina	
α -eritroidina	Garcia-Mateos, <u>et.al.</u> en 1996 y 1998 [14 y 15]
β -eritroidina	
N-óxido de eritristemina	
Alcaloide no identificado	
α -eritroidina	Sánchez-Herrera, <u>et.al.</u> en 2001 [18]
β -eritroidina	
8-oxo- α -eritroidina	
cristamidina	
erisodina	
eritrinina	
eritralina	

Tabla 19 Alcaloides identificados en semilla inmadura de colorín.

Erisodina	García Mateos, <u>et.al.</u> en 1996 [14]
N-oxido de eritrtarina	
α -eritroidina	
β -eritroidina	

Tabla 20 Alcaloides identificados en semilla de colorín

α -eritroidina	Sotelo A. <u>et.al.</u> en 1993 [13]
β -eritroidina	
erisodina	
erisovina	
eritravina	
α -eritroidina	García Mateos, <u>et.al.</u> en 1996 [14]
β -eritroidina	
erisodina	
erisovina	
α -eritroidina	García Mateos, <u>et.al.</u> en 1999 [38]
β -eritroidina	
erisodina	
erisovina	
erisopina	

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad nos muestran que la toxicidad fue mayor en los extractos con menor contenido de β -eritroidina.

De acuerdo a los estudios de toxicidad aguda realizados por diversos investigadores en ratas y ratones por diversas vías de administración (Guerrero en 1980 [39], Sotelo y col. en 1993 [13], Garin Aguilar y col. en 2000 [17], Berger y Schwan en 1948 [40], Sotelo A y col. en 2003 [6]).se esperaba que el extracto de semilla, con mayor contenido de β -eritroidina fuera el que presentara mayor toxicidad.

Sin embargo, García Mateos y col. en 2000 [16] encontraron que los extractos de las semillas de *Erythrina americana* que contenían α y β -eritroidina no tenían efecto tóxico en otros organismos. Reportaron que en el estudio de toxicidad aguda en el nemátodo *Panagrellus predivivus* y de toxicidad aguda en *Artemia salina* el extracto metanólico de los alcaloides liberados tuvo el mayor efecto. En dicho extracto se identificaron los alcaloides erisovina, erisodina, y erisopina.

Estos resultados nos indican, que dependiendo del sistema en estudio, el mayor grado de toxicidad puede estar dado por otros alcaloides presentes en los extractos y no exclusivamente por el contenido de β -eritroidina.

Se ha encontrado que la composición de los alcaloides varía según el órgano y el estado de desarrollo del colorín., así como la existencia de alcaloides exclusivos de cada órgano.

Se sabe que el derivado dihidro- β -eritroidina presenta una toxicidad de 5 a 10 veces mayor que la β -eritroidina [41], se ha encontrado que la erisodina es un inhibidor más potente de ciertos receptores de acetilcolina que la dihidro- β -eritroidina [42], por lo cual se puede asumir que podría tener una toxicidad mayor a la β -eritroidina. La erisodina se ha encontrado presente en los tres órganos en estudio, más no se reporta en que cantidades.

Es posible que la proporción y tipo de alcaloides presentes en el extracto de flor, como pudiera ser el caso de la erisodina, cause un efecto más tóxico que el extracto de semilla inmadura y/o semilla de colorín.

La toxicidad de los alcaloides de *Erythrina americana* se basa en que actúan a nivel de sistema nervioso, teniendo efecto paralizante, anestésico, relajante e hipnótico en el organismo. En cambio, la respuesta tóxica *in vitro* es solamente un evento celular, medido mediante los cambios en su metabolismo y supervivencia.

El efecto tóxico observado en las células empleadas en este estudio, puede diferir al ser difícil de recrear la cinética de exposición a éstos en un cultivo *in vitro*. La toxicidad generada en este estudio pudo ser influida por el mecanismo de entrada y metabolismo de cada alcaloide dentro de las células. [24]

Otros factores que influyen son, que en los cultivos celulares, se pierde la organización tridimensional propia del tejido y ya no se encuentran las interacciones entre los diferentes tipos celulares, ni entre las células y la matriz extracelular.

De igual forma, se pierden varios componentes sistémicos involucrados en la homeostasis, principalmente aquellos relacionados con el sistema nervioso y endócrino. Sin este control, el metabolismo celular puede ser más constante y puede no ser una verdadera representación de las células que de las que se deriva. [24, 43, 44]

Aun hace falta investigar más acerca del mecanismo de acción, forma activa y de la toxicidad de los alcaloides de *Erythrina americana*. En la literatura no existen pruebas de toxicidad a nivel celular que pudieran utilizarse como punto de comparación o referencia. La identificación del tipo de alcaloides presentes en los extractos de flor, semilla inmadura y semilla de colorín podría ayudar a elucidar acerca de los resultados obtenidos en este estudio.

6. CONCLUSIONES

- Se optimizó la técnica de alcaloides totales por titulación adaptada de la Farmacopea reduciendo el tiempo invertido en la realización de la técnica.
- La técnica de alcaloides totales por titulación modificada cumplió los parámetros de precisión y linealidad del sistema, especificidad, exactitud y repetibilidad, linealidad y precisión del método. Así mismo se determinaron su límite de detección y de cuantificación lo que llevó a la validación de la misma.
- El contenido de alcaloides totales por titulación fue mayor en la semilla, seguido por la semilla inmadura y con el menor contenido en la flor de colorín (*Erythrina americana*).
- Se realizaron los ensayos de citotoxicidad de los extractos de alcaloides de colorín en las células HeLa, K-562 y CMSP.
- En las tres células estudiadas el porcentaje de inhibición de la proliferación celular fue mayor a medida que se aumentaba la concentración de alcaloides en los extractos.
- En las líneas celulares HeLa y K-562 el extracto con mayor efecto tóxico fue el de flor de colorín, seguido del de semilla inmadura y ésta su vez del de semilla.
- En las CMSP existió un comportamiento similar entre los extractos de flor y semilla inmadura de colorín, resultando más tóxicos que el extracto de semilla.
- La toxicidad de los extractos analizados fue mayor en las células tumorales que en las CMSP.

- El extracto con mayor toxicidad fue el de flor de colorín con un menor contenido de alcaloides. Este efecto puede estar dado por la proporción y tipo de alcaloides presentes en los extractos y no exclusivamente por el contenido de β -eritroidina.
- La toxicidad generada a las células en estudio pudo ser influida por el mecanismo de entrada y metabolismo de cada alcaloide dentro de ellas.
- La pérdida de varios componentes sistémicos involucrados en la homeostasis así como la falta de interacción con otro tipo de células y con la matriz extracelular pueden contribuir en la diferencia de resultados con los estudios *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Leguminosas, en línea, Internet, 8 de octubre de 2006, disponible WWW. <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/leguminosas.htm>
2. Leguminosa en línea, Internet, 8 de octubre de 2006, disponible WWW <http://es.wikipedia.org/wiki/Leguminosa>
3. Moreno E. R. I., Estimación de la toxicidad aguda y cuantificación de alcaloides totales en *Erythrina americana* en diferentes fases de desarrollo, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2001, pp.2-4, 8-10, 13-16, 30-35, 41-43.
4. Especies Con Usos No Maderables en Bosques Tropicales y Subtropicales en los Estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, *Erythrina americana* Miller, en línea, Internet, 19 de enero de 2005, disponible WWW http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/erythrina_americana.htm.
5. Tenorio J.M.E., Evaluación proteico-calórica de dos semillas de *Erythrina* destoxificadas, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 1993, pp.4-5.
6. Sotelo A., Argote R.M, Moreno R.I., Flores N.I. y Díaz M., Nutritive evaluation of seeds, germinated seed, and strin bean of *Erythrina Americana* and detoxification of the material by boiling, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2821-2825.
7. Bruneton J., Farmacognosia, fitoquímica y plantas medicinales, Acribia, España, 2001, pp.776, 782-783, 785, 791.
8. Kuklinski C, Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, Ediciones Omega, España, 2003, pp. 167-169.
9. Evans W.C., Trease y Evans Farmacognosia, 13ª ed., Interamericana-Mc Graw Hill, México, 1991, pp. 590-592.

10. San Miguel-Chávez R., Soto-Hernández M., Ramos-Valdivia A.C, Kite G., Martínez-Vázquez M., García M. R., Terrazas S.T., Production of alkaloids by in Vitro culture of *Erythrina americana* Miller, *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1055-1059.
11. Major Types Of Chemical Compounds In Plants & Animals Part II. Phenolic Compounds, Glycosides & Alkaloids en línea, Internet, 19 de abril de 2005, disponible WWW, <http://waynesword.palomar.edu/chemid2.htm>
12. Aguilar M.I., Giral F., Espejo O., Alkaloids from flowers of *Erythrina Americana*, *Phytochemistry*, 1981, 20, 2061-2062.
13. 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.
14. 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.
15. García-Mateos R., Soto-Hernández M., Kelly D., Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico, *Bioch.System.Ecol.*, 1998, 26, 545-551
16. García-Mateos R., Soto-Hernández M., Toxicidad de las semillas de *Erythrina americana*, *Ciencia Ergosum*, 2000, Vol 7 (1) 133-137.
17. Garín-Aguilar M, Ramírez B, Soto-Hernández M, Valencia del Toro G, Martínez M, Effect of crude extracts of *Erythina americana* Mill. On aggressive behavior in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 69, 189-196.

18. Sánchez-Herrera S., Soto-Hernández M, Kite G, García-Mateos R, Identificación de alcaloides en las inflorescencias de *Erythrina americana* Miller, Revista Chapingo Serie Horticultura, 2001, Vol. VII (1) p. 37
19. García A., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera J., Alcántara A., Chárvel A., Mota R., Garzón A., Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., 2ª ed., México, 2002, pp. 11, 19-37, 59-68, 71-,72,79,80
20. Romero C., Validación de un método para cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2003., pp. 56-60,70-76 ,
21. Delgado L., Desarrollo de un método analítico para medir el contenido de alcaloides en lupinos por cromatografía de gases, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 1998, pp. 35-37, 40-43.
22. Mendoza J., Validación de una metodología para la determinación de ácido fólico en alimentos, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2001, pp. 40-43, 54,55.
23. Mora G M, Rangel C R, Monroy G A, Aplicación de las técnicas de citometría de flujo, Elisa celular e incorporación de isótopos radioactivos en el cultivo celular, Manual de técnicas Unidad de investigación en diferenciación celular y cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, agosto 2004.
24. Freshney R I, Culture of animal cells. A manual of basic techniques, 3a ed., Wiley-Liss, EUA, 1994.pp.5, 287-288.
25. Baranda N., Evaluación de la actividad citotóxica de amidas α,β insaturadas derivadas de furano en líneas celulares tumorales, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2004, pp. 33-35, 41-48.

26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16; 65(1-2):55-63.
27. Van de Loosdrecht A A, Beelen R H, Ossenkoppele G J, Broekhoven M G, Langenhuijsen M M., A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia, J Immunol Methods. 1994, 174(1-2):311-20
28. Green M L, Reade J L., Ware C F, Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines, Journal of Immunological methods, 70 (1984) 257-268.
29. Charoenporsook K., Fitzpatrick J.L, Smith J.E, The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*, Mycopathologia, 143, 105-111, 1998.
30. AOAC, Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed., AOAC, Arlington, VA, 1990, Cap.4, pp1.
31. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6^a ed., Secretaría de Salud, México, 1994, pp.69-71
32. Rodríguez J, Evaluación de la citotoxicidad de xantonas naturales y sus derivados acetilados y metilados en líneas celulares tumorales, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2004, pp. 53-60
33. Charoenporsook K., Fitzpatrick J.L, Smith J.E, The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*, Mycopathologia, 143, 105-111, 1998.

34. De Almeida M. C, Silva A. C, Barral A, Barral N M, A simple method for human peripheral blood monocyte isolation, *Mem Ins Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol.95(2):221-223.Mar./Apr. 2000.
35. Kwan S.B, Roberts R.L, Ank B.J, Stiehm E.R, Effects of anticoagulant, serum, and temperature on the natural killer activity of human peripheral blood mononuclear cells stored overnight, *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, Vol. 3, No.3, May 1996, pp. 260-264
36. Kirszberg C ,. Rumjanek V. M, Capella M. A. M, Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy, *Cancer Chemother Pharmacol* (2005) 56: 659–665
37. Flores del V.N, Evaluación nutricional y toxicológica del ejote de colorín después de ser sometido a un proceso de cocción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. México 2003. pp.19, 80, 81.
38. García-Mateos R., Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez, Villegas-Monter, Isolation of alkaloids of *Erythrina* from tissue culture, *Phytochemical analysis*, 10, 12-16(1999)
39. Guerrero R L, Estudio comparativo de la composición química y los factores tóxicos de dos variedades de *Erythrina* (*E. breviflora* y *E americana*.), Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM, México, 1980. pp.30-32, 36-38.
40. The Merck Index, 12^a ed, Merck & Co., 1996. p. 625.
41. Diaz B.L, Farmacognosia, Elsevier, 2003, pp. 127-129.
42. Decker M., Anderson D J, Brioni J D, Donnelly-Roberts D L, Chae Hee Kang, O'Neill A, Piattoni-Kaplan, Swanson S and J P. Sullivan, Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors, [European Journal of Pharmacology, Volume 280, Issue 1](#) , 23 June 1995, Pages 79-89

43. Técnicas de estudio en líneas celulares. Capítulo 1 Introducción al cultivo celular, en línea, Internet, 03 julio 2006, disponible WWW <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>
44. 1028 Introducción, en línea, Internet, 03 julio 2006, disponible WWW <http://servet.uab.es/histologia/docencia/HMA2005/Temasteoria/Tema8/complem/cultivo.doc>

8. ANEXOS

A. VALIDACIÓN

Precisión del método y precisión del sistema.

Fórmulas

MEDIA ARITMÉTICA:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

DESVIACIÓN ESTÁNDAR:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

n = número de mediciones.

Linealidad del sistema

Fórmulas

PENDIENTE

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica).

ORDENADA AL ORIGEN

$$b_o = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_o \sum y}{n-2}}$$

Cálculos

En 5 g semilla = 0.02855 g alcaloides
 Muestra: Atropina Seca pm = 676.82 meq/g = 0.33841
 H₂SO₄ = 0.02094 N

80% aprox 0.02284 g

peso (g)	%	ml finales	g por titulación
0.0225	78.8091	2.84	0.0201
0.0226	79.1594	2.87	0.0203
0.0223	78.1086	2.81	0.0199
promedio			0.0201
desviación			0.0002
CV			0.0106

90% aprox 0.025695 g

peso (g)	%	ml finales	g por titulación
0.0257	90.0175	3.27	0.0232
0.0261	91.4186	3.41	0.0242
0.0257	90.0175	3.28	0.0232
promedio			0.0235
desviación			0.0006
CV			0.0235

100% aprox 0.02855 g

peso (g)	%	ml finales	g por titulación
0.0285	99.8249	3.98	0.0282
0.0289	101.2259	3.92	0.0278
0.0287	100.5254	3.93	0.0278
promedio			0.0279
desviación			0.0002
CV			0.0082

110% aprox 0.031405 g

peso (g)	%	ml finales	g por titulación
0.0314	109.9825	4.31	0.0305
0.0318	111.3835	4.43	0.0314
0.0316	110.6830	4.34	0.0308
promedio			0.0309
desviación			0.0004
CV			0.0143

120% aprox 0.03426 g

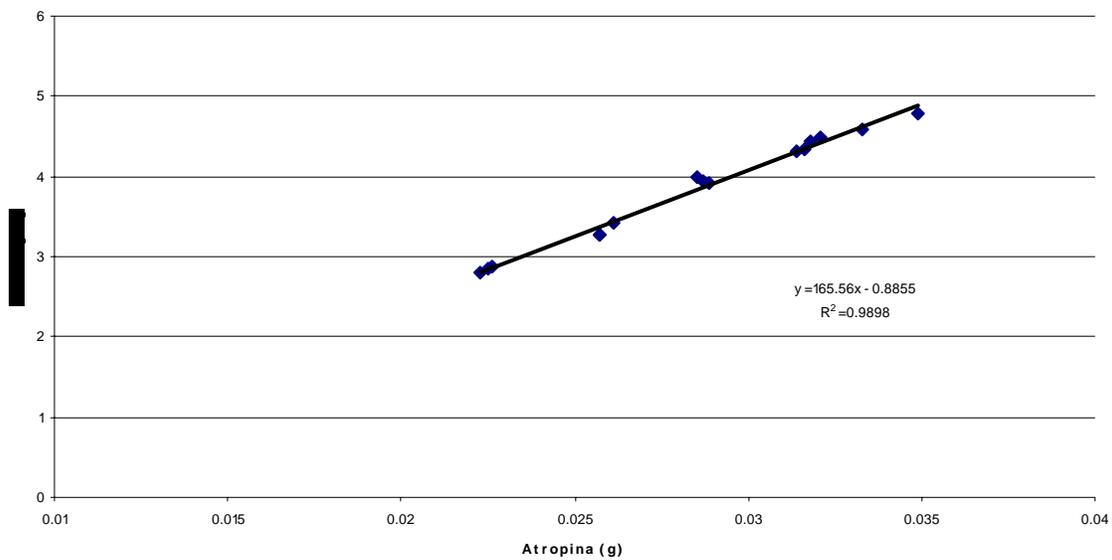
peso (g)	%	ml finales	g por titulación
0.0333	116.6375	4.59	0.0325
0.0342	119.7898	4.5	0.0319
0.0349	122.2417	4.78	0.0339
promedio			0.0328
desviación			0.0010
CV			0.0309

solución	x (g)	y(ml)
78.81	0.0225	2.84
79.16	0.0226	2.87
78.11	0.0223	2.81
90.02	0.0257	3.27
91.42	0.0261	3.41
90.02	0.0257	3.28
99.82	0.0285	3.98
101.23	0.0289	3.92
100.53	0.0287	3.93
109.98	0.0314	4.31
111.38	0.0318	4.43
110.68	0.0316	4.34
116.64	0.0333	4.59
119.79	0.0321	4.5
122.24	0.0349	4.78

pendiente	165.555412
ordenada	-0.88554406
R2 =	0.9998
Sx	0.4261
Sy	57.26
Sx2	0.01234071
Sy2	225.1328
Sxy	1.665741
n	15

S x/y	0.07158424
Sb1	4.6535363
t 0.975, n-2	2.16
IC(b1)	175.60705
	155.503773

Linealidad del sistema



Límite de detección y límite de cuantificación.

Cálculos

Muestra: semilla de colorín.

muestra	peso (g)	ml
a	2.508	2.2
b	2.5084	2.37
c	2.5089	2.21
promedio	2.50843333	2.26
desviacion	0.00045092	0.09539392
CV	0.00017976	0.0422097

muestra	peso (g)	ml
a	1.0056	0.81
b	1.006	0.8
c	1.0061	0.8
Promedio	1.0059	0.80333333
Desviación	0.00026458	0.0057735
CV	0.00026302	0.00718693

muestra	peso (g)	ml
a	0.6005	0.22
b	0.6188	0.29
c	0.6084	0.21
Promedio	0.60923333	0.24
Desviación	0.00917842	0.04358899
CV	0.01506552	0.18162079

muestra	peso(g)	ml
a	0.3407	0.16
b	0.3409	0.11
c	0.3418	0.13
Promedio	0.34113333	0.13333333
Desviación	0.00058595	0.02516611
CV	0.00171765	0.18874586

Linealidad del método

Fórmulas

PENDIENTE

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (cantidad adicionada – cantidad recuperada).

ORDENADA AL ORIGEN

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE REGRESIÓN.

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Cálculos

En 5 g semilla =0.02855 g alcaloides
 Muestra: Atropina Seca pm =676.82 meq/g =0.33841
 H2SO4 =0.02094 N

80% =0.02284 g alcaloides 30 % atropina= 0.00854 g

Muestra	Semilla(g)	Atropina (g)	ml finales	ml fin atrp	atrop por tit	% recobro
1	2.5154	0.0085	3.44	1.18	0.0084	98.3746
2	2.5153	0.0086	3.46	1.2	0.0085	98.8787
3	2.5159	0.0084	3.43	1.17	0.0083	98.7021

Promedio 98.6518
 Desviación 0.2558
 CV 0.0026

100% 0.02855 g alcaloides 50 % atropina= 0.01425 g

Muestra	Semilla(g)	Atropina (g)	ml finales	ml fin atrp	atrop por tit	% recobro
1	2.5157	0.0146	4.31	2.05	0.0145	99.4995
2	2.5172	0.0146	4.29	2.03	0.0144	98.5288
3	2.5172	0.0143	4.24	1.98	0.0140	98.1181

Promedio 98.7154
 Desviación 0.7094
 CV 0.0072

120% 0.03426 g alcaloides 60 % atropina= 0.01996

Muestra	Semilla(g)	Atropina (g)	ml finales	ml fin atrp	atrop por tit	% recobro
1	2.515	0.0203	5.06	2.8	0.0198	97.7421
2	2.5157	0.0199	5.02	2.76	0.0196	98.2824
3	2.515	0.0203	5.08	2.82	0.0200	98.4403

Promedio 98.1550
 Desviación 0.3661
 CV 0.0037

Muestra	Atropina adicionada(g) X	Atropina recuperada(g) Y	% recobro Z
1	0.0085	0.0084	98.3746
2	0.0086	0.0085	98.8787
3	0.0084	0.0083	98.7021
4	0.0146	0.0145	99.4995
5	0.0146	0.0144	98.5288
6	0.0143	0.0140	98.1181
7	0.0203	0.0198	97.7421
8	0.0199	0.0196	98.2824
9	0.0203	0.0200	98.4403

pendiente	0.9781
ordenada	9.00E-05
R2 =	0.9998
Σx	0.1295
Σy	0.1275
Σx^2	0.0021
Σy^2	0.0020
Σxy	0.002034266
n	9

Porcentaje de recobro	
Σz	886.5666
Σz^2	87335.3392373697
Promedio z	98.5074
S	0.496287747
CV	0.503807585

S x/y	0.000153064
Sb1	0.010705923
t 0.975, n-2	2.365
IC(β_1)	1.003419508
	0.952780492

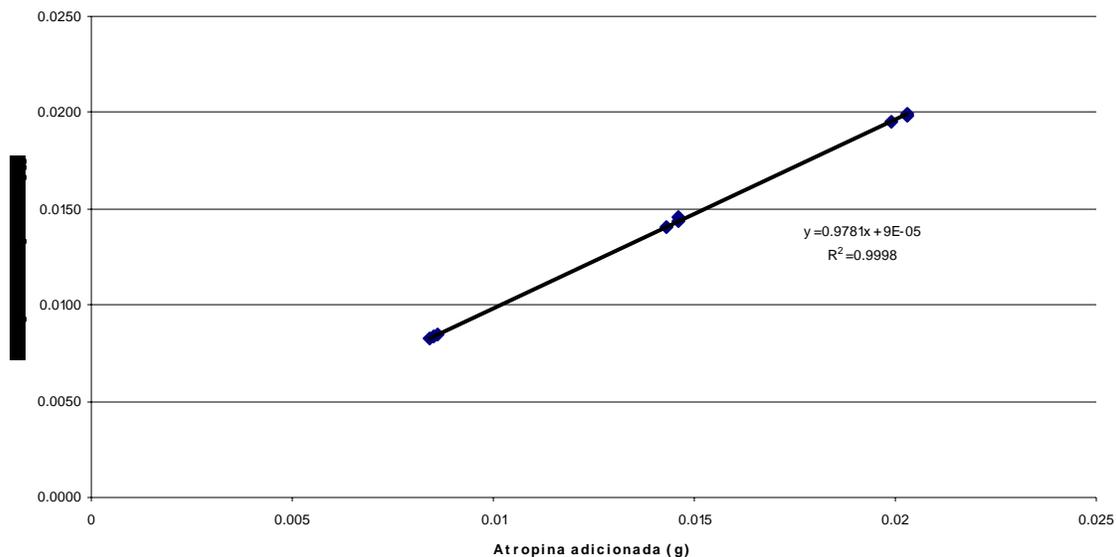
t 0.975, n-1	2.306
IC(μ) =	98.8888788
	98.1259191

promedio x	0.014388889
Sb0	0.000162276

IC(β_0)	4.74E-04
	-2.94E-04

promedio y	0.0142
CV y/x	1.080601291

Linealidad del método



Exactitud y repetibilidad

Fórmulas

MEDIA ARITMÉTICA:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

DESVIACIÓN ESTÁNDAR:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL:

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Cálculos

En 5 g semilla = 0.02855 g alcaloides
 Muestra: Atropina Seca pm = 676.82 meq/g = 0.33841
 H2SO4 = 0.02094 N

Muestra	Semilla (g)	Atropina (g)	ml finales atropina	Atropina por titulación (g)
1	2.5157	0.0146	2.05	0.0145
2	2.5172	0.0146	2.03	0.0144
3	2.5172	0.0143	1.98	0.0140
4	2.5154	0.0142	1.97	0.0140
5	2.5154	0.0142	1.98	0.0140
6	2.5171	0.0143	1.95	0.0138

Porcentaje de recobro	
$\sum z$	589.896831
$\sum z^2$	58000.9446
Promedio z	98.3161385
S	0.9556
CV	0.9720
n = 6	6
t 0.975, n-1	2.571
IC(μ) =	99.3191563
	97.3131207

B. CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES

FLOR

peso (g)	H ₂ SO ₄ 0.02 N (ml)	g de alcaloides/ 100 g muestra B.S.
5.1498	2.41	0.2903
5.0694	2.3	0.2815
5.0402	2.48	0.2837
5.0096	2.37	0.2728
5.0051	2.47	0.2846
5.0591	2.49	0.2838

Promedio	0.2828
Desviación estándar	0.0057
CV	2.0226 %

SEMILLA INMADURA

peso (g)	H ₂ SO ₄ 0.02 N (ml)	g de alcaloides/ 100 g muestra B.S.
5.2605	2.83	0.3207
5.3395	2.8	0.3126
5.1271	2.82	0.3279
5.1227	2.83	0.3294
5.2418	2.85	0.3242
5.1202	2.84	0.3307

Promedio	0.3243
Desviación estándar	0.0068
CV	2.0835 %

SEMILLA

peso(g)	H ₂ SO ₄ 0.02 N (ml)	g de alcaloides/ 100 g muestra B.S.
5.3194	4.77	0.5427
5.1771	4.7	0.5494
5.1515	4.64	0.5451
5.0781	4.5	0.5363
5.0447	4.58	0.5494
5.0165	4.55	0.5489

Promedio	0.5453
Desviación estándar	0.0052
CV	0.9534 %

Cálculo de t student.

Semilla vs Semilla inmadura

Ho=sem= S I

Hi=sem ≠ S I

Ensayo	Semilla	S I
1	0.54268412	0.32073961
2	0.54941775	0.31264438
3	0.54509934	0.32792196
4	0.53629364	0.32936746
5	0.54944157	0.32415863
6	0.54891104	0.33069269
Suma x	3.27184747	1.94552473
Promedio	0.54530791	0.32425412
Suma x 2	1.78429945	0.63107261

n=6

gl = 10 t= 63.5181551
t tablas= 1.812

t tablas < t calculada

hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

Semilla vs Flor

Ho=sem= flor

Hi=sem ≠ flor

Ensayo	Semilla	Flor
1	0.54268412	0.2903473
2	0.54941775	0.28148962
3	0.54509934	0.28373716
4	0.53629364	0.27280832
5	0.54944157	0.28457484
6	0.54891104	0.28381699
Suma x	3.27184747	1.69677425
Promedio	0.54530791	0.28279571
Suma x 2	1.78429945	0.48000405

n=6

gl= 10 t= 83.1912599
t tablas 1.812

t tablas < t calculada

hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

Flor vs semilla inmadura

Ho=flor= S I

Hi=flor ≠ S I

Ensayo	Flor	S I
1	0.2903473	0.32073961
2	0.28148962	0.31264438
3	0.28373716	0.32792196
4	0.27280832	0.32936746
5	0.28457484	0.32415863
6	0.28381699	0.33069269
suma x	1.69677425	1.94552473
promedio	0.28279571	0.32425412
Suma x 2	0.48000405	0.63107261

n=6

gl= 10 t= -11.4723933
t tablas 1.812

t tablas < t calculada

hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

C. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

Descongelamiento

- a) Se preparó medio de cultivo D-MEM y se atemperó a 37° C. Posteriormente se colocaron 4 ml de medio de cultivo en una caja de cultivo de 5 cm de diámetro rotulada.
- b) Se sacó un criotubo del banco de células contenido en nitrógeno líquido y se descongeló a con ayuda de temperatura corporal.
- c) Se agregó el contenido del criotubo en la caja de cultivo y se distribuyó el contenido con movimientos circulares suaves.
- d) Se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta que las células se adhirieron a la superficie de la caja de cultivo.

Propagación

Se observó el cultivo celular en el microscopio invertido, después de su descongelamiento, para observar su grado de confluencia. Al alcanzar el 80 – 90 % de confluencia se procedió a la propagación de las líneas.

Para subcultivar las células:

- a) Se aplicaron movimientos circulares suaves a la caja y se decantó el sobrenadante.
- b) Se llevó a cabo un lavado con PBS- EDTA (3 ml) y se decantó una vez más el sobrenadante
- c) Se adicionó PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular (1 a 2 ml) y se incubó a 37° C por 5 min.

- d) Se desprendieron las células con ayuda de una micropipeta de 1 ml vertiendo el PBS-EDTA hasta observar turbidez en la suspensión celular
- e) Se disgregaron las células desprendidas, succionando y expulsando suavemente la suspensión hasta obtener células individuales. Ésto se comprobó con ayuda del microscopio.
- f) Se adicionó una alícuota de la suspensión celular en una caja de cultivo con medio D-MEM fresco y se distribuyó uniformemente con movimientos circulares.
- g) Se dejó que las células sedimentaran por 10 minutos aproximadamente sobre una superficie plana y se incubaron a 37 ° C, 5 % CO₂ y atmósfera húmeda.

Criopreservación.

Para congelar la línea de cultivo se requirió que poseyera una confluencia alta.

Se realizaron los pasos a-e de la sección anterior y se procedió de la siguiente manera:

- a) La suspensión celular se colectó con una micropipeta de 1 ml y se colocó en un tubo de centrifuga. Se centrifugó a 800 FCR. por cinco minutos.
- b) Con el botón celular en el fondo del tubo, se decantó el PBS-EDTA y se resuspendió el botón con el PBS-EDTA residual
- c) Se adicionó 4-5 ml de solución del suero fetal bovino inactivado con 1% de DMSO y se homogenizó para lograr una suspensión celular uniforme
- d) Se alicuotó la suspensión en criotubos.
- e) Se congelaron los criotubos en posición vertical al -70 ° C por 2-4 horas.
- f) Se introdujeron los criotubos en nitrógeno líquido

D. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.

Ejemplo de cálculo

Semilla en HeLa

	g muestra	humedad	Concentraciones			
			Stock	0.02091 g/ml		
				g/ml	mg/ml	conc en pozo mg/ml
semilla 8	5.0189	5.539				
semilla 9	5.0112					
sem 8 BS	4.7409		1 en 10	0.00209	2.09083989	0.41816798
sem 9BS	4.7336		1 en 20	0.00105	1.04541994	0.20908399
total	9.4745		1 en 30	0.00070	0.69694663	0.13938933
			1 en 40	0.00052	0.52270997	0.10454199
			1 en 50	0.00042	0.41816798	0.0836336

Alcaloides en semilla BS=0.5517 g/ 100 g
Alcaloides en semilla 8 y 9=0.0523 g

Resultados de densidad óptica

CS	CS	CD	1 en 10	1 en 20	1 en 30	1 en 40	1 en 50
0.515	0.491	0.538	0.183	0.162	0.169	0.307	0.362
1.031	0.397	0.512	0.187	0.169	0.189	0.345	0.4
0.472	0.44	0.654	0.171	0.17	0.192	0.338	0.398
0.401	0.419	0.51	0.178	0.175	0.169	0.339	0.421
0.572	0.418	0.6	0.183	0.175	0.371	0.299	0.364
0.451	0.475	0.592	0.191	0.174	0.208	0.322	0.384
0.519	0.48	0.494					
0.51	0.526	0.513					
0.472	0.461	0.491					
0.625	0.545	0.533					
0.567	0.606	0.582					
0.638	0.666	0.664					
Promedio	0.52904167	0.55691667	0.18216667	0.17083333	0.21633333	0.325	0.38816667
% inhibición			65.5666693	67.7089076	59.1084508	38.5681657	26.6283374

El porcentaje de de inhibición celular se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \left[1 - \frac{\bar{x} \text{ abs problema}}{\bar{x} \text{ abs control}} \right]$$

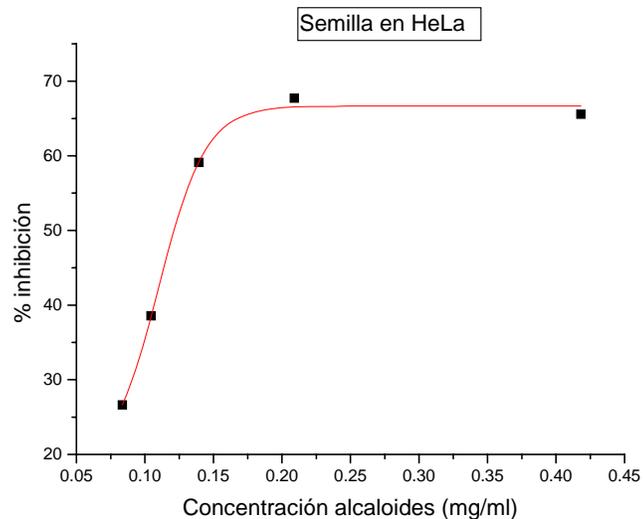
Donde:

$\bar{x} \text{ abs problema}$ = absorbancia promedio del tratamiento

$\bar{x} \text{ abs control}$ = absorbancia promedio del control

Se grafica en Origin 5.0 los resultados y se hace una regresión no lineal de tipo sigmoideo,

Concentración mg/ml	% inhibición
0.41816798	65.5666693
0.20908399	67.7089076
0.13938933	59.1084508
0.10454199	38.5681657
0.0836336	26.6283374



Del gráfico obtenido se toman los valores más cercanos por arriba y por debajo del 50 %.

Se hace una interpolación considerando que hay una tendencia lineal entre el punto y el valor de 50. Se promedian dando el valor final

IC50 Hela	
Concentración mg/ml	% inhibición
1.18E-01	47.66829
1.23E-01	51.3204
Interpolando	
Concentración mg/ml	% inhibición
0.12340489	50
0.12014715	50
0.12177602	prom 50

Resultados de citotoxicidad.

Líneas Celulares

Extracto de flor

1er ensayo	HELA	K562
Concentración mg/ml	% inhibición HELA	% inhibición K562
0.4573441	91.6763848	91.1342894
0.22867205	91.5306122	90.5432421
0.11433603	84.6938776	84.4936984
0.07622402	63.7463557	62.5032595
0.05716801	55.4081633	44.7023033

IC50 HELA	
Concentración mg/ml	% inhibición
5.72E-02	55.40816
5.16E-02	50

IC50 K562	
Concentración mg/ml	% inhibición
6.01E-02	47.39058
6.30E-02	50.13177
6.34E-02	50
6.28E-02	50
6.31E-02	prom 50

2o ensayo	HELA	K562
Concentración mg/ml	% inhibición HELA	% inhibición K562
0.21905815	63.6051502	71.9461511
0.10952908	56.5379113	66.606433
0.07301938	39.4277539	42.3744127
0.05476454	32.9899857	43.9465125
0.02738227	16.2575107	19.8771232

Concentración mg/ml	% inhibición
8.91E-02	48.8112
9.24E-02	50.07955
9.13E-02	50
9.22E-02	50
9.17E-02	prom 50

Concentración mg/ml	% inhibición
7.29E-02	49.12693
7.61E-02	50.7583
0.07415485	50
0.07497296	50
0.0745639	prom 50

3er ensayo	HELA	K562
Concentración mg/ml	% inhibición HELA	% inhibición K562
0.21805512	73.0014964	64.6720919
0.10902756	75.9943294	67.7986733
0.07268504	77.033945	63.3180606
0.05451378	70.8277546	59.7483417
0.02725689	32.2674648	48.3826848

Concentración mg/ml	% inhibición
3.37E-02	45.97593
3.70E-02	52.33538
0.03667136	50
0.03531072	50
0.03599104	prom 50

Concentración mg/ml	% inhibición
3.05E-02	49.77015
3.37E-02	51.20568
0.03063081	50
0.03292603	50
0.03177842	prom 50

Promedio 1,2,3 0.0598 mg/ml
Desviación 0.02876515

Promedio 1,2,3 0.0565 mg/ml
Desviación 0.02214686

Líneas celulares
Extracto de semilla inmadura.

1er ensayo		HELA	K562
Concentración mg/ml	% inhibición HeLa	% inhibición K562	
0.27398436	67.2341446	64.4189644	
0.13699218	65.2559645	59.8553099	
0.09132812	35.6551972	42.2581673	
0.06849609	27.3828078	38.5066885	
0.03424804	18.5709148	16.8486668	

IC50 HELA	
Concentración mg/ml	% inhibición
1.07E-01	49.43133
1.11E-01	52.33743
0.10862544	50
0.10647256	50
0.107549	prom 50

IC50 K562	
Concentración mg/ml	% inhibición
1.03E-01	49.93748
1.07E-01	51.1538
0.10344935	50
0.10496776	50
0.10420856	prom 50

2º ensayo		HELA	K562
Concentración mg/ml	% inhibición HeLa	% inhibición K562	
0.27010109	74.679295	68.2864683	
0.13505054	68.0973504	60.0873601	
0.0900337	41.2300683	48.2141232	
0.06752527	31.6988371	33.3242333	
0.05402022	12.5284738	10.003185	

Concentración mg/ml	% inhibición
9.43E-02	48.48624
9.80E-02	50.63092
0.0972544	50
0.09674918	50
0.09700179	prom 50

Concentración mg/ml	% inhibición
8.70E-02	47.71239
9.06E-02	50.00991
0.09115033	50
0.09062204	50
0.09088618	prom 50

3º ensayo		HELA	K562
Concentración mg/ml	% inhibición HeLa	% inhibición K562	
0.26823857	76.0469667	72.0544985	
0.13411929	46.1643836	50.3511194	
0.08941286	40.665362	45.1653562	
0.06705964	29.5499022	33.2092912	
0.05364771	19.9804305	7.16043455	

Concentración mg/ml	% inhibición
1.34E-01	49.62872
1.37E-01	50.60421
0.13465993	50
0.13566065	50
0.13516029	prom 50

Concentración mg/ml	% inhibición
1.01E-01	48.53764
1.05E-01	50.1337
0.10397086	50
0.10429113	50
0.10413099	prom 50

Promedio 1,2,3 0.1132 mg/ml
Desviación 0.0197

Promedio 1,2,3 0.0997 mg/ml
Desviación 0.0077

Líneas Celulares
Extracto de semilla

1er ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición HeLa	% inhibición K562
0.41898096	68.4735138	63.2742288
0.20949048	38.9816575	39.5676463
0.13966032	15.8197606	36.6043235
0.10474524	16.4568669	11.5861064
0.08379619	12.634229	11.7804226

IC50 HeLa

Concentración mg/ml	% inhibición
0.22582	48.2248
0.2315	51.18178
0.23413265	50
0.2261547	50
0.23014367	prom 50

IC50 K562

Concentración mg/ml	% inhibición
0.24855	49.87586
0.25423	50.60865
0.24916864	50
0.25117248	50
0.25017056	prom 50

2o ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición HeLa	% inhibición K562
0.41816798	65.5666693	49.0391848
0.20908399	67.7089076	53.8808726
0.13938933	59.1084508	52.81406
0.10454199	38.5681657	35.5399029
0.0836336	26.6283374	30.7802776

Concentración mg/ml	% inhibición
1.18E-01	47.66829
1.23E-01	51.3204
0.12340489	50
0.12014715	50
0.12177602	prom 50

Concentración mg/ml	% inhibición
1.26E-01	49.27956
1.28E-01	50.17452
0.12800439	50
0.12784377	50
0.12792408	prom 50

3º ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición HeLa	% inhibición K562
0.41452836	82.3306562	82.5017155
0.20726418	63.5399303	47.4757377
0.13817612	35.1719958	25.5955299
0.10363209	14.6537354	18.5079894
0.08290567	9.92574633	21.1841976

Concentración mg/ml	% inhibición
1.67E-01	48.13257
1.73E-01	50.72394
0.17370774	50
0.1703732	50
0.17204047	prom 50

Concentración mg/ml	% inhibición
0.21218	49.80551
0.2178	52.39706
0.21300856	50
0.20783609	50
0.21042232	prom 50

Promedio 1,2,3 0.174653388
Desviación 0.054231056

Promedio 1,2,3 0.19617232
Desviación 0.06235661

Cálculos t student

Semilla vs Semilla inmadura en HELA

	Ensayo	IC50 HELA Sem	IC50 HELA S I
Ho=sem= S I	1	0.230143672	0.107549
Hi=sem ≠ S I	2	0.121776021	0.09700179
	3	0.172040471	0.13516029

n=3	Suma x	0.523960164	0.33971108
	Promedio	0.174653388	0.11323703
	Suma x 2	0.097393433	0.03924444

t= 1.84360922

gl=4

t tablas 2.132

t tablas > t calculada **No hay diferencia significativa.** Se acepta Ho

Semilla vs Flor en HELA

	Ensayo	IC50 HELA Sem	IC50 HELA flor
Ho=sem= flor	1	0.230143672	0.05158987
Hi=sem ≠ flor	2	0.121776021	0.09174678
	3	0.172040471	0.03599104

n=3	Suma x	0.523960164	0.1793277
	Promedio	0.174653388	0.0597759
	Suma x 2	0.097393433	0.01237434

t =3.241266

gl=4

t tablas 2.132

t tablas < t calculada Si hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

Flor vs Semilla inmadura en HELA

	Ensayo	IC50 HELA flor	IC50 HELA S I
Ho=flor= S I	1	0.051589874	0.107549
Hi=flor ≠ S I	2	0.091746784	0.09700179
	3	0.035991042	0.13516029

n=3	Suma x	0.1793277	0.33971108
	Promedio	0.0597759	0.11323703
	Suma x 2	0.012374343	0.03924444

t= -2.65572118

gl=4

t tablas 2.132 -2.132

t tablas < t calculada. Si hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

Semilla vs Semilla inmadura en K562

	Ensayo	IC50 K562 Sem	IC50 K562 S I
Ho=sem= S I	1	0.250170557	0.10420856
Hi=sem ≠ S I	2	0.127924082	0.09088618
	3	0.210422325	0.10413099

n=3	Suma x	0.588516963	0.29922573
	Promedio	0.196172321	0.09974191
	Suma x 2	0.123227433	0.02996299

t= 2.65847093

gl=4

t tablas 2.132

t tablas < t calculada Hay diferencia significativa Se rechaza Ho

Semilla vs Flor en K562

	Ensayo	IC50 K562 Sem	IC50 K562 flor
Ho=sem= flor	1	0.250170557	0.06309602
Hi=sem ≠ flor	2	0.127924082	0.0745639
	3	0.210422325	0.03177842

n=3	Suma x	0.588516963	0.16943834
	Promedio	0.196172321	0.05647945
	Suma x 2	0.123227433	0.01055075

t=3.65641769

gl=4

t tablas 2.132

t tablas < t calculada .Hay diferencia significativa.Se rechaza Ho

Flor vs semilla inmadura en K562

	Ensayo	IC50 K562 flor	IC50 K562 S I
Ho=flor= SI	1	0.063096016	0.10420856
Hi=flor ≠ SI	2	0.074563904	0.09088618
	3	0.031778422	0.10413099

n=3	Suma x	0.169438343	0.29922573
	Promedio	0.056479448	0.09974191
	Suma x 2	0.010550751	0.02996299

t=-3.19717107

gl=2

t tablas 2.132 -2.132

t tablas < t calculada. Hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

Citotoxicidad en CMSP

Extracto de flor

1er ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
1.13605478	71.5379706
0.28401369	64.7734525
0.14200685	57.626037
0.07100342	44.3522655

IC 50

Concentración mg/ml	% inhibición
1.35E-01	46.82269
1.56E-01	54.73507
0.14421427	50
0.14218489	50
1.43E-01	prom

3er ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
1.16221118	75.435638
0.29055279	76.2788083
0.1452764	49.6908375
0.0726382	43.901068

Concentración mg/ml	% inhibición
1.28E-01	44.8918
1.47E-01	50.35849
0.14260956	50
0.14546703	50
1.44E-01	prom

2º ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
1.16221118	70.099837
0.29055279	55.8883456
0.1452764	32.9665852
0.0726382	24.5110024

Concentración mg/ml	% inhibición
2.39E-01	48.18193
2.57E-01	51.11971
0.24785225	50
0.25167396	50
2.50E-01	prom

4o ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
1.16221118	64.5295056
0.29055279	54.8325359
0.1452764	29.1866029
0.0726382	4.94417863

Concentración mg/ml	% inhibición
2.39E-01	48.76455
2.57E-01	51.24519
0.24489101	50
0.25105771	50
2.48E-01	prom

Promedio	0.1962 mg / ml
Desviación	0.0608

Citotoxicidad en CMSP

Extracto de semilla

1er ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
2.11983554	71.8826406
0.52995889	36.0737571
0.26497944	24.8166259
0.13248972	16.9213529

2º ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
2.11983554	78.4991568
0.52995889	31.9842608
0.26497944	-2.75435638
0.13248972	-1.91118606

3er ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
2.11983554	53.046252
0.52995889	26.2519936
0.26497944	5.58213716
0.13248972	7.75119617

IC50 CMSP

Concentración mg/ml	% inhibición
0.90722	49.58541
0.9409	50.57775
0.91480538	50
0.93015209	50
9.22E-01	prom

Concentración mg/ml	% inhibición
0.67368	47.56206
0.70511	50.43335
0.70821155	50
0.69905132	50
7.04E-01	prom

Concentración mg/ml	% inhibición
0.57038	49.30122
0.60406	52.63667
0.57846439	50
0.5738015	50
5.76E-01	prom

Promedio 1,2,3, 0.7341 mg/ml
Desviación 0.1752

Extracto de semilla inmadura

1er ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
1.29492	68.5386088
0.32373	73.2610083
0.16186	72.4952138
0.08093	59.5405233

2º ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
1.28598937	67.603912
0.32149734	55.3789731
0.16074867	50.2852486
0.08037434	29.3500407

3er ensayo

Concentración mg/ml	% inhibición
1.3135358	80.8881394
0.32838395	74.9297358
0.16419198	72.8499157
0.08209599	54.1877459

IC50 CMSP

Concentración mg/ml	% inhibición
8.09E-02	59.54052
6.80E-02	50

Concentración mg/ml	% inhibición
1.83E-01	49.0842
2.03E-01	51.44136
1.86E-01	50
1.97E-01	50
1.92E-01	promedio

Concentración mg/ml	% inhibición
8.21E-02	54.76516
7.50E-02	50

Promedio 1,2,3 1.12E-01 mg/ml
Desviación 0.06946539

Cálculos t student

Semilla vs Semilla inmadura

Ensayo	IC50 Sem	IC50 S I
1	0.922478738	0.067962121
2	0.703631434	0.191624288
3	0.576132942	0.074956414

n=3

Suma x	2.202243113	0.334542823
Promedio	0.734081038	0.111514274
Suma x 2	1.677993383	0.046957182

t= 5.722333915

gl= 4

t tablas 2.132

t tablas < t calculada. Hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

Semilla vs Flor

Ensayo	IC50 Sem	IC50 flor
1	0.922478738	0.14319958
2	0.703631434	0.249763109
3	0.576132942	0.144038297
4		0.247974361

n=4

Suma x	2.202243113	0.784975347
Promedio	0.734081038	0.196243837
Suma x 2	1.677993383	0.165126045

t= 2.698749293

gl= 5

t tablas 2.015

t tablas < t calculada. Hay diferencia significativa. Se rechaza Ho

Flor vs Semilla inmadura

Ensayo	IC50 flor	IC50 S I
1	0.14319958	0.067962121
2	0.249763109	0.191624288
3	0.144038297	0.074956414
4	0.247974361	

Ho=flor=S I

Hi=flor ≠ S I

n=4

Suma x	0.784975347	0.334542823
Promedio	0.196243837	0.111514274
Suma x 2	0.165126045	0.046957182

t=1.692985715

gl =5

t tablas 2.015

t tablas > t calculada .No hay diferencia significativa. Se acepta Ho.