



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN NUTRIMENTAL Y TOXICOLÓGICA
DE UN ALIMENTO DE COLORÍN (*Erythrina
americana*) TIPO TEMPEH PARA ALIMENTACIÓN
ANIMAL**

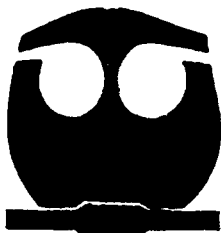
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

JUAN CARLOS RAMÍREZ OREJEL



MEXICO, D. F.

**EXAMENES FINALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

INDICE	Paginas
✓ Introducción _____	1
✓ Objetivos _____	3
Antecedentes _____	4
✓ Capítulo I	
1.1 Leguminosas _____	4
I. Aspectos nutricionales _____	5
II. Aspectos toxicológicos _____	7
1.2 Alcaloides en plantas _____	8
1.3 Leguminosas en México _____	10
I. <i>Erythrina americana</i> _____	11
II. Alcaloides en <i>Eythrina americana</i> _____	14
1.4 Estudios de citotoxicidad _____	17
1.5 Pruebas toxicológicas _____	19
1.6 Tempeh y microorganismos responsables de la fermentación _____	21
Metodología _____	25
✓ Capítulo II	
2.1 Recolección de muestras _____	26
2.2 Preparación de la muestra _____	26
2.3 Preparación de la suspensión de esporas _____	27
2.4 Elaboración del Tempeh de colorín _____	27
2.5 Análisis químico proximal _____	28
2.6 Cuantificación de alcaloides _____	29
I. Determinación semi-cuantitativa de alcaloides _____	29
II. Determinación cuantitativa de alcaloides y obtención de los extractos de alcaloides _____	30
2.7 Citotoxicidad de los extractos de alcaloides de colorín en líneas celulares y en células mononucleares _____	31
2.7.1 Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares Hela y K-562 _____	32
I. Cultivo de las líneas celulares Hela y K-562 en placas de 96 pozos	
a. Cultivo de las líneas celulares _____	32
b. Conteo celular en la cámara de Newbauer _____	33
c. Cultivo celular en las placas de 96 pozos _____	34
II. Preparación de las diluciones de los extractos de alcaloides, su distribución y exposición _____	34
III. Medición de viabilidad de células por la técnica del MTT _____	36
IV. Obtención del porcentaje de inhibición de la proliferación celular y el IC ₅₀ _____	37



INTRODUCCIÓN

En México existe una gran biodiversidad vegetal con potencial para ser incorporada en la alimentación animal, como por ejemplo las leguminosas, las cuales aportan proteína de alta calidad. Desafortunadamente algunas de estas contienen factores antinutricionales y tóxicos que si no son inactivados o eliminados ejercen efectos indeseables en su valor nutricional.

Existen en nuestro país alrededor de 1500 diferentes especies de leguminosas, la gran mayoría sin ser aprovechadas, tal es el caso de la *Erythrina americana* llamada comúnmente colorín, la cual es un árbol usado con frecuencia en ornamentación debido a sus flores decorativas y que se propaga fácilmente mediante estacas ya que no requiere de clima o nutrientes especiales para su desarrollo.

Estudios realizados anteriormente a las semillas de colorín han demostrado que tienen un alto contenido de proteína, grasa y fibra pero desafortunadamente presentan diversos factores antinutricionales tales como: hemaglutininas, inhibidores de tripsina y taninos, así como factores tóxicos como los alcaloides, los cuales han impedido el uso de esta leguminosa dentro de la alimentación animal.



A lo largo del tiempo el hombre ha desarrollado métodos que han permitido la disminución de factores antinutricionales y tóxicos presentes en las leguminosas. Un ejemplo de estos métodos es la elaboración del Tempeh.

El Tempeh está definido como un alimento realizado a partir de frijoles de soya, dentro de su procedimiento de elaboración se incluyen: un remojo y una fermentación con un hongo del género *Rhizopus*, ambos pasos han logrado la disminución de los factores antinutricionales que esta leguminosa presenta.

En el presente trabajo se plantea usar dicho proceso como una alternativa en la destoxificación de las semillas de *Erythrina americana* y obtener un producto tipo Tempeh de alta calidad nutricional, el cual podría ser considerado como uno de los ingredientes en la elaboración de dietas para animales rumiantes y monogástricos. De esta forma se lograría aprovechar el contenido proteico energético de esta leguminosa silvestre.



OBJETIVOS

GENERAL:

- Desarrollar un Tempeh de semillas de colorín (*Erythrina americana*) como un proceso económico para disminuir la concentración de alcaloides en estas semillas tóxicas y poder utilizarlas en alimentación animal

PARTICULARES:

- Conocer el efecto que tiene el proceso de la elaboración del Tempeh de colorín sobre la composición química.
- Evaluar el efecto de la elaboración del Tempeh de colorín en la concentración de alcaloides totales.
- Evaluar el efecto citotóxico que producen los alcaloides de *Erythrina americana* en las líneas celulares de adenocarcinoma de cervix (Hela) y de eritroleucemia humana (K-562), así como en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) para monitorear la eficiencia del proceso de destoxificación de las semillas de colorín.
- Evaluar la toxicidad aguda del Tempeh de semillas de colorín y compararla con semilla y semilla remojada para verificar la eficiencia del proceso de destoxificación.



ANTECEDENTES

CAPÍTULO I

1.1 LEGUMINOSAS

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

Son plantas cuyas semillas se encuentran en vainas, algunas de las cuales pueden presentar dehiscencia, es decir que cuando alcanzan la madurez se abren por ambas costuras o bien indehiscentes que no se abren. Sus nódulos radiculares contienen bacterias que fijan en el suelo el nitrógeno atmosférico a ello se debe que la mayoría de ellas proporcionan una gran parte de la proteína a nivel mundial que ingieren personas y animales. Son fácilmente adaptables de crecer bajo una amplia variedad de condiciones climáticas. Aunque las leguminosas y sus semillas difieren mucho en tamaño, forma y color, sus estructuras son muy parecidas, una cubierta delgada pero dura envuelve a una semilla con un pequeño embrión que dará origen a la raíz el tallo y a un par de hojas. Hay también un ojo o hilo, una especie de endospermo y los cotiledones que almacenan el material alimenticio de la semilla. ⁽¹⁾



La utilidad de las leguminosas es muy amplia, muchas de ellas son excelentes forrajes, fuentes de colorantes naturales y gomas de amplio uso en la industria, brindan maderas duras para la construcción y fabricación de muebles, algunas aportan también materias primas para la industria química y farmacéutica. (2)

I. Aspectos nutricionales

El hombre aprovecha diversas partes de las leguminosas para su alimentación, sin embargo es mayor el consumo de las semillas maduras, de acuerdo con las características de cada especie también se utilizan otras partes de la planta. Así por ejemplo las vainas inmaduras (ejotes) de varias leguminosas se ingieren con frecuencia en numerosas regiones, en otros sitios se aprovechan las hojas, los tallos, los germinados, las semillas inmaduras (verdes) y secas, las flores y las raíces. (3-5) Las semillas de las leguminosas se consideran fuente de energía y otros nutrientes aunque fluctúan en función de la especie, clima, almacenamiento, periodo de recolección, etc. (2) Entre sus principales componentes se encuentran:

1. Agua: cuando los frutos de las leguminosas están inmaduros, la composición se aproxima a la de una verdura, humedad del 60 - 80%, y en la semilla madura se disminuye, suele alcanzar valores del 6- 10%. (2)
2. Proteína: el contenido de proteínas en semillas maduras de leguminosas oscila entre 18 - 44%, por lo que son consideradas excelentes fuentes de proteína alimenticias. (2, 6)



3. Lípidos en la mayoría de las leguminosas prevalecen un bajo contenido de lípidos o grasa (1 - 6%) pero existen excepciones en algunas de éstas donde la grasa se considera macronutriente, como es el caso del cacahuete. Sus grasas en general, son mas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E. (5,7)
4. Carbohidratos: contienen de 20 hasta 60% en las semillas secas, la presencia de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos es muy variable, no obstante casi la totalidad de esta fracción es almidón, por lo que las leguminosas son consideradas una fuente barata de energía. (5,7)
5. Cenizas: se consideran fuentes de hierro (5 - 7.6 mg/100 g), calcio (68 - 250 mg/100 g) y fósforo (300 - 400 mg/100 g). (2,5)
6. Fibra: se constituye principalmente de tres polisacáridos; celulosa, pectina y hemicelulosa, así como lignina que se encuentra presente en las paredes celulares. (8)

Una de las principales limitantes del uso de las leguminosas desde el punto de vista nutricional, es la reducida cantidad en aminoácidos esenciales azufrados (metionina y cisteína), además de la presencia de factores antinutricionales y tóxicos. (9)



II. Aspectos toxicológicos

Todos los alimentos contienen una o mas sustancias de manera natural sin valor nutritivo, que en ciertos casos puede disminuir.⁽⁵⁾ Algunas de estas sustancias son peligrosas para el organismo que las ingiere, provocando distintos trastornos por ejemplo: inhibición del crecimiento, hipertrofia pancreática, alteración o lesión de la mucosa intestinal, hipoglucemia, disminución de la eficiencia alimentaria ocasionando una pérdida de nutrientes esenciales o interfiriendo en su utilización y función metabólica. De acuerdo al grado de toxicidad de las sustancias y la aparición de síntomas patológicos, estas sustancias pueden ser clasificadas en dos grupos:

- Sustancias antinutritivas: son compuestos susceptibles de provocar un desequilibrio en la cobertura de las necesidades de los nutrientes que si no es compensado por un aporte complementario del o de los nutrientes afectados, lleva a la instalación de una patología particular.
- Sustancias tóxicas: son compuestos cuyos efectos indeseables no pueden ser compensados por una suplementación alimenticia, ejerciendo sobre el organismo un efecto puramente tóxico. Pudiendo presentar una reactividad particular, ya sea como antagonistas, agonistas o inhibidores de enzimas de hormonas o aminoácidos. En casos específicos, sus modos de acción estarían favorecidos por la existencia de una predisposición genética propicia a la aparición de una patología determinada. ⁽¹⁰⁾



A menudo estos dos tipos de sustancias se emplean de manera indistinta con el término de factores tóxicos. Como en cualquier otro alimento, las leguminosas contienen compuestos nocivos cuyo tipo, concentración y efecto difieren de una especie a otra, es necesario que dichos compuestos sean identificados y cuantificados, de tal manera que su riesgo real para la salud humana o animal sea evaluada y puedan tomarse las medidas preventivas o correctivas correspondientes.

1.2 ALCALOIDES EN PLANTAS

Son un grupo de sustancias heterogéneas de origen vegetal, abarcando cerca de 6000 compuestos de compleja estructura molecular donde se encuentra un átomo de nitrógeno en un heterociclo, el cual actúa como base confiriéndole propiedades alcalinas a la molécula, además de actividades farmacológicas y/o fisiológicas muy marcadas en humanos y animales. ^(11, 12)

Se encuentran distribuidos en diversas familias de plantas y en varias partes de ellas como: las semillas, raíces, hojas, frutos y cortezas en forma de sales de ácidos orgánicos, combinados con azúcares como ramnosa, galactosa y glucosa o también en forma de ésteres de ácidos. ⁽¹³⁾



Aunque la función de los alcaloides en las plantas no es totalmente clara, existen algunas hipótesis que han sido discutidas como posibles funciones:

- Agentes de protección contra ataques de animales o insectos.
- Productos finales de la reacción de destoxificación representando un bloqueo metabólico de compuestos que de otra manera serían nocivos a la planta.
- Factores reguladores del crecimiento en particular como inhibidores de germinación.
- Sustancias de reserva capaces de proporcionar nitrógeno u otro elemento necesario para el mantenimiento de la planta.

Es de esperarse que la composición de los alcaloides puede variar con las condiciones ambientales como son: nutrientes de la tierra, tipo de tierra, pH, altitud y luz.

Los alcaloides tienen pesos moleculares que varían entre 100 y 8 900 g/mol, son sólidos cristalizables raramente coloreados. Son muy poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos y en alcoholes.

La nomenclatura de los alcaloides no es muy exacta, pero los que tienen un anillo heterocíclico son frecuentemente llamados alcaloides verdaderos y los que no tienen esos anillos se llaman protoalcaloides. Sus precursores son casi siempre



aminoácidos, otras unidades multicarbonadas pueden ser incorporadas en la estructura final de algunos alcaloides. Los alcaloides con o sin anillos heterociclos que no son derivados de aminoácidos son llamados pseudo alcaloides. ⁽¹⁴⁾

Los alcaloides encontrados en las semillas, raíces y corteza de plantas son aislados por extracción con ácidos diluidos (clorhídrico, sulfúrico, acético) o con alcohol. Si los alcaloides están presentes como sales, éstos son liberados por tratamientos con hidróxido de calcio antes de la extracción. ⁽¹⁵⁾

1.3 LEGUMINOSAS EN MÉXICO

En México existe una gran biodiversidad de leguminosas con un alto potencial para ser incorporados a la alimentación, tal es el caso de la *Erythrina americana* (colorín), cuyas flores en ciertas regiones del país son utilizadas como parte de la dieta. El colorín es un árbol usado con frecuencia en la ornamentación debido a sus flores decorativas, se propaga fácilmente mediante estacas, ya que requiere de escasos recursos para su desarrollo. ⁽¹⁾ En estudios anteriores sobre las semillas de éste árbol se han encontrado que tienen un alto contenido de proteína y grasa, pero también diversos factores antinutricionales y tóxicos, algunos de los cuales son termolábiles y pueden ser reducidos o inactivados mediante la cocción. ⁽⁴⁾ Dentro de los factores tóxicos que se encuentran en el colorín destacan los alcaloides por su actividad hipnótica y anestésica.



Se han realizado estudios de toxicidad, por vía intraperitoneal con extractos de alcaloides provenientes de semillas maduras de *Erythrina americana*, encontrándose que sus alcaloides son altamente tóxicos. (16)

La mayoría de los estudios sobre la *Erythrina americana* se centran en la semilla, aún cuando en ejotes existe un bajo contenido de tóxicos y factores antinutricionales en comparación con otros estados de maduración. (13)

I. Erythrina americana

El género *Erythrina* pertenece a la familia *leguminosae* y comprende cerca de 115 especies de amplia distribución en las regiones tropicales del mundo. Una gran cantidad de estas se encuentran en el sur de México y Centroamérica. Este género se describe en la literatura como productor de forraje, madera para manualidades, un árbol de soporte para cultivos trepadores, un árbol de sombra para el café, cacao u otros cultivos y un árbol ornamental. Los árboles de *Erythrina* producen biomasa que mejora la estructura de la tierra, adiciona nitrógeno, ayuda al control de la maleza, reduce la erosión y evaporación y facilita la infiltración de agua. (1)

La especie *Erythrina americana* comúnmente llamada colorín, se le conoce también como Tzon-pantli, Patol, Chocolín, Madre Chontal, Chacmolé y Pureque. Es una especie que forma parte de la flora nativa de México.



Sus árboles de follaje frondoso y caducifolio, verde claro, llegan a medir hasta 9 metros de altura, por lo general se utilizan en jardinería por su llamativa floración (Figura 1.3.1), su tallo es amarillento e irregular y sus ramas espinosas, las hojas son trifoliadas con hojuelas de aproximadamente 10 cm de largo (Figura 1.3.2), casi deltoides en la mayoría de los casos glabras, provistas de estípulas. Sus flores comúnmente de color rojizo-naranja (Figura 1.3.3), puntiagudas y muy decorativas están dispuestas en racimos de forma cónica cortos y densos en los extremos de las ramas, generalmente cuando están desprovistos de hojas. (1)



Figura 1.3.1 Árbol de colorín *Erythrina americana*





Figura 1.3.2 Hojas de colorín



Figura 1.3.3 Flores de colorín

El fruto es una legumbre (Figura 1.3.4) como de 20 cm de largo y 2 cm de ancho, con estrangulamiento que limitan los lóbulos donde se alojan las semillas (Figura 1.3.5), las cuales son de color rojo vivo escarlata o naranja como las flores, su testa es lisa y brillante. La corteza y los tallos tienen propiedades venenosas y se emplean como estupefacientes para los peces. (1)



Figura 1.3.4 Ejotes de colorín



Figura 1.3.5 Semillas de colorín



En la Tabla 1.3.1 se muestra el análisis químico proximal de la semilla y el ejote de colorín donde se observan las diferencias que hay entre sus distintos macrocomponentes.

Tabla 1.3.1 Análisis químico proximal de la semilla y ejote de colorín (g / 100 g de muestra)¹

Muestra	Humedad	Base seca				
		Proteína	Lípidos	Fibra	Cenizas	Carbohidratos ²
Semilla	9.22 ± 0.07	30.34 ± 0.88	16.40 ± 0.47	14.62 ± 0.29	5.35 ± 0.23	33.29
Ejote	85.09 ± 0.26	24.38 ± 1.01	6.11 ± 0.27	26.14 ± 1.04	6.64 ± 0.09	36.73

1. Los datos representan los promedios ± desviación estándar de triplicados, C.V. < 5%.

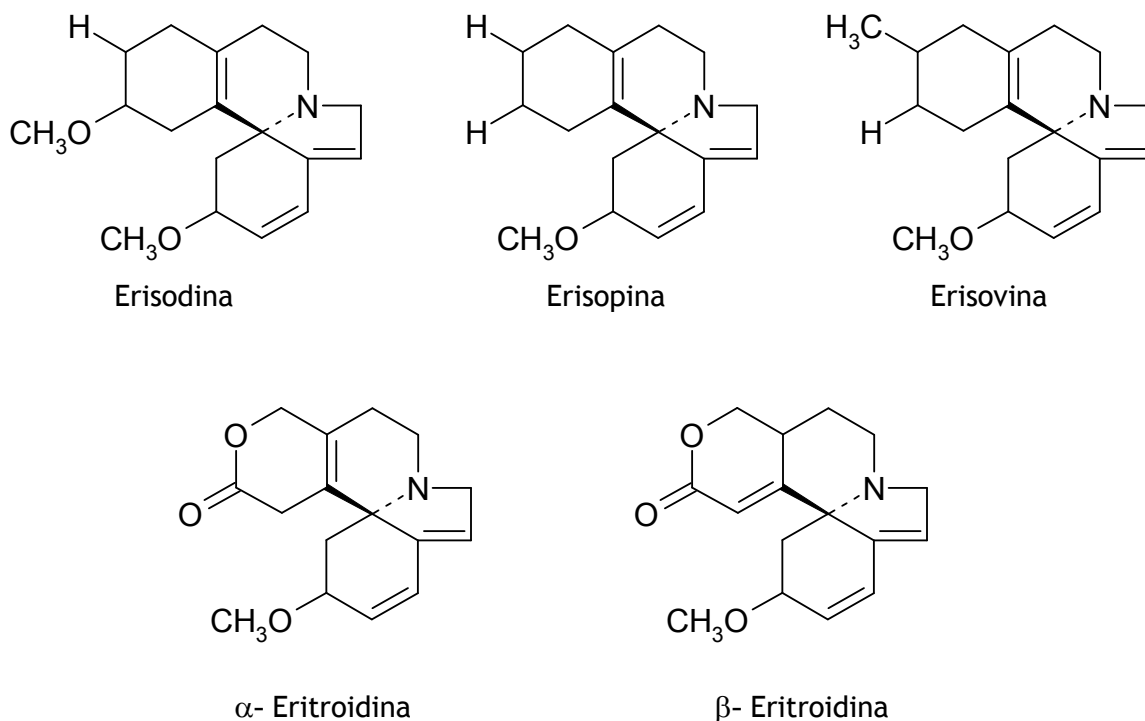
2. Los carbohidratos asimilables se calcularon por diferencia.

II. Alcaloides en *Erythrina americana*

El árbol de *Erythrina americana* ha sido una de las plantas más estudiadas debido su alto contenido de alcaloides en las semillas y a su actividad farmacológica que éstos presentan. ⁽¹⁴⁾ Sotelo y colaboradores ⁽¹²⁾ en 1993 cuantificaron los alcaloides de semillas de *Erythrina americana* por cromatografía de gases y los identificaron por espectroscopia de masas, estos investigadores reportan 0.53% de alcaloides, de los que se identificaron: erisovina, erisodina, eritrovina y α y β -eritroidina (Figura 1.3.6) siendo este último el más abundante. Jiménez ⁽¹⁷⁾ en 1994 cuantificó alcaloides en la semilla de esta planta por titulación y encontró 12.44 mg de alcaloides/g de muestra (1.2 %).



Figura 1.3. 6 Alcaloides encontrados en *Erythrina americana*



En 1996, García-Mateos y colaboradores ⁽¹³⁾ determinaron por cromatografía de gases, la concentración de alcaloides en flores, vaina inmadura de 30 días, vaina inmadura de 45 días y vaina madura, tanto a las semillas como a la vaina sola de *Erythrina americana*. Se encontró que las flores tenían 1.10% de alcaloides, entre los cuales se encontraron el N-óxido de eritristemina, α y β -eritroidina, así como un alcaloide no identificado.



En la vaina inmadura de 30 días se cuantificaron 0.39% de alcaloides, que se identificaron como N-óxidos de eritrartina y eritristemina, y α y β -eritroidina. En las semillas de la vaina inmadura de 45 días se encontraron 0.17% de alcaloides que eran, N-óxido de eritrartina y α -eritroidina; en la vaina de esta misma fase se encontró un porcentaje de alcaloides de 0.64 % y se identificaron la erisodina, erisovina, N-óxidos de eritrartina y eritristemina.

Finalmente en la fase de vaina madura, se encontró en la semilla 1.05% de alcaloides, los cuales se identificaron como erisodina, erisovina y α y β -eritroidina. Estos resultados indican que el tipo de alcaloides, varía dependiendo del estado de maduración de la leguminosa.

En el año de 1998, García - Mateos y colaboradores ⁽¹⁸⁾ reportan 1.27 g de alcaloides por cada 100 g de semilla seca y en el año de 1999 ⁽¹⁹⁾ identificaron nuevamente por cromatografía de gases; erisovina, eritroidina y α y β -eritroidina, reportando a la β -eritroidina como al alcaloide más abundante.

Finalmente en el año 2000, Garín-Aguilar y colaboradores ⁽¹⁶⁾ determinaron 0.571% de alcaloides en las semillas de *Erythrina americana*. Todos estos estudios muestran que los alcaloides que han sido encontrados son principalmente: erisodina, erisovina y α y β -eritroidina, siendo la β -eritroidina la más abundante.



La importancia del estudio de estos alcaloides radica en los efectos que provocan como: anticonvulsivos, hipotensivos e hipnóticos y anestésicos. (16)

1.4 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Todos los seres están 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 obtenidas 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 de su uso en la investigación.



Actualmente la aplicación de las técnicas de cultivo de células ha permitido entre otras utilidades, la predicción de susceptibilidad de las células a drogas, hormonas y agentes inmunológicos. (20)

El ensayo de citotoxicidad permite estudiar el efecto tóxico de una sustancia sobre un tipo determinado de células. La citotoxicidad es un evento *in vitro* complejo, que se puede expresar mediante una gran variedad de eventos, desde una muerte celular hasta complejas aberraciones metabólicas donde no puede darse una muerte celular, solo un cambio funcional. (21) El ensayo consiste en la exposición del cultivo celular al compuesto citotóxico por un periodo de tiempo determinado, la medida de la viabilidad celular y el posterior cálculo para obtener el valor de IC_{50} de dicho compuesto. El IC_{50} se define como la máxima cantidad necesaria de un compuesto para matar el 50% de la población 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. (22)



La técnica del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) descrita por Mossman en 1983, se basa en la capacidad de las células viables de reducir principalmente por deshidrogenasas mitocondriales al MTT, 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 dimetilsulfóxido (DMSO) para dar una solución colorida que puede medirse espectrofotométricamente con un lector de placas de 96 pozos. (22, 23, 24, 25)

1.5 PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

La toxicología es el estudio de la naturaleza y el mecanismo de los efectos tóxicos de agentes físicos y químicos en organismos vivos y otros sistemas biológicos. El objetivo principal de la toxicología es establecer el uso seguro de los agentes químicos. (26, 27) Esta disciplina tiene un amplio campo de aplicación como: estudios de toxicidad de sustancias químicas y procesos físicos usados en medicina, en la industria de alimentos, en agricultura y en la industria química.

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



La toxicidad es una propiedad inherente de una sustancia, la naturaleza. El grado de manifestaciones tóxicas en un organismo expuesto a la sustancia depende de diversos factores como dosis, tiempo o duración de la exposición; factores del hospedante como es la especie, raza e individuo, sexo, estado hormonal, edad, estado nutricional, enfermedades; factores ambientales como son los físicos (temperatura) y sociales (manejo de animales, alojamiento individual o en grupo, tipos de jaula); así como de los tipos de interacción con otra sustancia química. (28)

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

- Información sobre la pureza y estabilidad del producto químico que se probará
- Definir el modelo biológico, incluyendo sexo y edad de la especie a ensayar. Incluir un grupo de animales control que estará en las mismas condiciones que los animales tratados, a los cuales se les administrará el vehículo o un placebo previamente seleccionado.
- Similitud con el sistema con el que se quiere extrapolar
- La duración de la exposición y las vías de administración
- Número suficiente de animales en la prueba de toxicidad para contemplar la influencia de la variación en la susceptibilidad individual y poder obtener resultados estadísticamente confiables.



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

1. Estudios de toxicidad aguda, implican una sola administración de la sustancia química bajo el control de una prueba o varias administraciones en un periodo de 24 horas. La mayoría de estos estudios se diseñan para determinar la dosis letal media (DL_{50}) de una sustancia tóxica, que se define como la dosis del compuesto que produce la muerte en el 50 % de los animales.
2. Estudios de toxicidad a corto plazo (subagudos o subcrónicos), hay administraciones repetidas en un periodo de aproximadamente el 10% de la duración de vida del animal de prueba.
3. Estudios de toxicidad a largo plazo (crónicos), implican administraciones repetidas en un periodo de toda la vida de los animales de prueba o una fracción importante de ella. (26, 29)

1.6 TEMPEH Y MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE LA FERMENTACIÓN

El Tempeh es un alimento popular de origen Indonesio elaborado a partir de frijol de soya y por su fermentación con un hongo del género *Rhizopus*. La fermentación cambia el sabor a frijol que tiene la soya por uno suave y atractivo, el Tempeh recién preparado tiene un agradable olor y sabor a nueces, además posee una alta digestibilidad, lo cual se comprobó con prisioneros durante la Segunda Guerra Mundial en Asia, que aun cuando presentaban cuadros de disentería y edema nutricional, asimilaron perfectamente el alimento. (30)



Se ha reportado en la bibliografía la presencia de varios hongos como posibles responsables. Entre los más constantes se encuentran: *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae*. Sin embargo, Hesseltine encontró cuando menos 50 cepas, reportando que el principal era *Rhizopus oligosporus* sp. Se han utilizado con menor éxito cepas como *R. stolonifer*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. formosaensis* y *R. achlamydosporus*, pero ha logrado obtener las mismas características de *Rhizopus oligosporus*. (31)

Rhizopus oligosporus es un hongo que pertenece a la clase de los Ficomycetos y al orden de los Mucorales, se caracteriza por presentar formas irregulares de crecimiento, sus esporangióforos son cortos y producen gran número de clamidiosporas. Crece bien en xilosa, glucosa, galactosa, celobiosa, tiene dificultad para crecer en sacarosa y rafinosa que son carbohidratos que se encuentran en el frijol de soya. Es altamente lipolítico y posee varias proteasas, es pectinasa negativo y puede producir amoníaco hasta aniquilarse a sí mismo.

El procedimiento que se ha utilizado en Indonesia para producir el Tempeh se describe a continuación: Los frijoles de soya son remojados toda la noche de tal manera que las cascarillas puedan ser removidas fácilmente a mano a la mañana siguiente.



Tradicionalmente esto se hace colocando los frijoles remojados en una canasta de bambú y aplastándolos con los pies en la orilla del río a corriente de agua, de tal manera que las cascarillas que son fácilmente desprendibles floten con el agua corriente. Los frijoles limpios y descascarillados se cuecen en agua a ebullición por media hora aproximadamente, luego se extienden sobre una esterilla de bambú para que se enfríen y se escurran, una vez hecho esto se inoculan con *Rhizopus oligosporus* mezclando el frijol remojado con pequeños trozos de Tempeh de una fermentación anterior, posteriormente se envuelven en hojas de plátano y finalmente se dejan fermentar a temperatura ambiente por unos días.

Durante la fermentación hay un incremento en los sólidos solubles de un 13% hasta un 27.5%, entre ellos aumenta la cantidad de nitrógeno soluble y aminoácidos libres, lo que habla de una alta digestibilidad. En cuanto a los lípidos hay hidrólisis de los triglicéridos por enzimas lipolíticas, liberando ácidos grasos principalmente ácido linoleico.

Por otro lado, se han encontrado tres antioxidantes durante la fermentación: factor 2 (6, 7, 4' trioxiisoflavona), daidzeína, (7, 4' dioxiisoflavona) y la gasteína (5, 7, 4' trioxiisoflavona), los cuales actúan protegiendo y preservando la vitamina E, que es un factor esencial para el crecimiento del hongo. (32)



La actividad de estos antioxidantes se ve incrementada con respecto al tiempo, pero solo persistirán durante uno o dos días ya que la esporulación del hongo modifica el color del producto.

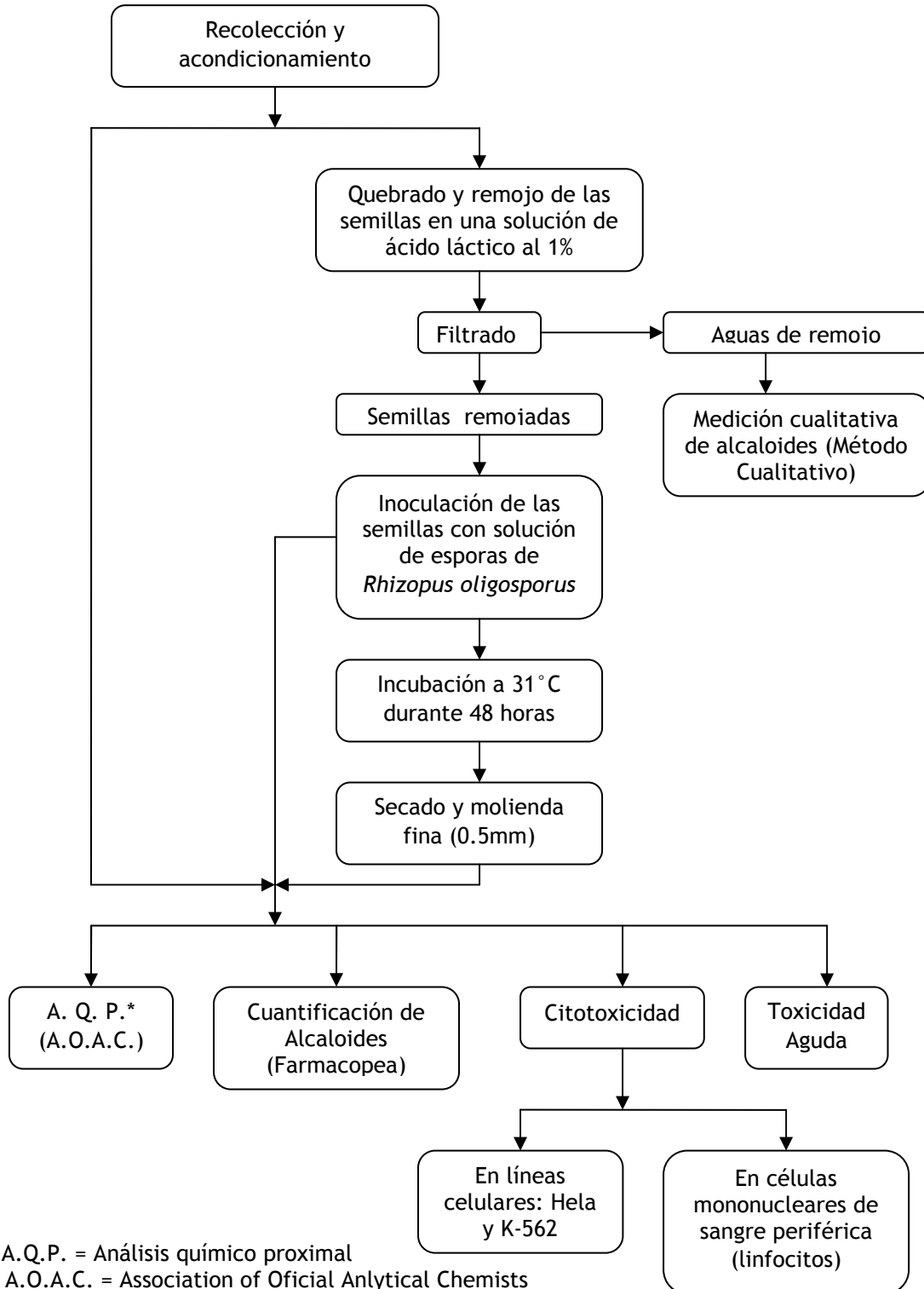
Las vitaminas: B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacina y pantotenato incrementan durante el proceso de fermentación. Los minerales sufren mínimos cambios que se pueden considerar insignificantes. El Tempeh posee la Relación de Eficiencia Proteínica (REP) mas elevada ⁽³²⁾ entre los alimentos orientales casi igual a la caseína, por su sabor suave puede combinarse fácilmente con cualquier alimento o condimento. El único inconveniente que presenta es su conservación, debido a la actividad proteolítica del hongo.



METODOLOGÍA

CAPÍTULO II

Figura 2.1 Diagrama general de trabajo



2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las semillas de *Erythrina americana* fueron recolectadas de árboles, previamente caracterizados botánicamente en el Herbario del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, localizados en el campo universitario de la UNAM en la Ciudad de México. ⁽¹³⁾

2.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

A las muestras recolectadas de *Erythrina americana* se les retiró la vaina seca y las semillas fueron sometidas a una selección y limpieza donde se elimina la materia extraña, mediante un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 10%, seguido de un secado a temperatura ambiente en el cual las semillas lavadas fueron extendidas en una franela seca.

Una vez seleccionadas las semillas limpias, se dividieron en dos lotes:

Lote 1: Las semillas para elaborar el Tempeh se quebraron.

Lote 2: Las semillas se molieron (molino Thomas-Wiley, Modelo 4) hasta pasar por una malla de 0.5 mm. El producto de la molienda se utilizó para realizar el análisis químico proximal, la cuantificación de alcaloides por el método de titulación de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos ⁽³³⁾, las pruebas de toxicidad aguda y la extracción de los alcaloides para los ensayos de citotoxicidad en células tumorales y en células mononucleares.



2.3 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS

La cepa de *Rhizopus oligosporus* fue donada por el Departamento de Biología de la Facultad de Química. La información específica de la cepa y la obtención de esporas se describen en el Anexo A.

2.4 ELABORACIÓN DEL TEMPEH DE COLORÍN

El Tempeh se desarrolló de acuerdo a la técnica descrita por Ruiz Terán F. ⁽³¹⁾

1. Las semillas de colorín se quebraron mediante una molienda gruesa
2. Posteriormente se remojaron en una solución de ácido láctico al 1% en una proporción 1:3 (v/v), durante 48 horas.
3. Después del remojo las semillas fraccionadas se filtraron con una coladera y las aguas de remojo fueron recolectadas en un recipiente para realizar pruebas cualitativas de presencia de alcaloides. Se tomó una parte de las semillas remojadas para secarlas, molerlas finamente y a esta muestra realizarle análisis químico proximal, cuantificación de alcaloides, toxicidad aguda y extracción de alcaloides para pruebas de citotoxicidad.
4. La otra parte de las semillas remojadas se colocaron en un recipiente de plástico y se inocularon con una solución de esporas de *Rhizopus oligosporus*, en donde por cada 200 g de semillas se agregó 5 mL de la suspensión de esporas que contenía cerca 100 esporas/mL, las semillas se mezclaron y homogenizaron perfectamente.
5. La mezcla se colocó en bolsas de plástico de 200 g de capacidad las cuales habían sido previamente perforadas (Orificios de 0.5 cm de diámetro).



6. Las bolsas se colocaron en una incubadora M Blue (Dry Type Bacteriological Incubator) para llevar a cabo la fermentación a una temperatura de 37° C durante 48 horas.
7. El producto obtenido se secó en una estufa a 60° C y posteriormente se molió finamente en un molino (Thomas-Wiley Modelo 4), hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm. Con esta muestra se realizaron las mismas pruebas ya mencionadas en el punto 3.

2.5 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

El análisis químico proximal se realizó de acuerdo a las técnicas descritas en el AOAC ⁽²⁸⁾, las determinaciones fueron: humedad (925.09B), cenizas (923.03), proteína cruda (955.04), grasa cruda (920.39C) y fibra cruda (962.09E), las cuales se realizaron por triplicado.

Por último los carbohidratos digeribles fueron calculados por diferencia:

$$\% \text{ Carbohidratos digeribles} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ fibra cruda})$$



2.6 CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

1. Determinación semi-cuantitativa de Alcaloides

Mediante esta prueba se determinaron cualitativamente la presencia de alcaloides en las aguas de remojo que fueron previamente concentradas. La determinación se realizó usando los siguientes reactivos:

1. Reactivo de MAYER (cloruro de mercurio y yoduro de potasio)
2. Reactivo de WAGNER (triyoduro de potasio)
3. Reactivo DRAGENDORFF (nitrato de bismuto y yoduro de potasio)
4. Reactivo de SONNENSCHNEIDER (ácido fosfomolibdénico)
5. Reactivo de HAGER (ácido pícrico)
6. Reactivo de SCHEIBLER (ácidos fosfotungstícico)
7. Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTÉNICO

La determinación semicuantitativa de alcaloides esta basada en la comparación de la cantidad de precipitado obtenido con los 7 diferentes reactivos de alcaloides, con respecto a los precipitados obtenidos de un alcaloide testigo de concentración conocida.

Debido a la frecuencia de reacciones falsas-positivas con los reactivos comunes de alcaloides, solo se considera como positiva la presencia de ellos cuando dan reacción positiva los siete reactivos mencionados anteriormente. La preparación de los reactivos y el procedimiento se describe en el Anexo B.



II. Determinación cuantitativa de alcaloides y obtención de los extractos de alcaloides

Para la cuantificación de alcaloides se siguió la técnica de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del 2000, modificada por Moreno, 2001. ⁽³⁴⁾ Se cuantificaron los alcaloides por triplicado en la semilla, en la semilla quebrada y remojada y en el Tempeh de colorín.

Este método se basa en la extracción de los alcaloides, aprovechando sus propiedades de solubilidad en un disolvente orgánico como lo es el metanol alcalinizado, para asegurar que todos los alcaloides presentes estén en forma de bases libres y ser soluble en este disolvente.

En la mayoría de las plantas o semillas los alcaloides se encuentran en forma de sales o combinaciones solubles, además de tener propiedades de un álcali, poseen distinta solubilidad en disolventes orgánicos en función del pH. ⁽¹²⁾

La cuantificación de los alcaloides totales extraídos se realiza mediante una valoración, con H_2SO_4 debido a las propiedades básicas de los alcaloides. La preparación de los reactivos y el procedimiento se describen en el Anexo C.



2.7 CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE ALCALOIDES DE COLORIN EN LINEAS CELULARES Y CÉLULAS MONONUCLEARES

Esta parte del proyecto se desarrolló en el laboratorio 202 del Departamento de Biología Molecular, Facultad de Química UNAM.

Las líneas celulares humanas que se emplearon fueron:

- Hela: línea proveniente de adenocarcinoma de cervix.
- K-562: línea proveniente de eritroleucemia humana.

Las células humanas normales fueron:

- CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

Las líneas celulares Hela y K-562 fueron donadas por la Dra. Angelina Quintero. Las Células Mononucleares de Sangre Periférica CMSP (linfocitos), se obtuvieron por venopunción de donadores adultos sanos en condiciones de ayuno con sistema vacutainer.

La descongelación, la propagación y la criopreservación de las líneas celulares se realizaron como se indica en el Anexo D. La preparación de los reactivos y medios de cultivo necesarios para realizar los ensayos de citotoxicidad se encuentran descritos en los Anexos E y F.

Todas las células se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera del 95% de humedad relativa en una incubadora (Fisher Scientific Model 3110). Los cultivos celulares se ocuparon con una superficie



(confluencia) entre el 80 y 90% del área de cultivo al iniciar los ensayos de citotoxicidad.

Los extractos de alcaloides de semilla, semilla remojada y Tempeh de colorín, se obtuvieron mediante la técnica de la Farmacopea del 2000 modificada por Moreno en el año 2001, la cual se describe en el Anexo G.

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 (Veco México), con excepción del conteo celular. El material que se empleó fue limpio y estéril.

2.7.1 Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares Hela y K-562

1. Cultivo de las líneas celulares Hela y K-562 en placas de 96 pozos

A partir de un cultivo previamente establecido de las líneas celulares se llevaron acabo los siguientes pasos:

a. Cultivo de las líneas celulares.

1. Se estabilizó a temperatura ambiente el medio de cultivo DMEM (Medio mínimo esencial modificado por Dulbeccos) y el PBS-EDTA (amortiguador salino de fosfatos con EDTA).
2. Se decantó el medio de cultivo contenido en las cajas Petri de 10 cm de diámetro (Corning) que contenían las líneas celulares.
3. Se realizó un lavado con 3 mL de PBS-EDTA y se decantó.



4. Para cubrir la monocapa celular se agregó de 1 a 2 mL de PBS - EDTA y se incubó 5 minutos.
5. Con ayuda de la micropipeta se resuspendió el PBS-EDTA para desprender las células adheridas. Se disgregaron hasta obtener una suspensión homogénea y células individuales.

b. Conteo celular en la cámara de Newbauer.

1. Se limpió la cámara de Newbauer con etanol al 70%, se secó y se colocó en posición horizontal.
2. Se realizó una dilución 1:5 de cada cultivo celular y se homogenizaron suavemente. Se tomó una alícuota de la suspensión celular y se llenó la cámara por capilaridad.
3. Se colocó la cámara sobre el microscopio invertido (Olympus Modelo CE-0849) y se contaron las células localizadas en los ocho cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos.
4. Se calculó el contenido de células realizando el promedio de los ocho cuadrantes y se aplicó la siguiente fórmula.

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

S: número de células presentes en 1mL de suspensión.

P: promedio de número de células encontradas en los 8 cuadrantes de la cámara.

Al obtener el número de células por mililitro se pudo calcular el volumen de suspensión adecuado para agregar a cada pozo un número de células aproximado a los 7000 para realizar el ensayo de citotoxicidad.



c. Cultivo celular en las placas de 96 pozos.

1. Se agregaron de 30 a 50 μL de la suspensión celular para tener aproximadamente 7000 células en cada pozo en una placa de cultivo de 96 pozos.
2. Se agregó medio de cultivo DMEM necesario para completar 200 μL a cada pozo. Las placas se incubaron por 24 horas.

II. Preparación de las diluciones de los extractos de alcaloides, su distribución y exposición

A partir de cada extracto se realizaron las siguientes diluciones: 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, considerando que se agregaron 50 μL de cada stock (dilución) a cada pozo, por sextuplicado y se llevó a un volumen final de 250 μL en el pozo con medio D-MEM. Ver Tablas 2.1, 2.2, 2.3.

Tabla 2.1 Preparación de diluciones de alcaloides de semilla

Dilución	Volumen del extracto (μL)	Medio D-MEM (μL)	Concentración en el pozo (mg B-eritroidina/mL)
1:10	25	25	1.0532
1:20	12.5	37.5	0.5266
1:30	8.33	41.67	0.3509
1:40	6.25	43.75	0.2630
1:50	5	45	0.2106
1:60	4.16	45.84	0.1751

Tabla 2.2 Preparación de diluciones de alcaloides de semilla remojada

Dilución	Volumen del extracto (μL)	Medio D-MEM (μL)	Concentración en el pozo (mg B-eritroidina/mL)
1:10	25	25	0.4793
1:20	12.5	37.5	0.2396
1:30	8.33	41.67	0.1596
1:40	6.25	43.75	0.1198
1:50	5	45	0.0959
1:60	4.16	45.84	0.0797



Tabla 2.3 Preparación de diluciones de alcaloides de Tempeh de colorín

Dilución	Volumen del extracto (µL)	Medio D-MEM (µL)	Concentración en el pozo (mg β-eritroidina/mL)
1:10	25	25	0.4315
1:20	12.5	37.5	0.2157
1:30	8.33	41.67	0.1437
1:40	6.25	43.75	0.1078
1:50	5	45	0.0863
1:60	4.16	45.84	0.0717

1. Se prepararon 700 µL de cada dilución, lo necesario para 14 pozos. Cada una de las diluciones se realizó por sextuplicado en ambas líneas celulares: Hela y K-562, agregando 50 µL a cada pozo.
2. Se realizó un control disolvente de agua acidulada a pH 4 considerando el volumen utilizado en la dilución 1:10 (25 µL:25 µL) y también un control testigo al cual solo se le agregó medio D-MEM al cultivo celular.
3. La distribución de las diferentes diluciones y controles se observan en la Figura 2.2. Finalmente las placas se incubaron durante 48 hrs.

Figura 2.2 Distribución de los extractos de alcaloides en cultivo de las líneas celulares Hela y K-562

Hela						K-562					
1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60
X	X	X	X	X	X	O	O	O	O	O	O
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-



Donde:

Control disolvente Hela

Control testigo Hela

Control disolvente K-562

Control testigo K-562

III. Medición de la viabilidad de las células por medio de la técnica del MTT

1. Después de haber transcurrido el tiempo de exposición de los extractos de alcaloides en las células, se adicionaron 20 μ L del reactivo de MTT en una concentración de 2.5 mg/mL a cada pozo de la placa de cultivo.
2. Se incubaron las células en contacto con la solución de MTT por un tiempo mínimo de 4 horas.
3. Una vez terminado el tiempo de incubación se removió el medio con MTT decantándolo de la placa.
4. Los cristales de formazan sedimentados en el fondo de la caja se resuspendieron con 250 μ L de Dimetilsulfoxido (DMSO).
5. El MTT reducido por las células viables se midió a una longitud de onda de 550 nm en un lector de placas de 96 pozos y de esta forma se determinó indirectamente la viabilidad celular.



IV. Obtención del porcentaje de inhibición de la proliferación celular y el IC_{50}

Los valores de absorbancia obtenidos de los controles y de los tratamientos a las diferentes concentraciones se promediaron y se calculó el porcentaje de inhibición celular utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{inhibición} = 100 \times ((1) - (X \text{ abs problema} / X \text{ abs control}))$$

Donde:

X abs problema: promedio de las absorbancias del tratamiento

X abs control: promedio de las absorbancias del control

Para calcular el valor IC_{50} para cada uno de los extractos en las células empleadas se procedió a graficar el porcentaje de inhibición de proliferación celular en función de la concentración de alcaloides en una hoja de cálculo Origin 5.0. A partir de una regresión no lineal y utilizando la ecuación de Boltzman, en la misma hoja de cálculo se interpoló el valor de concentración de alcaloides en donde se obtiene el 50% de inhibición celular. En el Anexo H se muestra un ejemplo de cálculo.



2.7.2 Ensayos de citotoxicidad en Células Mononucleares de Sangre Periférica CMSP (linfocitos)

I. Cultivo de las CMSP en placas de 96 pozos

a. Obtención y aislamiento de CMSP

1. 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 (Becton Dickinson Vacutainers No. 366352).
2. Se transfirió la sangre a un tubo cónico de 50 mL y se agregó la misma cantidad de Solución de PBS (Amortiguador salino de fosfatos). Se mezcló suavemente.
3. En tubos cónicos de 15 mL se agregaron 3 mL de Histopaque-1077 y posteriormente se adicionó por goteo sobre las paredes del tubo alrededor de 6 mL de la mezcla anterior.
4. Se centrifugó a 1200 FCR (fuerza centrífuga relativa) durante 40 minutos en una centrífuga (Heraeus Modelo 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 interesa es la fase intermedia entre estas dos, que es un anillo blanco que contiene a los linfocitos.
5. Con una pipeta Pasteur se succionó el anillo de cada tubo y se transfirió a un solo tubo cónico de centrifuga.



6. Se le adicionó 5 mL de PBS y se centrifugó a 1000 FCR durante 10 minutos.
7. Posteriormente se retiró el sobrenadante con Pipeta Pasteur.
8. El botón de linfocitos se resuspendió suavemente con 5 mL de PBS y se centrifugó nuevamente a 1000 FCR durante 10 minutos.
9. Se retiró el sobrenadante con Pipeta Pasteur, y el botón celular se resuspendió suavemente con 5 mL de PBS y se centrifugó a 1000 FCR durante 5 minutos.
10. Se retiró el sobrenadante con Pipeta Pasteur.
11. Se resuspendió el botón celular con 10 mL de medio de cultivo RPMI (Gibco - Invitrogen) con 10% de SFB.

b. Conteo celular en la cámara de Newbauer.

El conteo celular se realizó en la cámara de Newbauer de la misma forma como se describe en el punto 2.7.1, II, b

c. Cultivo celular en las placas de 96 pozos.

Se agregaron 100 μ L de la suspensión celular a cada pozo para tener un número aproximado de 3×10^5 en una placa de cultivo de 96 pozos.

II. Preparación de las diluciones de los extractos de alcaloides, su distribución y exposición

1. A partir de cada extracto se realizó la siguiente dilución seriada: 1:5, 1:25, 1:50, 1:150, 1:300, se agregaron 10 μ L de PHA (0.4 mg/mL) a cada una de las diluciones y finalmente se llevó a un volumen final de



100 µL con medio RPMI. Las concentraciones finales de β-eritroidina en el pozo se muestran a continuación en la Tabla 2.4

Dilución	Concentración (mg β-eritroidina/mL)		
	Semilla	Semilla remojada	Tempeh
1:5	4.057	3.0467	2.7825
1:25	0.8115	0.6093	0.5565
1:50	0.4057	0.3046	0.2782
1:150	0.1352	0.1015	0.0927
1:300	0.0676	0.0507	0.0463

- Se preparó el volumen necesario de cada dilución y de cada extracto para realizar un triplicado de cada dilución, agregando 100 µL a cada pozo.
- Se realizaron dos controles: uno de agua acidulada considerando el volumen utilizado en la dilución 1:10 y un control testigo al cual sólo se le agregó medio RPMI al cultivo celular.
- La distribución de los extractos de alcaloides de las muestras: semilla, semilla remojada y Tempeh en CMSP se muestran a continuación en la Figura 2. 3.

Figura 2.3 Distribución de los extractos de alcaloides en el cultivo de CMSP

1:5	1:25	1:50	1:150	1:300	1:5	1:25	1:50	1:150	1:300		
+	+	+	+	+	o	o	o	o	o		
+	+	+	+	+	o	o	o	o	o		
+	+	+	+	+	o	o	o	o	o		
-	-	-	-	-							
-	-	-	-	-							
-	-	-	-	-							
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<



Donde:

+ Semilla

0 Semilla remojada

- Tempeh

x Control disolvente

< Control testigo CMSP

Pozos vacíos

III. Medición de la viabilidad de las células por medio de la técnica del MTT

Una vez terminado el tiempo de incubación se midió la viabilidad por técnica del MTT descrita en el punto 2.7.1, III, con la única diferencia de que los cristales de formazan se resuspendieron con 100 μ L de DMSO.

IV. Obtención del porcentaje de inhibición de la proliferación celular y el IC_{50}

Para obtener el porcentaje de inhibición de la proliferación celular y de IC_{50} , los datos de absorbancia se manejaron de igual forma como se describe en el punto 2.7.1, IV.



2.8 ENSAYOS DE TOCIDAD AGUDA

Las dosis que se trabajaron para el estudio de toxicidad aguda fueron 3000, 6000, 9000, 12000 y 15000 mg/Kg. de peso corporal para cada una de las tres muestras; semilla, semilla remojada y Tempeh. Se trabajó con 6 lotes de cinco ratones cada uno, para cada muestra se manejó un grupo testigo, al cual se le administró únicamente el vehículo: solución salina isotónica.

Procedimiento:

1. Distribución de los animales. Se trabajó con ratones macho cepa ICR con un peso entre 20 - 25 g, los cuales se dejaron en ayuno de 12 horas, (con agua *ad libitum*). El marcaje de los animales se realizó en la cola con marcadores indelebles (negro, azul y rojo), de acuerdo al siguiente código de colores: Negro: uno, Azul: cinco, Rojo: diez.

Una vez marcados los animales se pesaron y se registraron sus pesos iniciales. Posteriormente se repartieron en los 6 diferentes lotes de acuerdo a la distribución de “culebra japonesa” (Anexo I), con un total de 5 ratones por lote (jaula).

2. Administración. La vía de administración que se empleó para el estudio de toxicidad aguda fue la oral. Para la dosificación se consideró que el máximo volumen para administrar ratones es de 1 mL, por lo que se definió una dosificación de 3D como 0.03 mL/g de peso corporal. Para calcular la concentración de la solución de las muestras se consideró la siguiente fórmula:



$$\text{Concentración (mg muestra/mL)} = \frac{\text{Dosis (mg muestra/g peso corporal)}}{0.03 \text{ mL/g peso corporal}}$$

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

$$\text{Volumen a administrar} = \text{Peso del animal (g)} \times 0.03 \text{ mL/g peso corporal}$$

3.Observaciones. Una vez administrado el agente tóxico, se restituyó el alimento y se dejó a los animales en observación durante las siguientes 48 horas con periodos de observación de 12 horas con el fin de verificar el efecto de los alcaloides de *Erythrina americana* en los ratones. Las características clínicas que se consideraron fueron: lordosis, cifosis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, disnea, hipoxia, etc. Las definiciones pueden consultarse en el Anexo J.

Durante todo el periodo de observación se anotó el porcentaje de mortalidad observado de cada lote.

4. Evaluación de los datos. La dosis letal media se calculó de acuerdo al método estadístico de Litchfield y Wilcoxon ⁽³⁵⁾ utilizando papel logarítmico-probabilidad. En el cual las dosis se colocaron en la escala logarítmica y el porcentaje de mortalidad en la escala probits, se realizó una prueba de CHI^2 para verificar la homogeneidad de los datos y una vez obtenidos los datos homogéneos se interpola al 50% de mortalidad.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III

3.1 PROCESO DE ELABORACIÓN DE TEMPEH DE COLORÍN

Durante el remojo de las semillas en solución de ácido láctico, el pH disminuyó y se incrementó la actividad acuosa, propiciando un medio adecuado para el crecimiento de *Rhizopus oligosporus*. A continuación en las siguientes figuras se muestra el proceso de la elaboración del Tempeh.

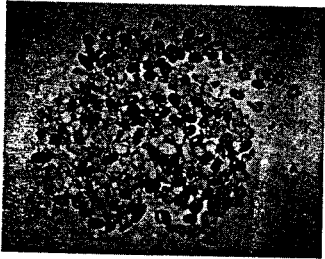


Figura 3.1.1 Semillas quebradas antes del remojo

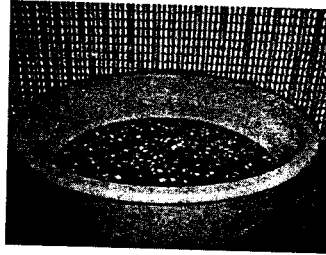


Figura 3.1.2 Semillas en remojo en solución de ácido láctico al 1%



Figura 3.1.3 Inicio de fermentación de semillas de colorín



Figura 3.1.4. Tempeh a las 48 horas de fermentación



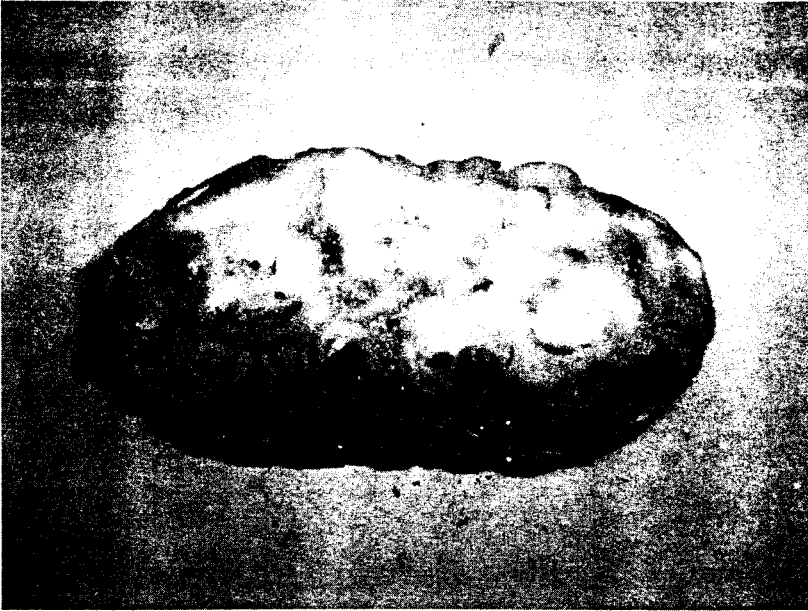


Figura 3.1.5. Tempeh de colorin

3.2 ANALISIS QUÍMICO PROXIMAL

En la Tabla 3.2.1 se muestran los resultados obtenidos del análisis químico proximal de las harinas de: semilla, semilla remojada y Tempeh. Donde se observa que en la harina de semilla remojada hay un incremento en el contenido de lípidos y fibra cruda, debido a que durante el remojo se perdieron los carbohidratos solubles y por ende el resto de los macrocomponentes se concentraron.



En la harina de Tempeh hubo un mayor incremento de las proteínas debido a la gran biomasa de *Rhizopus oligosporus* que se generó durante la fermentación. Los carbohidratos y la fibra se disminuyeron, debido a que fueron la fuente de carbono que el hongo empleó para su crecimiento, degradando los carbohidratos simples y parte de los carbohidratos complejos.



Tabla 3.2.1 Análisis químico proximal de las muestras de *Erythrina americana* (g / 100 g muestra)¹

Muestras	Humedad	Proteína	Grasa	Fibra		Cenizas	Carbohidratos ²
				Base	seca		
Harina de semilla	5.3 ± 0.12 ^a	28.8 ± 0.08 ^c	18.9 ± 0.34 ^c	16.6 ± 0.15 ^b	3.8 ± 0.13 ^a		32.3
Harina de semilla remojada*	2.9 ± 0.06 ^c	30.4 ± 0.59 ^b	21.2 ± 0.17 ^b	21.7 ± 0.57 ^a	3.0 ± 0.03 ^b		23.7
Harina de Tempeh**	3.6 ± 0.08 ^b	36.7 ± 0.43 ^a	28.2 ± 0.12 ^a	13.6 ± 0.30 ^c	3.9 ± 0.01 ^a		17.6

1. Los datos representan los promedios ± desviación estándar de triplicados, C.V. < 5%. Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con $\alpha = 0.05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (por columna).

2. Los carbohidratos asimilables se calcularon por diferencia.

* Después del remojo de las semillas, éstas se secaron y se molieron para realizar el análisis químico proximal.

** Después de la fermentación de las semillas con *Rhizopus oligosporus* éstas se secaron y se molieron para realizar el análisis químico proximal.



3.3 CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

La técnica de la Farmacopea modificada por Moreno en el año 2001, permitió cuantificar los alcaloides totales en las tres harinas: semilla, semilla remojada y Tempeh.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3.3.1, en la cual se observa que la cantidad de alcaloides es menor que la reportada en otros trabajos donde se obtienen concentraciones de hasta 1% (34), esto se debe a que fueron determinados por métodos cromatográficos.

Tabla 3.3.1 Resultados de la determinación de alcaloides totales en muestras de *Erythrina americana* (g β -eritroidina/100g de harina)*

Muestra	Base Húmeda**	Base Seca**
Semilla	0.396 ± 0.012 ^a	0.418 ± 0.012 ^a
Semilla remojada	0.290 ± 0.106 ^b	0.190 ± 0.005 ^b
Tempeh	0.165 ± 0.006 ^b	0.172 ± 0.006 ^b

* Los datos representan los promedios ± desviación estándar de triplicados, C.V. < 10%

** Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con $\alpha = 0.05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (por columnas).

Los resultados anteriores muestran que durante el remojo se pierden hasta un 50% de los alcaloides, debido a que al estar en forma de sales, dichos compuestos se pueden solubilizar en la solución de ácido láctico. Durante la fermentación con *Rhizopus oligusporus* no hubo disminución en la concentración de los alcaloides, ya que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de alcaloides de semilla remojada y Tempeh.



Por otro lado se realizaron pruebas cualitativas de alcaloides en las aguas de remojo para comprobar que se eliminaron éstos compuestos durante el remojo, dando positivo las siete pruebas realizadas. Los resultados se resumen en la Tabla 3.3.2.

Tabla 3.3.2 Resultados de las pruebas cualitativas de alcaloides en agua de remojo

Reactivo de Mayer	Positivo
Reactivo de Wagner	Positivo
Reactivo de Dragendorff	Positivo
Reactivo de Sonnenschein	Positivo
Reactivo de Hager	Positivo
Reactivo de Scheibler	Positivo
Ácido silicotugsténico	Positivo

Hasta este punto se comprobó que el remojo fue uno de los pasos más importantes en el proceso de destoxificación de las semillas de colorín, ya que se disminuyó la concentración de alcaloides hasta en un 50%, aún falta evaluar la toxicidad de los alcaloides residuales, razón por la que se realizaron las pruebas de citotoxicidad con líneas celulares humanas y con linfocitos.

3.4 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

A través de estas pruebas se comprobó la toxicidad de los alcaloides en un sistema *in vitro*, los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de proliferación celular de cada uno de los extractos probados en las líneas celulares (Hela y K-562), se muestran a continuación en las Tablas 3.4.1, 3.4.2.



Tabla 3.4.1 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos de alcaloides de colorín en líneas celulares Hela *

Semilla		Semilla remojada		Tempeh	
Concentración (mg β -eritroidina/mL)	Inhibición (%)	Concentración (mg β -eritroidina/mL)	Inhibición (%)	Concentración (mg β -eritroidina/mL)	Inhibición (%)
0.1751	5.34	0.0797	5.69	0.0717	1.55
0.2106	15.42	0.0959	7.74	0.0863	5.09
0.2630	48.43	0.1198	14.15	0.1078	8.99
0.3509	55.79	0.1596	20.38	0.1437	11.98
0.5266	66.67	0.2396	49.17	0.2157	28.58
1.0532	78.94	0.4793	70.08	0.4315	61.14

* Las pruebas se realizaron por triplicado y los datos representan el promedio de la inhibición de la proliferación celular

Tabla 3.4.2 Porcentaje de inhibición de la proliferación celular de los extractos de alcaloides de colorín en líneas celulares K-562*

Semilla		Semilla remojada		Tempeh	
Concentración (mg β -eritroidina/mL)	Inhibición (%)	Concentración (mg β -eritroidina/mL)	Inhibición (%)	Concentración (mg β -eritroidina/mL)	Inhibición (%)
0.1751	14.77	0.0797	4.62	0.0717	3.63
0.2106	23.79	0.0959	10.10	0.0863	8.09
0.2630	31.30	0.1198	24.34	0.1078	11.46
0.3509	43.64	0.1596	37.60	0.1437	28.30
0.5266	59.36	0.2396	52.16	0.2157	41.38
1.0532	73.71	0.4793	63.24	0.4315	61.19

* Las pruebas se realizaron por triplicado y los datos representan el promedio de la inhibición de la proliferación celular

En las tablas anteriores se observa que hay una relación directamente proporcional entre la concentración y el % de inhibición de la proliferación celular, es decir, a mayor concentración del alcaloide hay una mayor inhibición de la proliferación celular.



Este tipo de comportamiento se observa en los tres extractos sin embargo, en la semilla se ve más marcado este efecto, seguida de semilla remojada y finalmente Tempeh, esto muestra que los alcaloides que no se eliminaron en el remojo aun son tóxicos ya que lograron inhibir la proliferación celular de Hela y K-562.

Una vez obtenidos estos porcentajes de inhibición se calculó el valor de IC_{50} , el cual se define como la máxima cantidad de un compuesto necesario para matar al 50% de la población celular. Los cálculos se realizaron en el programa estadístico Origin 5.0 y los resultados se reportan en la Tabla 3.4.3.

Tabla 3.4.3 Valores de IC_{50} de los extractos de alcaloides de colorín en líneas celulares *

Muestras	IC_{50} (mg B-eritroidina/mL)	
	IC_{50} Hela**	IC_{50} K-562**
Semilla	0.205 ± 0.0131^b	0.243 ± 0.019^a
Semilla remojada	0.264 ± 0.0128^a	0.260 ± 0.050^a
Tempeh	0.306 ± 0.0381^a	0.264 ± 0.012^a

* Los datos representan los promedios \pm desviación estándar de triplicados, C.V. < 10%

** Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con $\alpha = 0.05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiple

En la Tabla 3.4.3 se muestra que en ambas células, los extractos de alcaloides de semilla fueron más tóxicos que los de semilla remojada y Tempeh, ya que se requiere de una menor cantidad de estos compuestos para alcanzar la IC_{50} .



En el caso específico de Hela se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores de IC_{50} de semilla remojada y el Tempeh, con lo que se comprueba que durante la fermentación no hubo ningún cambio en cuanto a la composición y concentración de los alcaloides que quedaron después del remojo.

Los resultados obtenidos de IC_{50} en K-562 dejan ver una tendencia donde los alcaloides de semilla son más tóxicos que los de semilla remojada y Tempeh aunque no muestran diferencia significativa. Por lo que, tanto en las líneas celulares Hela y K-562 se observa un proceso de destoxificación de semilla a semilla remojada y de ésta a Tempeh.

Con el fin de observar el efecto gradual del porcentaje de inhibición de la proliferación celular de los extractos de alcaloides probados, a continuación se presentan en las Figuras 3.4.5 y 3.4.6 las fotos del desarrollo del experimento.

En las siguientes Figuras 3.4.3 y 3.4.4 se observan las fotos de las líneas celulares Hela y K-562. Ambas fotografías fueron tomadas sin haber realizado ningún tratamiento a las células (testigos).



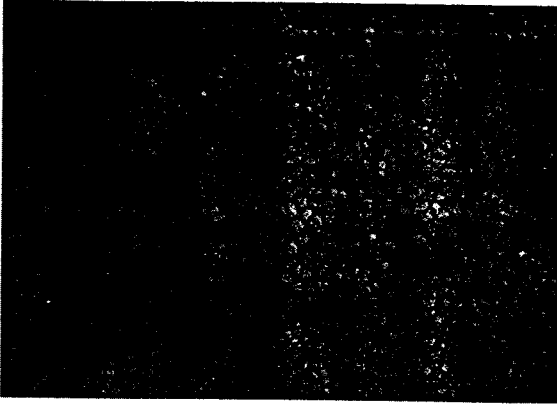


Figura 3.4.3 Observación al microscopio de las células HeLa sin tratamiento Objetivo 20x

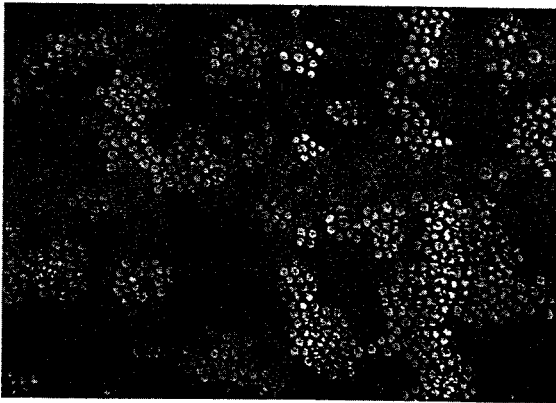


Figura 3.4.4 Observación al microscopio de las células K-562 sin tratamiento Objetivo 20x



Figura 3.4.5 Efecto gradual en el número e integridad de las células Hela expuestas a diferentes concentraciones de alcaloides de colorín, expresados como mg β -eritroidina/mL. Objetivo 20x. La observación corresponde a uno de los tres experimentos independientes.

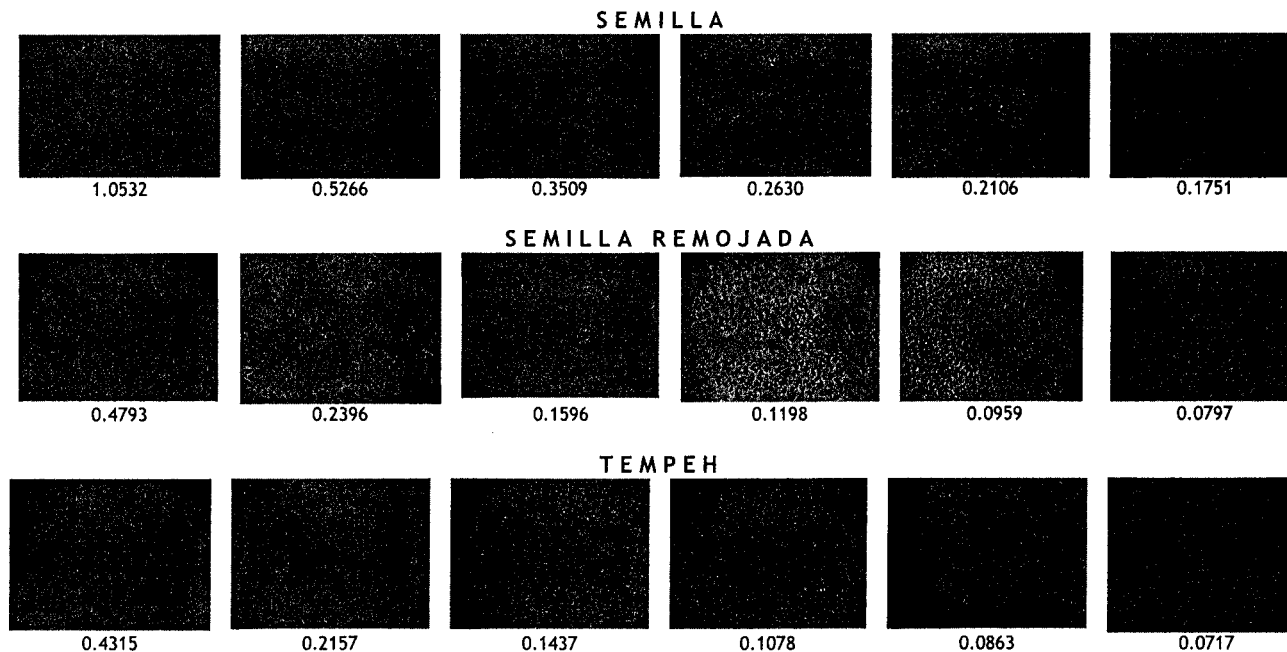
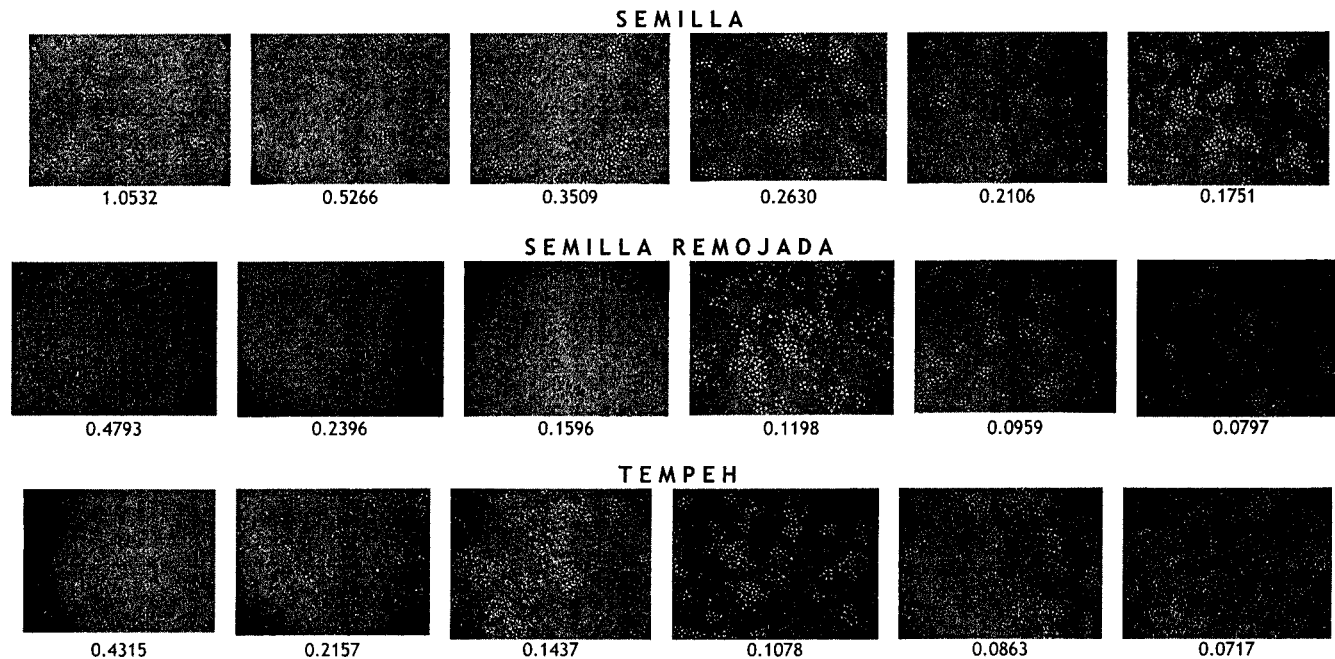


Figura 3.4.6 Efecto gradual de la proliferación de células K-562 expuestas a diferentes concentraciones de alcaloides de colorín, expresados como mg β -eritroidina/mL. Objetivo 20x. La observación corresponde a uno de los tres experimentos independientes.



Para continuar con el análisis de citotoxicidad de los diferentes extractos de alcaloides se emplearon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con el propósito de complementar los resultados obtenidos con las líneas celulares humanas.

En la Tabla 3.4.4 se muestran los resultados del ensayo de citotoxicidad realizado en CMSP, los cuales corroboran los obtenidos con Hela y K-562.

Tabla 3.4.4 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos de alcaloides de colorín en CMSP (linfocitos) *

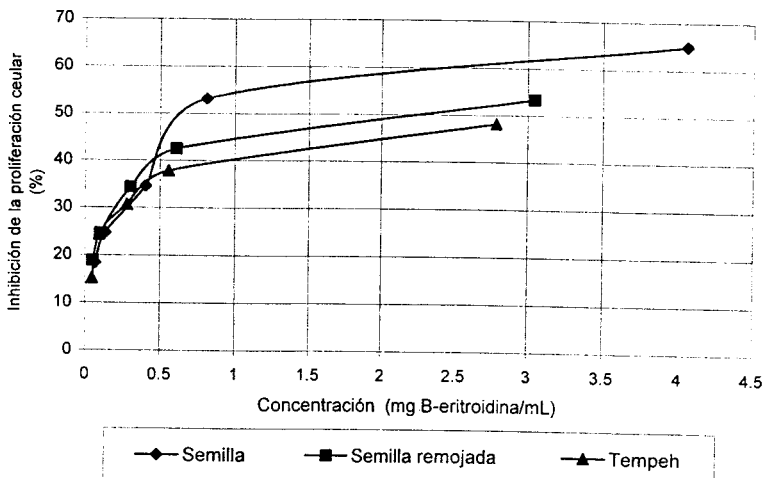
Semilla		Semilla remojada		Tempeh	
Concentración (mg β-eritroidina/mL)	Inhibición (%)	Concentración (mg β-eritroidina/mL)	Inhibición (%)	Concentración (mg β-eritroidina/mL)	Inhibición (%)
0.0676	18.39	0.0507	18.86	0.0463	15.2
0.1352	24.82	0.1015	24.6	0.0927	24.37
0.4057	34.6	0.3046	34.35	0.2782	30.71
0.8115	53.2	0.6093	42.47	0.5565	37.81
4.057	64.96	3.0467	53.39	2.7825	48.22

* Las pruebas se realizaron por triplicado y los datos representan el promedio de la inhibición de la proliferación celular

En la siguiente Figura 3.4.7 se observa claramente la relación proporcional que existe entre la concentración y el porcentaje de inhibición celular, siendo más marcada en los extractos de alcaloides de semilla, seguida por semilla remojada y finalmente Tempeh.



Figura 3.4.7 Curvas de citotoxicidad de los diferentes extractos de alcaloides de colorín en CMSP (linfocitos)



Con la gráfica anterior se comprueba la tendencia similar de los resultados obtenidos en Hela, corroborando que los extractos de alcaloides de Tempeh son menos tóxicos que semilla remojada y estos menos que semilla, además de que se observa un comportamiento asintótico en las concentraciones mas altas, con lo que se puede decir que el porcentaje de inhibición será el mismo aún cuando la concentración siga aumentando.



Con los datos anteriores se calculó el valor de IC₅₀ mediante el programa estadístico Origin 5.0. Los cálculos se realizaron para los tres extractos de alcaloides probados en linfocitos, los resultados se resumen en la Tabla 3.4.5.

Tabla 3.4.5 Valores del % de inhibición de los extractos de alcaloides de colorín en CMSP (linfocitos) *

Muestras	mg β-eritroidina/mL**	% Inibición de la proliferación celular **
Semilla	1.268 ± 0.167 ^a	50 ^a
Semilla remojada	3.009 ± 0.018 ^b	41.14 ^b
Tempeh	2.737 ± 0.001 ^c	28.10 ^c

* Los datos representan los promedios ± desviación estándar de triplicados, C.V. < 10%

** Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con α = 0.05 de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (por columnas).

Los resultados de IC₅₀ obtenidos en linfocitos son mucho mayores que los obtenidos en Hela y K-562 debido a las diferencias que existen en su metabolismo, además de que los linfocitos son más resistentes a los compuestos citotóxicos ya que son los responsables de las respuestas inmunitarias en las células sin embargo, la tendencia se mantuvo por lo que se puede asegurar que el extracto de alcaloides de semilla fue mucho más tóxico que los extractos de semilla remojada y de Tempeh.

En la Figura 3.4.9 se observa el efecto gradual de los alcaloides en diferentes concentraciones sobre los linfocitos, donde se observa que los linfocitos en proliferación se mantienen en forma aglutinada en pequeños racimos de células,



lo cual se comprobó al mostrar una mayor viabilidad por la técnica del MTT. Los linfocitos dispersos y homogenizados se consideraron muertos debido a que no hubo una reducción del reactivo de MTT.

A continuación se muestra en la Figura 3.4.8 un testigo del cultivo celular de linfocitos, sin realizar ningún tratamiento.

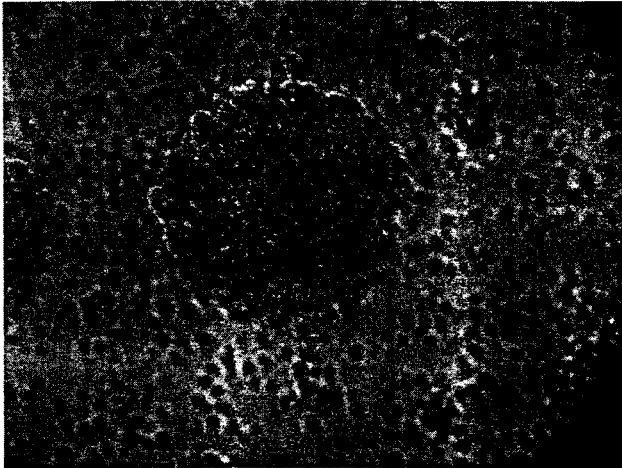
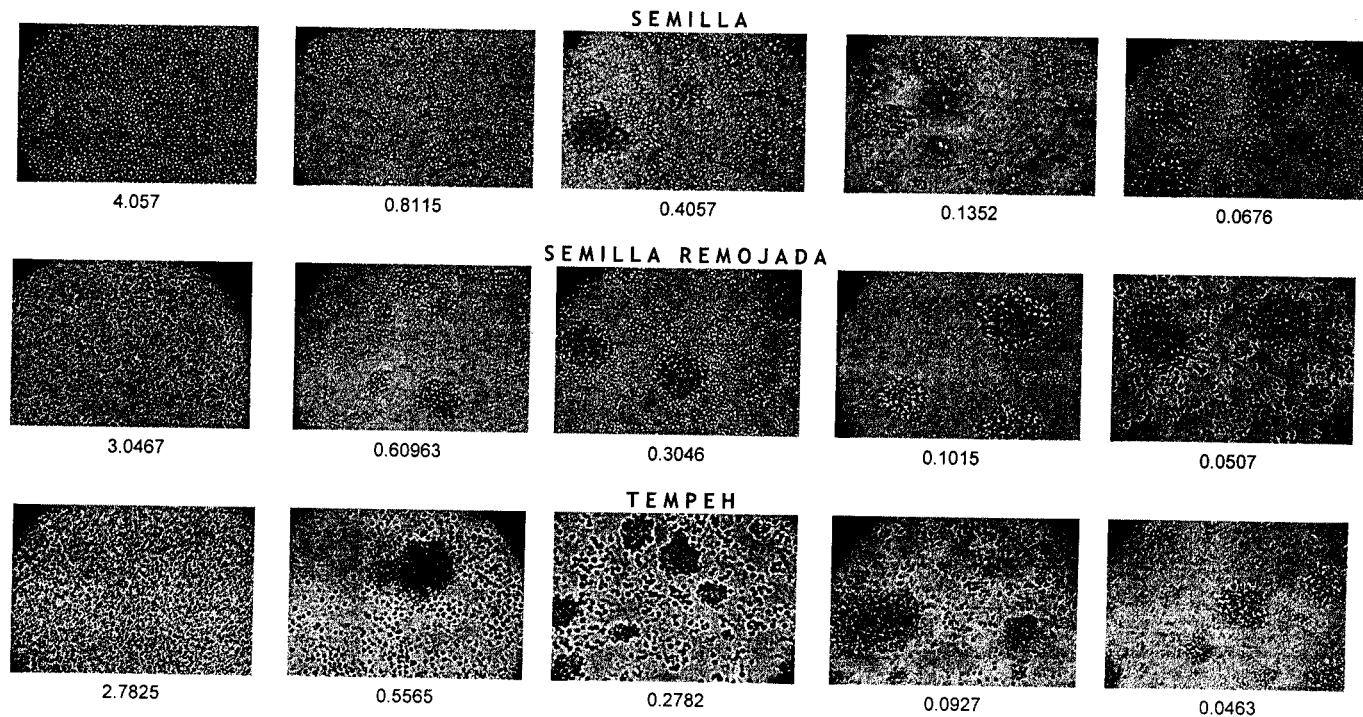


Figura 3.4.8 Observación al microscopio de las células mononucleares de sangre periférica CMSP. Objetivo 20x



Figura 3.4.8 Efecto gradual de la proliferación de CMSP expuestas a diferentes concentraciones de alcaloides de colorín expresado como mg β -eritroidina/mL. Objetivo 20x. La observación corresponde uno de los tres experimentos independientes. Los cúmulos de células representan una mayor proliferación y por ende un menor daño



5.5 ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Durante el ensayo de toxicidad aguda se observó que en los lotes correspondientes a las concentraciones más altas, los animales después de 5 - 10 minutos de haber sido administrados presentaron los siguientes síntomas: iniciaban con un ligero aletargamiento, leves convulsiones seguidas de anoxia, disnea y finalmente la muerte. Sin embargo, algunos de los animales que presentaron uno o varios de estos síntomas se recuperaron en su totalidad dentro del periodo de observación.

Con los datos obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda se calculó la DL₅₀ por medio del método estadístico de Litchfield y Wilcoxon ⁽⁴²⁾ y los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla 5.5.1.

Tabla 5.5.1 Resultados de la evaluación de la Dosis Letal Media por vía oral en ratones macho de las diferentes muestras de *Erythrina americana*

Muestras	DL ₅₀ (mg/kg p.c.)	Límites (mg/kg p.c.)
Semilla	12, 500	7, 344 - 21, 275
Semilla remojada	14, 750	11, 523 - 18, 880
Tempeh	52, 000	NC

NC: No calculado

Si se comparan los resultados obtenidos en este estudio con los reportados por Sotelo y colaboradores en año de 1993 ^(19.), se observa que el valor de DL₅₀ que se obtuvo para semilla es muy similar al reportado: 13 750 mg/kg p.c.



Al comparar los tres resultados de DL₅₀, se puede asegurar que la semilla fue la más tóxica, seguida de la semilla remojada y finalmente el Tempeh donde se obtuvo una DL₅₀ de 52 000 mg/kg p.c., el cual puede considerarse como relativamente inocuo, como lo muestra la clasificación reportada en la Tabla 5.5.2.

Tabla 5.5.2 Clasificación de los agentes xenobióticos de acuerdo a la dosis letal media²⁹

Categoría	DL ₅₀ en ratón (mg/Kg p.c.)
Súper tóxico	< 5
Extremadamente tóxico	5 - 50
Altamente tóxico	50 - 500
Moderadamente tóxico	500 - 5000
Ligeramente tóxico	5000-15000
Prácticamente no tóxico	> 15000

Al considerarse los resultados obtenidos durante todo el desarrollo de este proyecto se puede decir que el proceso utilizado para destoxificar las semillas de *Erythrina americana* fue eficiente, ya que cada uno de los experimentos realizados comprobaron que parte de los alcaloides se perdieron durante el proceso de remojo, disminuyendo la toxicidad de dichas semillas hasta en un 50%.



CONCLUSIONES

- En el periodo de remojo de las semillas de colorín en la solución de ácido láctico al 1%, se perdieron algunos de los carbohidratos y proteínas solubles, concentrando el resto de los macrocomponentes como la fibra y la grasa.
- Una parte importante de los alcaloides se perdió durante el remojo, debido a su solubilidad, disminuyendo la toxicidad de las semillas de *Erythrina americana* hasta en un 50%.
- Durante la fermentación se observó que no se disminuyó el contenido de alcaloides en semillas, pero si se mejoraron las propiedades sensoriales, tomando un ligero aroma a nuez.
- En los ensayos de citotoxicidad que se realizaron tanto en líneas celulares (Hela y K-562) así como en células mononucleares de sangre periférica (linfocitos), se observó que los extractos de alcaloides de semilla ejercieron un mayor efecto en la inhibición de la proliferación celular, seguido por la semilla remojada y finalmente el Tempeh, comprobando la disminución de la toxicidad de estas semillas durante el proceso de destoxificación.



- El valor obtenido de DL_{50} del Tempeh de colorín fue mayor a 15 000 mg/kg p.c. por lo que se le podría considerar como un alimento relativamente inocuo, con respecto a la semilla que fue de 12 500 mg/kg p.c.
- La elaboración de Tempeh de semillas de colorín es un proceso que logró disminuir hasta en un 50% la toxicidad de esta leguminosa silvestre, cuyo producto podría utilizarse como ingrediente en la elaboración de dietas suplementadas para alimentación animal.



ANEXO A

INFORMACIÓN ESPECÍFICA DE LA CEPA DE *Rhizopus oligosporus*

Nombre: *Rhizopus oligosporus*

Características:

1) Macromorfología:

a) Anverso

Tamaño: ilimitado, tiende a llenar los tubos y cajas

Aspecto: algodonoso, seco.

Color: al principio blanco, posteriormente toma un color gris oscuro

a) Reverso

No presenta pigmento

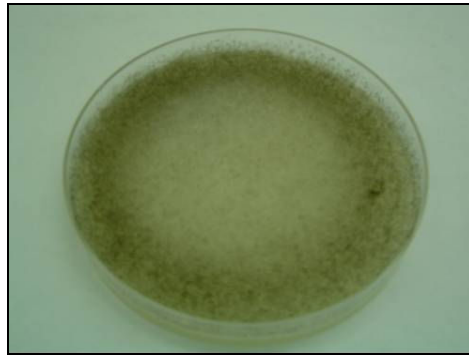


Figura A.1 Crecimiento en caja de *Rhizopus oligosporus*



2) Micromorfología:

Micelio cenocítico (sin ceptos), macrosifonado y hialino.

Modalidad de micelio: presenta rizoides y estolones.

Reproducción: asexualmente mediante esporangiocondios y sexualmente por zigosporas.

Estructuras especializadas: esporangióforo largo sin ramificación, columnela pequeña de forma ovoidal y esporangio.



Figura A.2 Esporas de Rhizopus oligosporus



PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS

1. Se creció *Rhizopus oligosporus* en placa, en medio agar papa dextrosa a una temperatura de 37°C durante 7 días.
2. Las esporas fueron cosechadas con 10 mL agua estéril, desprendiéndolas con una espátula estéril.
3. Se transfirieron a un tubo estéril de 15 mL y se centrifugaron a 300 rpm durante 1 minuto, se eliminó todo el micelio que quedo suspendido y se decantó el agua de lavado y las esporas que quedaron sedimentadas, se resuspendieron en 5 mL de agua estéril para dar una suspensión de aproximadamente 10⁶ esporas por mililitro.



ANEXO B

DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA DE ALCALOIDES

Reactivos:

1. Reactivo de MAYER. Se disolvieron 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y 5.0 g de KI en 10 mL de agua. Se juntaron las dos soluciones y se aforaron a 100 mL con agua destilada.
2. Reactivo de WAGNER. Se disolvieron 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua; la solución se aforó a 100 ml con agua destilada.
3. Reactivo DRAGENDORFF. Se disolvieron 8.0 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico (densidad 1.18 o sea el 30%) y 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclaron las dos soluciones y se dejaron reposar 24 horas. Se decantó la solución y se aforó con agua a 100 mL.
4. Reactivo de SONNENSCHNEIN. A 100 mL de una solución caliente de molibdato de amonio (43 g/100 mL), se adicionaron 100 mL de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g/100 mL); a esta solución clara se le adicionaron 10 mL de ácido nítrico concentrado; el precipitado amarillo que se formó se dejó reposar durante una hora. Se decantó el líquido sobrenadante y se desechó, se resuspendió el precipitado amarillo en 50 mL de agua destilada y se calentó.
A la suspensión caliente se le adicionaron 100 mL de una solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g/100 mL). Se formó una solución



clara, y esta solución se evaporó hasta sequedad y se flameó la superficie del polvo con un mechero Bunsen hasta encenderse para evaporar las sales de amonio. Se pesó el polvo y se obtuvieron aproximadamente 30 g (si se realizó con las cantidades indicadas anteriormente).

El polvo se disolvió en 200 mL de agua destilada caliente, se calentó y adicionó 50 ml de ácido nítrico concentrado, a esta solución se le adicionó agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 ml; dando como resultado una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

5. Reactivo de HAGER. Se preparo una solución acuosa saturada de ácido pícrico, (2.0 g 100 mL).
6. Reactivo de SCHEIBLER. Se disolvieron en 50 mL de agua 10 g de túngstato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se aciduló con ácido nítrico.
7. Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTENICO. Se disolvieron 5 g de ácido silicotúngstico en ácido sulfúrico (6.0 N) necesario para formar 100 mL de solución.

Prueba positiva:

1. Reactivo de MAYER. El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o H₂SO₄ diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol por que disuelve el precipitado. Solo deben agregarse unas cuantas gotas por que algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.



2. Reactivo de WAGNER. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.
3. Reactivo DRAGENDORFF. Se usa sobre soluciones aciduladas, se observa un precipitado de color naranja-marrón
4. Reactivo de SONNENSCHNEIN. Los alcaloides y sales de amonio dan precipitados amarillos.
5. Reactivo de HAGER. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados color amarillo.
6. Reactivo de SCHEIBLER. La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.
7. Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTENICO. La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.



ANEXO C

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES

MÉTODO DE LA FARMACOPEA MODIFICADO POR MORENO ENRÍQUEZ 2001

Reactivos

- H_2SO_4 0.02N valorado
- Solución indicadora de rojo de metilo
- H_2SO_4 1.00N ($\rho = 1.84$ g/mL)
- NH_4OH 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 g de muestra molida y previamente cernida por una malla 0.5 mm.
- 2.- Se adicionaron 50 mL de metanol previamente alcalinizado a $\text{pH } 9 \pm 1$, con NH_4OH .
- 3.- Se agitó (300-500 rpm con agitador magnético en una parrilla de agitación) durante 8 horas, después de éstas filtrar con ayuda de vacío usando papel Whatman No. 541.



- 4.- Al residuo se le adicionó nuevamente 50 mL de metanol alcalinizado y agitar 16 horas más. El filtrado se guardó en refrigeración.
- 5.- Se filtró con ayuda de vacío (el mismo embudo y el mismo papel del día anterior), recibiendo el filtrado en el matraz que se guardó en refrigeración. Se lavó el vaso y el residuo con 20 mL de metanol alcalinizado.
- 6.- El disolvente se evaporó casi a hasta sequedad, por medio de 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. 541, recibiendo en un embudo de separación y se extrajo recuperando la fase acuosa (inferior).
- 9.-La fase orgánica (superior) se extrajo tres veces con 5 mL de H_2SO_4 cada vez. Se recolectaron las fases acuosas con la anterior y se colocaron en un embudo de separación.
- 10.-Se adicionaron 25 mL de cloroformo y se extrajo, recuperando la fase acuosa (superior).
- 11.-La fase orgánica (inferior) se extrajo con 5 mL de agua y 5 mL de ácido cada vez. Se recolectaron las fases acuosas con la anterior y extrajeron 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.- Se alcalinizó con NH_4OH concentrado hasta un $\text{pH} > 9$.
- 14.- Posteriormente se extrajo tres veces con 35 mL de cloroformo cada vez, recuperando la fase orgánica (inferior).



15.- Se secó con Na_2SO_4 anhidro durante toda la noche, al día siguiente se filtró y evaporó el cloroformo en rotavapor ($T = 40^\circ\text{C}$)

16.- Finalmente se redisolvió el residuo con 3 mL de metanol (uno por uno), trasvasando cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer y se agregaron 7 mL de agua destilada.

17.- Se adicionó una gota de indicador rojo de metilo y tituló con H_2SO_4 valorado.

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

Cálculos:

Se reporta como β -eritroidina

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

A = mL de H_2SO_4 gastados por la muestra.

B = mL de H_2SO_4 gastados por un blanco (7 mL de agua destilada y 3 mL de metanol)

* Peso molecular de β -eritroidina

** Para realizar el cambio de unidades a miliequivalentes.



ANEXO D**DESCONGELACION, PROPAGACION Y CRIOPERSERVACION DE LAS LÍNEAS
CELULARES HELA Y K-562****I. Descongelación de las líneas celulares**

- a) Se preparó medio de cultivo D-MEM (medio mínimo esencial modificado por Dulbeccos) y se atemperó a 37° C. Posteriormente se colocaron 4 mL de medio de cultivo en una caja petri de 5 cm de diámetro rotulada.
- b) Se sacó un criotubo del banco de células contenido en nitrógeno líquido y se descongeló.
- c) Se agregó el contenido del criotubo en la caja petri y se distribuyó el contenido con movimientos circulares suaves.
- d) Se incubó por 1-2 horas hasta que las células se adhirieron a la superficie de la caja petri y posteriormente se hace un cambio de medio.

II. Propagación de las líneas celulares

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

Para propagar las células:

- a) Se aplicaron movimientos circulares suaves a la caja y se decantó el sobrenadante.
- b) Se llevó a cabo un lavado con 3 mL de PBS- EDTA (amortiguador salino de fosfatos con ácido etilendiamino tetracético) 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 por 5 min.
- d) Se desprendieron las células con ayuda de una micropipeta 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. Esto se comprobó con ayuda del microscopio.
- f) Se adicionó una alícuota de la suspensión celular en una placa de cultivo con medio de cultivo fresco y se distribuyó uniformemente con movimientos circulares.

III. Criopreservación de las líneas celulares

Para congelar la línea de cultivo se requirió que poseyera una confluencia del 80 - 90%. Se lavaron y se desprendieron las células y se procedió de la siguiente manera:

- a) La suspensión celular se colectó con una micropipeta y se colocó en un tubo de centrífuga. Se centrifugó a 800 rpm 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 (dimetilsulfóxido) y se homogenizó para lograr una suspensión celular uniforme.
- d) Se adicionó la suspensión celular en criotubos.



- e) Se congelaron los criotubos en posición vertical al -70°C por 2-4 horas y finalmente se introdujeron los criotubos en nitrógeno líquido.



ANEXO E

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO PARA ENSAYOS DE
CITOTOXICIDAD EN LINEAS CELULARES

I. Preparación de Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbeccos (D-MEM)

Reactivos:

- Medio D-MEM (Gibco Invitrogene 31600-034) para la preparación de 1L de medio
- 10 mL de una solución de Antibiótico-antimicótico (Gibco Invitrogene)
- 2.2 g de ácido 4-(2-hidroximetil)-1-piperazinetanolsulfónico HEPES (Sigma)
- 10 mL de L-Piruvato (Gibco Invitrogene)
- 10 mL de Aminoácidos no esenciales (Gibco Invitrogene)
- 3.7 g de NaHCO_3 (Sigma)
- 900 mL de agua desionizada y estéril
- 100 mL de suero fetal bovino inactivado (Gibco Invitrogene)

Procedimiento:

1. 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.
2. Se agregaron los reactivos complementarios y se continuó la agitación.
3. Se agregó agua desionizada estéril para completar 900 mL.
4. Se esterilizó el medio por filtración a través de una membrana de $0.22\mu\text{m}$ (Millipore) dentro de la campana de flujo laminar.



5. Se colocó una alícuota del medio de cultivo en una caja Petri estéril y se incubó a 37 °C como prueba de esterilidad.
6. Se tomó una alícuota el medio de cultivo en botellas de vidrio estéril y se refrigeró.
7. Antes de usarse el medio se complementó con 10 % de suero fetal bovino inactivado. La caducidad del medio mantenido en refrigeración es de 30 días aproximadamente.

II. Preparación de Solución Amortiguadora de Fosfatos con EDTA (PBS - EDTA)

Reactivos:

- 8.0 g de NaCl (J.T. Baker)
- 0.24 g de KH_3PO_4 (Sigma)
- 1.44 g Na_2HPO_4 (Sigma)
- 0.20 g KCl(J.T. Baker)
- 0.37 g de EDTA disódico (Sigma)
- 1 L de agua desionizada

Procedimiento:

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



III. Reactivo de MTT

Se pesaron 25 mg de bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio MTT (Sigma) y se disolvieron en 10 mL de solución de PBS y se conservó en refrigeración resguardado de la luz.



ANEXO F

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO PARA ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN CELULARES MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (LINFOCITOS)**I. Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640)**

Reactivos

- Un sobre (10 g) de Medio RPMI (Gibco Invitrogene 13200-076)
- 2.5g de Dextrosa
- 2.0g de NaHCO_3 (Sigma)
- 10mL L-Piruvato (Gibco Invitrogene)
- 10mL Antibiótico-antimicótico (Gibco Invitrogene)
- 10 mL de Aminoácidos no esenciales (Gibco Invitrogene)
- 900mL de agua estéril desionizada
- 100mL de suero fetal bovino inactivado (Gibco Invitrogene)

Procedimiento:

1. 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.
2. Se agregaron los reactivos complementarios y se continuó la agitación.
3. Se agregó agua desionizada estéril para completar 900 mL.
4. Se esterilizó el medio por filtración a través de una membrana Milipore de 0.22 micrómetros dentro de la campana de flujo laminar.
5. Se colocó el medio de cultivo en botellas de vidrio estéril y se refrigeró.



6. Antes de usarse el medio se complementó con 10% de suero fetal bovino inactivado.

II. Hystopaque - 1077 (SIGMA H-8889)

III. PBS

Reactivos:

- 8.0 g de NaCl (J.T. Baker)
- 0.25 g de KH_3PO_4 (SIGMA)
- 1.44 g de NaHPO_4
- 0.20 g de KCl (J.T. Baker)
- 1 L de Agua desionizada

Procedimiento:

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

IV. Solución de fitohemaglutinina (PHA)

Reactivos:

- 2mg de PHA Lecitina de *Phaseolus vulgaris* (SIGMA L-8754)
- 5mL de solución de PBS

Procedimiento:

1. Se pesó la PHA en un tubo eppendorf de 2 mL y se disolvió con 1 mL de PBS.



2. Se traspasó a un tubo cónico de 15 mL.
3. Se agregó 1 mL de PBS al tubo eppendorf para lavar y recuperar toda la PHA que se quedó y se traspasó al mismo tubo cónico.
4. Se llevó a 5 mL con la solución de PBS.



ANEXO G**EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES PARA ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD**

Para la extracción de los alcaloides se utilizaron las siguientes muestras: harina de semilla de colorín, harina de semilla remojada y harina de Tempeh. Se realizó la extracción mediante a técnica descrita en el Anexo C.

Las muestras se trabajaron de la misma forma hasta el punto 15, que es donde se evaporó todo el cloroformo para obtener los alcaloides en forma de sales, posteriormente se disolvieron en 2mL de agua acidulada pH 4.

Finalmente los extractos se esterilizaron por medio de filtración a través de una membrana Milipore de 0.45 μm (Millipore HAWP 01300) dentro de la campana de flujo laminar.



ANEXO H

CÁLCULOS DE CITOTOXICIDAD IC₅₀

Ejemplo de cálculos:

1.- Una vez que se obtienen los resultados de densidad óptica del método de MTT se calculan los promedios y posteriormente el porcentaje de inhibición celular de cada triplicado por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{inhibición} = 100 \times ((1) - (X \text{ abs problema} / X \text{ abs control}))$$

Donde:

X abs problema: promedio de las absorbancias del tratamiento

X abs control: promedio de las absorbancias del control

En las siguientes tablas se muestra un ejemplo de los cálculos realizados con los datos de absorbancia obtenidos.

Tabla H.1 Resultados de densidad óptica de los extractos de semilla 1 probados en CMSP						
REPETICIÓN	Concentración (mg β -eritroidina/mL)					Control sin tratamiento
	4.057	0.8115	0.4057	0.1352	0.0676	
1	0.254	0.41	0.599	0.644	0.673	0.68
2	0.274	0.379	0.586	0.611	0.658	0.651
3	0.284	0.408	0.518	0.659	0.679	0.605
Promedio	0.271	0.399	0.568	0.638	0.67	0.647
Promedio control sin tratamiento	0.654	0.654	0.654	0.654	0.654	0.689
% Inhibición de proliferación celular	58.64	39.03	13.25	2.51	-2.38	0.654*

*Promedio de las densidades ópticas del control sin ningún tratamiento



Tabla H.2 Resultados de densidad óptica de los extractos de semilla 2 probados en CMSP

REPETICIÓN	Concentración (mg β -eritroidina/mL)					Control sin tratamiento
	4.057	0.8115	0.4057	0.1352	0.0676	
1	0.191	0.292	0.32	0.58	0.661	1.328
2	0.179	0.308	0.412	0.55	0.566	1.375
3	0.197	0.327	0.564	0.552	0.637	1.256
Promedio	0.189	0.309	0.432	0.561	0.621	1.416
Promedio control sin tratamiento	1.106	1.106	1.106	1.106	1.106	1.156
% Inhibición de proliferación celular	82.91	72.07	60.95	49.32	43.83	1.106*

*Promedio de las densidades ópticas del control sin ningún tratamiento

Tabla H.3 Resultados de densidad óptica de los extractos de semilla 3 probados en CMSP

REPETICIÓN	Concentración (mg β -eritroidina/mL)					Control sin tratamiento
	4.057	0.8115	0.4057	0.1352	0.0676	
1	0.174	0.195	0.294	0.302	0.325	0.378
2	0.174	0.185	0.234	0.272	0.306	0.377
3	0.166	0.187	0.247	0.278	0.319	0.346
Promedio	0.171	0.189	0.258	0.284	0.317	0.367*
Promedio control sin tratamiento	0.367	0.367	0.367	0.367	0.367	
% Inhibición de proliferación celular	53.32	48.5	29.61	22.62	13.71	

*Promedio de las densidades ópticas del control sin ningún tratamiento

Tabla H.4 % Inhibición de proliferación celular de los extractos de alcaloides de semilla de colorín probados en CMSP

Concentración (mg β -eritroidina/mL)	Semilla 1	Semilla 2	Semilla 3	Promedio
0.0676	-2.38	43.83	13.71	18.39
0.1352	2.51	49.32	22.62	24.82
0.4057	13.25	60.95	29.61	34.60
0.8115	39.03	72.07	48.5	53.20
4.057	58.64	82.91	53.32	64.96



2.- Con los resultados obtenidos de los cálculos se realizan regresiones no lineales de tipo sigmoidales de Concentración (mg β -eritroidina/mL) Vs % Inhibición de proliferación celular en el programa estadístico Origin 5.0. De los valores que proporciona el programa después de haber realizado la regresión no lineal se toman los valores más cercanos por arriba y por debajo del 50% de inhibición y se hace una interpolación considerando que hay una tendencia lineal entre el punto y el valor de 50%. Se promedian dando el final.

Semilla 1	
Concentración (mg β -eritroidina/mL)	% Inhibición de proliferación celular
1.3523	49.3374
1.4199	50.3837
1.3861	49.8606

Semilla 2	
Concentración (mg β -eritroidina/mL)	% Inhibición de proliferación celular
0.1352	48.5075
0.2028	52.1765
0.1690	50.3420

Semilla 3	
Concentración (mg β -eritroidina/mL)	% Inhibición de proliferación celular
1.1494	50.0545
1.1494	50.0545

3.- Finalmente se promedia los resultados y se reporta el valor promedio como el valor de $IC_{50} \pm$ desviación estándar.

Semilla promedio	
Concentración (mg β -eritroidina/mL)	% Inhibición de proliferación celular
1.386	49.861
1.149	50.055
1.268 \pm 0.167	49.958



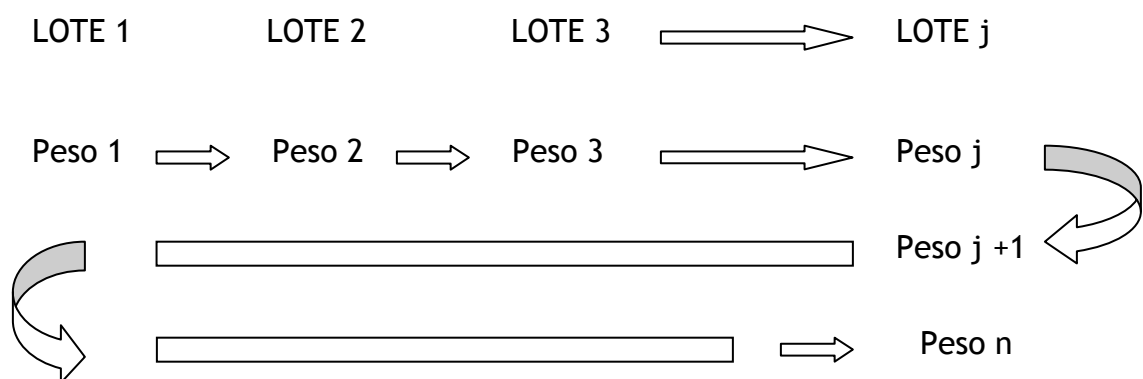
ANEXO I

MÉTODO DE “CULEBRA JAPONESA”

PARA LA DISTRIBUCIÓN DE ANIMALES

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

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



Donde:

Peso 1 < Peso 2 < Peso 3 ... < Peso j < Peso j + 1 ... < Peso n



ANEXO J

DEFINICIONES UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA (36, 37)

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

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

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

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

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

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

DISNEA: Respiración difícil o acelerada.

ERECCIÓN CAUDAL: Estado turgente de la cola.

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

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

LORDOSIS: Curvatura hacia delante de la columna vertebral lumbar.

PILOERECCIÓN: Erección del pelo.



BIBLIOGRAFÍA

1. O'Gorman H., Plantas y Flores de México, Dirección General de Publicaciones UNAM, México D.F., 1993, pp 24-25.
2. Adrian J., Frangne R. La ciencia de los alimentos de la A a la Z. Acribia, S.A. Zaragoza. 1990, pp 170-171.
3. Sotelo, A. The Nutritive Value of Wild Mexican Legumes with a Potential for Nutritional Use. *In Legumes and Oilseeds for Nutrition*; Nwokolo, E., Smartt, J., Eds.; Chapman and Hall: New York, 1996; pp 33-48.
4. Sotelo A., Lucas B. Variation in antinutritional factors at different development stages in seeds of *Phaseolus vulgaris* and *Erythrina americana*. EAAP. Publi. 93 Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed. Wageningen 1998, pp. 409-412.
5. Bourges H. Las leguminosas en la alimentación humana (1ª parte). Cuad. Nutr. 1987, 10. (1)17-32.
6. Hui Y. Encyclopedia of Food Science and Technology. Proteins. Vol 3. Wiley-Interscience Publication. New York. 1992, pp 2176-2177, 2187-2189.
7. Mateo-Box J. Leguminosas en grano, Salvat Editores, S.A. Zaragoza, 1961, pp.3-4, 8-15.
8. Kaufer Horwitz M. La fibra y su aporte a la salud. Cuad. Nutr. 1985, 8 (5): 17-32.



9. Robinson D. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Acribia, S.A. Zaragoza. 1991. pp. 109-141.
10. Linden G., Loriet D. Bioquímica agroindustrial, Revaporización alimentaria de la producción agrícola, Acribia, S.A. Zaragoza. 1994, pp 99-106.
11. Bruneton J. Elementos de Fotoquímica y Farmacognosia, Acribia, Zaragoza, 1991, pp. 355-366.
12. Sotelo A., Soto M. and Giral F. Comparative studies of the alkaloidal composition of the two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of the detoxified seeds, J. Agric. Food. Chem. 1993, 41(12):2340-2343.
13. García Mateos R., Lucas B., Zendejas M., Soto Hernandez M., Martínez M., Sotelo A. Variation of the total nitrogen, non protein nitrogen content and types of alkaloids in different stages of developments in *Erythrina americana* Seeds, J. Agri. Food Chem., 1996, 44:2987-2991.
14. Goodwin and Mercer, Introduction to plant biochemistry, Pergamon Press, Oxford, 2nd Edition, 1983. pp. 480-481, 526-527.
15. Ikan R. Natural products, a laboratory guide. Academic Press, San Diego California, 2nd Edition, 1991. pp. 226-227.
16. Garín-Aguilar M., Ramírez E., Soto-Hernández M., Valencia del Toro G., Martínez-Vázquez M. Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill on aggressive behavior in rats, Ethnopharmacol. 2000, 69 (2): 189-196.
17. Jiménez V. L., Eliminación de los componentes tóxicos de dos semillas del género *Erythrina* y su evaluación bromatológica, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 1994.



18. García-Mateos R., Soto-Hernández M., Kelly D., Alkaloids from six *Erythrina* especies endemic to Mexico, *Bioch. Sistem. Ecol.*, 1998, 26: 545-551.
19. García-Mateos R. Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez M., Villegas-Monter A., Isolation of alkaloids of *Erythrina americana* from tissue culture, *Phytochem. Anal.*, 1999, 10:12 -16.
20. Mora G. M., Rancel 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, pp 11-16.
21. Freshney R. I., Culture of animal cells. A manual of basic Techniques, 33 Ed, Wiley-Liss, New York. 1994, pp 5, 287-288.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983, Dec 16:65 (1-2):55-63.
23. Van de Loosdrecht A. A., Beelen R.H., Ossenkoppele G.J., Broenkhoven 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. Meth.* 1994, 174 (1-2):311-20.
24. Green M.L., Reade J. L., Ware C. F., Rapid colorimetric assay for cell viability application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphocytes. *J. Immunol. Meth.* 70 (1984) 257-268.



25. 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*, *Mycophatology*, 1998. pp. 143, 105-111.
26. Lu F. C., *Toxicología básica. Riesgos por exposición a sustancias tóxicas*, Harlan, México D.F. 1992 pp. 1-7, 55-62, 99-105.
27. Jauge P., *Nociones básicas de toxicología*, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, México D.F. 1985 pp. 3-16, 19-23, 29-41, 44-64.
28. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS*. 15th, ed. Association of official Analytical Chemists. Washington, D.C., Vol I y II. pp. 17-18, 79, 80, 777. 1990.
29. Loomis T. A., *Essentials of toxicology*, Lea and Febireg, Philadelphia, 3rd Edition 1998 pp 13-23, 67-79, 195-209.
30. M. R. Adams, M. O. Moss, *Microbiología de los alimentos*, Editorial Acribia, S.A., Zaragoza. 1997, pp. 374-375.
31. Francisco R.; David O. Chemical and enzymatic changes during the fermentation of bacteria-free soy bean Tempe. *J. Sci. Food Agric*, 1996, 71, 523-530.
32. Iljas N., A.C. Peng y W. A. Gould. Tempeh an Indonesian fermented soybean food The Ohio State University. Ph. D. Thesis, Ohio 1972, pp 15-23.
33. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo 1, 7ª edición*, México, D.F. 2000, pp 184-185 (MG 0051).



34. Moreno Enriquez Rosa Imelda. Estimación de la toxicidad aguda y cuantificación de alcaloides totales en *Erythrina americana* en diferentes fases de desarrollo. Tesis de licenciatura. Facultad de química México D.F. 2001, pp. 30-35.
35. Litchfield J.T. y Wilcoxon F., A simplified of evaluating dose-effect experiments, *Pharmacol. Exp. Therap.*, 1949, 96:99-113.
36. Gennaro A., Hart A., Nora J., Stander R., Weiss L., Diccionario enciclopédico de las ciencias médicas, Vol I-4, Mac Graw-Hill, México D.F., 4ª Edición, 1984 pp: 154, 269, 495, 518, 712, 1076.
37. Ortiz Q. F., Enciclopedia médica familiar, Vol. 3, 4 y 8, Editorial Televisión, México D.F., 1992, pp: 172, 208, 498-499.

