

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE GALANTAMINA EN *Phaedranassa dubia*,
(Amaryllidaceae) EN LA ZONA DE LA SIERRA Y ROSAS (CAUCA) y SU
RELACIÓN CON MACRO Y MICRONUTRIENTES DEL SUELO.**

ALEXANDER ANDRES YANZA BRAVO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2009**

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE GALANTAMINA EN *Phaedranassa dubia*,
(Amaryllidaceae) EN LA ZONA DE LA SIERRA Y ROSAS (CAUCA) Y SU
RELACIÓN CON MACRO Y MICRONUTRIENTES DEL SUELO.**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

ALEXANDER ANDRES YANZA BRAVO

DIRECTOR

FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO, Ph.D
Profesor departamento de Química

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
POPAYAN
2009

Nota de Aceptación.

Director

Fabio Antonio Cabezas Fajardo
M.Sc.

Jurado

Isabel Bravo Realpe.
M. Sc.

Jurado

Edier Umberto Perez
Ph.D

*“Solo a ti Dios te dedico en el día de hoy por lo que soy
Todo lo bueno que tengo solo tú lo has hecho realidad
Y en los días de mi vida siempre estarás conmigo
Porque solo tú eres mi faro
Solo tú eres mi creador
Solo tú eres y serás siempre mi señor”*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser quienes lucharon día a día y me formaron para ser lo que soy.

A mis hermanos por confiar en mí.

A Adriana y a mi hijo por ser las razones de mi vida.

Al profesor Fabio Cabezas, gracias por dirigir este trabajo y ser además de mi director, mi amigo.

A mis compañeros del Grupo de Compuestos Bioactivos y Catálisis. Especialmente a Jorge, Yuri, Farid, Sebastián a mis buenos amigos Jhon Erick, Alejandra, Cristina, Sonia, Manuel, Arcadio, William, Mónica, Marisol, Sandra, Jacke, Ana Maria, Maricela, Isabel, Claudia. Gracias por permitirme conocerlos y brindarme su amistad y colaboración en todo momento.

A los profesores del Departamento de Química por ayudarme en mi formación profesional.

Agradezco al Grupo de Investigación en Agroquímica y la Unidad de Análisis Industriales quienes facilitaron el desarrollo del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	pág
LISTA DE TABLAS.	9
LISTA DE FIGURAS.	11
LISTA DE ANEXOS.	12
LISTA DE ABREVIATURAS.	13
RESUMEN.	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVO ESPECIFICO	18
3. FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	20
3.1 GENERALIDADES	20
3.1.1 Los alcaloides	21
3.1.2 Clasificación de los alcaloides	22
3.2 GENERALIDADES DE LOS ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE	23
3.2.1 Galantamina. alcaloide de la familia Amaryllidaceae	25
3.2.2 Biosíntesis de alcaloides de la familia Amaryllidaceae	27
3.2.3 Obtención de Galantamina	29
3.3 PROCESOS INDUSTRIALES DE EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES	30
3.4 GENERO <i>Phaedranassa</i>	30
3.5 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR	31
3.6 CLASIFICACION DE LOS METODOS CROMATOGRAFICOS.	31
3.6.1 Cromatografía líquida de alta resolución	33
3.7 MACRONUTRIENTES Y MICRONUTRIENTES	35
3.7.1 Macronutrientes	35
3.7.2 Micronutrientes	40
4. METODOLOGÍA	46
4.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS	46
4.2 UBICACIÓN GEOGRAFICA	47
4.3 COLECCIÓN Y CLASIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL	47
4.4 TOMA DE MUESTRA	48

4.5	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GAL POR CLAR	50
4.6	EXTRACCION DE ALCALOIDES EN LA ESPECIE DE <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae) y ANALISIS POR HPLC.	51
4.7	ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Phaedranassa dubia</i> .	52
4.8	ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DE SUELO	53
	4.8.1 Análisis físicos.	53
	4.8.2 Análisis químicos.	54
5.	DATOS Y RESULTADOS	58
5.1	BIOREFERENCIACION	58
5.2	TAMIZAJE FITOQUIMICO	59
5.3	CONDICIONES EXPERIMENTALES	60
	5.3.1 Elección de la fase móvil	61
5.4	ESTANDARIZACION DEL METODO ANALITICO	61
	5.4.1 Evaluación de la linealidad del sistema	61
	5.4.2 Determinación del test estadístico de la pendiente y del intercepto.	63
	5.4.3 Limite de confianza de la pendiente y del intercepto	64
	5.4.4 Reproducibilidad	64
	5.4.5 Sensibilidad	65
	5.4.6 Exactitud	67
5.5	CUANTIFICACION DE GALANTAMINA	69
	5.5.1 Cuantificación de galantamina en la especie <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae) por cromatografía líquida de alta resolución	69
	5.5.2 Contenido de galantamina en las especies <i>Eucharis amazónica</i> , <i>Caliphurria subedentata</i> y <i>eucharis grandiflora</i> por cromatografía líquida (HPLC)	72
5.6	ANALISIS FISICO Y QUIMICO DE SUELO ASOCIADO A LA ESPECIE <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae)	74
	5.6.1 Sitio de muestreo I.	78
	5.6.2 Sitio de muestreo II.	78
	5.6.3 Sitio de muestreo III.	80
	5.6.4 Sitio de muestreo IV.	81
	5.6.5 Sitio de muestreo V.	82

5.6.6	Sitio de muestreo VI.	83
5.7	CORRELACION DEL CONTENIDO DE GALANTAMINA CON PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE SUELOS ASOCIADOS	86
6	CONCLUSIONES	88
7	BIBLIOGRAFIA	90
	ANEXOS	94

LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla 1.	Clasificación de alcaloides de Amaryllidaceae , según los tipos estructurales	26
Tabla 2.	Clasificación de métodos cromatográficos en columna	33
Tabla 3.	Ubicación geográfica de sitios de muestreo de <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae) en los municipios de La Sierra y Rosas del Departamento del Cauca.	61
Tabla 4.	Resultados tamizaje fitoquímico para el extracto etanólico de la especie <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae)	62
Tabla 5.	Condiciones de trabajo seleccionadas en el análisis de trabajo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	63
Tabla 6.	Parámetros para evaluación de la linealidad del sistema	65
Tabla 7.	Límites de confianza para la pendiente y el intercepto	67
Tabla 8.	Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de galantamina en un periodo de 15 días.	67
Tabla 9.	Curva de calibración. Límite de detección y cuantificación de galantamina en <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae)	68
Tabla 10.	Evaluación de la linealidad. Determinación de límite de detección y cuantificación	68
Tabla 11.	Límite de detección (LOD) instrumental para la determinación de galantamina en <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae)	69
Tabla 12.	Límite de cuantificación (LOQ) instrumental para la determinación de galantamina en <i>Phaedranassa dubia</i>	69
Tabla 13.	Porcentaje de recuperación de galantamina en el extracto metanólico de <i>Phaedranassa dubia</i>	70

Tabla 14.	Cantidad promedio de galantamina en la parte aérea y bulbosa de la especie <i>Phaedranassa dubia</i> de la zona de la Sierra y Rosas.	71
Tabla 15	Contenido promedio (mg/Kg) de galantamina en la parte bulbosa y hojas de las especies <i>Caliphruria subedentata</i> , <i>Eucharis amazónica</i> y <i>Eucharis grandiflora</i> (Amaryllidaceae)	74
Tabla 16.	Análisis físicos y químicos de suelos asociados a la especie <i>Phaedranassa dubia</i>	77
Tabla 17.	Contenido de Bases de Cambio Y saturación de suelos asociados a la especie <i>Phaedranassa dubia</i> .	78
Tabla 18.	Contenido de Micronutrientes de suelos asociados a la especie <i>Phaedranassa dubia</i>	79
Tabla 19.	Coeficientes de correlación de Spearman entre contenido de galantamina y propiedades fisicoquímicas de los suelos asociados ala especie <i>P. dubia</i> en los municipios de La Sierra y Rosas.	88

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura 1.	Estructura Química. Galantamina.	27
Figura 2.	Biosíntesis de precursores de alcaloides de la familia Amaryllidaceae .	29
Figura 3.	Extracción de alcaloides de especies de la familia Amaryllidaceae .	30
Figura 4.	Actividad del manganeso en el proceso de desdoblamiento de la molécula de agua.	43
Figura 5.	Flor de <i>Phaedranassa dubia</i>	50
Figura 6.	Método de extracción de alcaloides en las especies de Amaryllidaceae para Análisis por HPLC. Análisis por triplicado	53
Figura 7.	Plantación de <i>Phaedranassa dubia</i> , ubicado en el jardín botánico Álvaro José Negret (Popayán – Cauca)	54
Figura 8.	Curva de calibración para Galantamina	65
Figura 9.	Cromatograma. Extracto metanólico; bulbo de <i>Phaedranassa dubia</i> sin patrón sitio de muestreo V	72
Figura 10.	Cromatograma. Extracto metanólico. Hojas <i>Phaedranassa dubia</i> , sitio de muestreo V	72
Figura 11.	Comparación, cromatogramas. Extracto metanólico, bulbo de <i>phaedranassa dubia</i> , sin patrón y con patrón de galantamina.	73
Figura 12.	Cromatograma extracto metanólico diluido de parte bulbosa de <i>Eucharis amazonica</i> (Amaryllidaceae)	75
Figura 13.	Cromatograma extracto metanólico, parte bulbosa de <i>Eucharis grandiflora</i> (Amaryllidaceae)	75
Figura 14.	Cromatograma extracto metanólico concentrado de <i>Caliphruria subedentata</i>	76

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Metodología para la caracterización física y química del suelo.	97
ANEXO 2. Parámetros cromatográficos.	100
ANEXO 3. Prueba de normalidad bajo el método de Shapiro - Wilk.	100
ANEXO 4. Evaluación de la linealidad.	102
ANEXO 5. Repetibilidad y precisión intermedia (% C.V.).	104
ANEXO 6. Determinación de los coeficientes de pearson	105

LISTA DE ABREVIATURAS

L-Tyr	L-Tirosina
%CV	Porcentaje de coeficiente de variación
%R	Porcentaje de recuperación
%SB	Porcentaje de saturación de bases.
AcOET	Acetato de Etilo
ARN	Acido Ribunocleico
ATP	Adenosin Trifosfato
CCD	Cromatografía de Capa Delgada
CG	Cromatografía de Gases
CV	Coeficiente de variación
DNA	Acido Desioxirribunocleico
DTPA	Ácido Etilen Diamino Penta Acético
E.M	Espectrometría de Masas
EIA	Inmuno Ensayo Enzimático
GAL	Galantamina
HPLC	Cromatografía Liquida de Alta Resolución
IR	Infrarrojo
mAU	Miliunidades arbitrarias
MeOH	Metanol
NADH	Nucleotido Adenosis Difosfato
ppm	Partes por millón
RIA	Radioinmunoensayo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SN	Sistema Nervioso

SNC	Sistema Nervioso Central
TEA	trietanol Amina
U.V	Ultravioleta
ZM	Sitio de muestreo

RESUMEN

La familia **Amaryllidaceae** es una de las familias de plantas más estudiadas. Se han creado expectativas debido a la marcada actividad biológica de algunos de sus metabolitos secundarios, en especial los alcaloides, algunos de los cuales han mostrado actividad antiviral, antitumoral y como inhibidor de la acetilcolinesterasa asociada al mal de Alzheimer.

Se hace indispensable el estudio de las condiciones naturales en las que viven para conocer los requerimientos nutricionales y ambientales en nuestra región que favorezcan la máxima producción del metabolito y garantizar su supervivencia.

Este trabajo permitió referenciar el contenido de galantamina en la especie *Phaedranassa dubia* (**Amaryllidaceae**) en los municipios de Rosas y la Sierra (Cauca); además de estandarizar el método cromatográfico para la cuantificación del contenido del metabolito, relacionando el contenido de galantamina en la especie *Phaedranassa dubia* con el contenido del compuesto en *Calyphurria subedentata*, *Eucharis amazonica* y *Eucharis grandiflora* y relacionar el contenido de macro nutrientes y micro nutrientes del suelo de colecta en donde se desarrolla la especie *Phaedranassa dubia* con su contenido de galantamina. Para tal efecto, se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, con detector ultravioleta a una longitud de 215nm; evaluando diferentes solventes como: Metanol, Agua, acetonitrilo, Tetrahidrofurano, buffer de fosfato como fase móvil en diferentes proporciones.

Para la especie *Phaedranassa dubia* el contenido total de galantamina fue menor que en las otras especies, encontrando mayor contenido total del metabolito en la especie *Eucharis amazonica*.

La metodología validada es específica y selectiva para Galantamina; lineal y precisa con un coeficiente de variación (C.V) menor a 5%; exacta brindando un porcentaje de recuperación para la metodología global (% R) equivalente a 93.12% y suficientemente sensible con límites de detección y cuantificación equivalentes a 0.05 y 0.186 mg/kg, respectivamente.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La síntesis Orgánica de GAL, presenta bajos rendimiento, la poca especificidad y las reacciones no deseadas impiden el desarrollo de esta estrategia para la síntesis de GAL, por lo que la principal fuente sigue siendo la extracción de las especies de la familia **Amaryllidaceae**.

Phaedranassa dubia pertenece a esta familia botánica y muestra la existencia de GAL; es una fuente¹ natural del metabolito y para implementar sistemas de cultivo y tecnificación, se deben conocer las condiciones nutricionales de esta especie, ya que no existen estudios sobre la especie en la región como de la fertilidad del suelo necesaria para la óptima producción de galantamina que justifiquen la obtención de extractos con fines terapéuticos como alternativa frente a los altos costos del tratamiento contra el mal de Alzheimer

El poco conocimiento de esta especie; la no referenciación geográfica en la región limitan el proceso investigativo y facilitan la destrucción de su hábitat por parte de la comunidad en la que se desarrolla. Nuestra región cuenta con plantas de la familia **Amaryllidaceae** productoras de GAL por lo que se requiere realizar estudios sobre el tema dado que la molécula de galantamina presenta frente a otras moléculas una mayor actividad y menor toxicidad²

La adaptación que presenta la especie *Phaedranassa dubia* al suelo, luz solar, humedad y a la altura las hace promisorias para diseñar estrategias de cultivo y extracción de Galantamina, lo que requiere implementar una metodología de cuantificación por HPLC en la región que facilite este proceso. Actualmente no se cuenta con esta herramienta.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

- Contribuir al estudio químico de *Phaedranassa dubia* (**Amaryllidaceae**) mediante técnicas analíticas de extracción, purificación y cuantificación cromatográfica y mediante la relación con algunas propiedades físicas y químicas de los suelos asociados.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Bioreferenciar la especie *Phaedranassa dubia* (**Amaryllidaceae**) en los municipios de Rosas y la Sierra del departamento del Cauca.
- Implementar y validar por HPLC una metodología para determinar y cuantificar el metabolito galantamina en extractos acuosos de la especie *Phaedranassa dubia* (**Amaryllidaceae**)
- Determinar y cuantificar la presencia de galantamina en *Phaedranassa dubia* (**Amaryllidaceae**) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Evaluar algunas propiedades físicas y químicas en los suelos asociados a las especie *Phaedranassa dubia* en los puntos referenciados de recolección de los municipios de Rosas y la Sierra (Cauca)

- Relacionar el contenido de Galantamina encontrado en la especie *Phaedranassa dubia*, con los macro y micro nutrientes del suelo asociado a la especie.
- Comparar el contenido de Galantamina de la especie *Phaedranassa dubia*, con el contenido del metabolito GAL en *Eucharis grandiflora*, *Eucharis amazonica*, *Caliphruria subedentata*; otras fuentes naturales de galantamina ya estudiadas.

3. FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 GENERALIDADES

La familia botánica **Amaryllidaceae** tiene una amplia distribución geográfica, con poblaciones especialmente importantes en sur África, Centro y Sur América, sin olvidar los géneros que tienen distribución restringida en la cuenca del Mediterráneo y el Cáucaso³. Colombia por su ubicación en el trópico ecuatorial presenta una gran diversidad botánica entre las que se incluye la familia **Amaryllidaceae**, la cual es bien reconocida por la marcada presencia de una gran cantidad de compuestos alcaloides biogénicamente relacionados.

Phaedranassa dubia es una planta de tipo silvestre perteneciente a la familia (**Amaryllidaceae**) abundante en Colombia, Costa Rica y Ecuador. En Costa Rica la especie *Phaedranassa dubia* presenta dos especies endémicas, mientras que en Ecuador presenta seis especies⁴. Se ha Reportado presencia de Galantamina en porcentajes de 7.4 % en plantas colectadas en 1964, (Perú) y analizadas⁵ en 1993 a través de técnicas de inmunoensayo enzimático (EIA). En la literatura especializada no se reportan más estudios sobre contenido de alcaloides o la presencia de Galantamina en esta especie⁵

Un importante aspecto de este trabajo con *P.dubia* es el de fortalecer una posibilidad de tecnificar la producción a nivel agroindustrial de Galantamina y evitar así una posible desaparición de estas especies, como lo muestra la distribución restringida de *Eucharis amazonica*, *Eucharis grandiflora* y *Caliphruria subdentata*, consideradas en vía de extinción⁶.

Como continuación de otros estudios de alcaloides en especie endémicas de la región Caucaña⁷, este trabajo busca estudiar fuentes promisorias de Galantamina,

Conociendo la información bibliográfica sobre la actividad farmacológica de este alcaloide como agente terapéutico en la enfermedad de Alzheimer.

Las técnicas analíticas son de gran importancia en el desarrollo investigativo de los productos naturales. RMN, IR, DC y EM facilitan la elucidación estructural de compuestos presentes en extractos de plantas de interés farmacológico, mientras que las técnicas: HPLC, CG y Colorimetría, facilitan la cuantificación de metabolitos secundarios. Dada la alta sensibilidad⁸ del detector ultravioleta y la rapidez⁹ de la HPLC en la determinación y cuantificación de GAL en otras especies de **Amaryllidaceae**; y aprovechando esta ventaja se desarrolló un método para la determinación y cuantificación de galantamina el estudio de la especie: *Phaedranassa dubia* (**Amaryllidaceae**).

La síntesis Orgánica de GAL, presenta bajos rendimiento, la poca especificidad y las reacciones no deseadas impiden el desarrollo de esta estrategia para la síntesis de GAL, por lo que la principal fuente sigue siendo la extracción de las especies de la familia **Amaryllidaceae**.

Por otro lado, se busca a futuro reducir los costos de tratamiento a los enfermos que padecen el mal de Alzheimer, dado que actualmente el costo del medicamento en la presentación de 10 capsulas de 8 mg de GAL es de setenta dólares y cada paciente requiere de una capsula diaria; esto dado que en nuestra región existen plantas de la familia **Amaryllidaceae** productoras de GAL, que frente a otras moléculas tiene mayor actividad y menor toxicidad

3.1.1 Los alcaloides

Los alcaloides son bases nitrogenadas, presentes en las plantas, que fundamentalmente producen respuestas fisiológicas al ser administradas a los animales. Son el resultado del metabolismo de aminoácidos; su principal función es reguladora y de protección a la planta contra insectos y parásitos.

Son compuestos, química y biológicamente heterogéneos, y constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más amplio y complejo¹⁰.

En general no existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado, derivados generalmente de aminoácidos, mas o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importante a dosis bajas y responden a reacciones comunes de precipitación¹¹.

3.1.2 Clasificación de los alcaloides

Habitualmente los alcaloides se han clasificado en función de su estructura, distinguiéndose principalmente los compuestos heterocíclicos de los no heterocíclicos, actualmente existen varias formas de clasificarlos:

- De acuerdo a sus propiedades farmacológicas.
- De acuerdo a su distribución botánica.
- De acuerdo a su origen biosintético.

En cuanto a su origen biosintético, se pueden agrupar todos los alcaloides naturales conocidos por ser originarios por un restringido numero de aminoácidos o de precursores biogénicos. Esta aproximación biogénica es indispensable como ayuda quimiotaxonómica y está aplicada especialmente para la química estructural en asignaciones de posiciones oxigenadas y para la síntesis biomimética (imitar el proceso natural) de sustancias¹².

Se pueden distinguir:

Alcaloides alifáticos

Derivados de la ornitina (pirrolidinas, tropánicos, pirrolizidínicos)

Derivados de la lisina (piperidinas, quinolizidínicos).

Alcaloides aromáticos

Derivados del ácido nicotínico (piridinas)

Derivados de fenil alanina y tirosina (isoquinoleinas)

Derivados del triptófano (indólicos, quinoleinas)

Derivados de la histidina (imidazoles)

Alcaloides de origen diverso

Alcaloides terpénicos y esferoidales

Alcaloides diversos (purinas, macro ciclos etc.)¹²

3.2. GENERALIDADES DE LOS ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE

Desde hace mucho tiempo varias especies de la familia **Amaryllidaceae** han sido utilizadas por poblaciones indígenas en preparaciones medicinales. Los efectos fisiológicos experimentados por el consumo de algunos extractos son muchísimos, entre los que se encuentran la inducción del parto, estimulación, alucinación y aún como agente suicida¹³

Algunos pueblos indígenas, en el norte de México y en la Región Andina conservan la costumbre desde los tiempos prehispánicos de masticar hierbas con el fin de aliviar el cansancio, reducido por grandes caminatas o danzas ceremoniales. Los nativos de las selvas suramericanas envenenaban las flechas destinadas a la cacería con curare que se prepara con varias plantas ricas en alcaloides tóxicos. Las primeras plantas que el hombre uso para su salud contienen alcaloides y su uso se ha transmitido de generación en generación por comunicación oral

A menudo los extractos de corteza, raíces, hojas, frutos y bayas de las plantas contienen bases que contienen nitrógeno llamadas alcaloides. Los alcaloides a

diferencia de la mayoría de los grupos de productos naturales, son compuestos química y biológicamente heterogéneos, y constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más amplio y complejo¹⁴.

La galantamina, alcaloide derivado del dibenzofurano podría considerarse como el de mayor interés en la familia botánica desde el punto de vista farmacológico, ya que posee una marcada actividad anti colinesterásica, usándose en el tratamiento de la miastenia gravis, miopatías, trastornos del Sistema Nervioso Central y lesiones del Sistema Nervioso, entre otras patologías¹⁵.

Farmacológicamente los alcaloides son un grupo muy importante porque incluye sustancias activas que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos; por ejemplo al ser administrados a los animales la mayoría de los alcaloides producen efectos fisiológicos sorprendentes y estos varían de un alcaloide a otro.

Dentro del grupo de las monocotiledóneas, los alcaloides se concentran fundamentalmente en dos familias, **Amaryllidaceae** y **Liliaceae**, pertenecientes al superorden **Liliiflorae**, aunque también se ha encontrado este tipo de compuestos en las familias **Poaceae**, **Palmaceae**, **Araceae** y **Orchidaceae**.

En las dicotiledóneas son de destacar, por el elevado número de especies alcaloídicas, las siguientes familias: **Apocynaceae**, **Loganiaceae**, **Lauraceae**, **Fabaceae**, **Caesalpiniceae**, **Mimosaceae**, **Menispermaceae**, **Rutaceae**, **Papaveraceae**, **Ranunculaceae**, **Rubiaceae** y **Solanaceae**.

Se observa una incidencia de alcaloides en las familias más primitivas, tales como **Ranunculaceae**, **Menispermaceae** y **Papaveraceae**, mientras que en las familias intermedias estos compuestos se presentan en menor proporción, distribuyéndose de un modo irregular. Finalmente, en las familias más evolucionadas, como son **Loganiaceae**, **Apocynaceae**, **Rubiaceae** y **Solanaceae**, los alcaloides presentan de nuevo una elevada incidencia.

Las especies que pertenecen a la familia **Amaryllidaceae** son particularmente ricas en alcaloides de una gran diversidad estructural todos ellos derivados de fenilalanina y tirosina a través de un intermediario común: la O-metilnorbelladina, la cual mediante tres modos distintos de acoplamiento fenol oxidativa, origina esqueletos básicos de estos, los cuales, por sustituciones y modificaciones Estructurales de tipo enzimático, se producen los alcaloides de la familia **Amaryllidaceae**. Sobre la base de estos datos y al sistema heterocíclico que presentan, se pueden distinguir los siguientes tipos de esqueletos (Tabla No 1.)

Tabla No 1. Clasificación de alcaloides de Amaryllidaceae según los tipos estructurales.

GRUPO ESTRUCTURAL	ESQUELETO TIPO	TIPO DE ACOPLAMIENTO
N-bencil-N-fenetilamina	Norbelladina	Sin acoplamiento
Pirrolofenantridina	Licorina	<i>orto-para'</i>
2-benzopirano[3,4-g]indol	Licorerina	<i>orto-para'</i>
5,10b-etanofenantridina	Hemantamina/Crinina	<i>para-para'</i>
2-benzopirano[3,4-c]indol	Pretazetina	<i>para-para'</i>
Fenantridina	Narciclasina	<i>para-para'</i>
5,11-metanomorfantridina	Montanina	<i>para-para'</i>
Dinbenzofurano	Galantamina	<i>para-orto'</i>

La numeración del esqueleto carbonado no sigue la norma IUPAC para el respectivo sistema heterocíclico, desde 1984 se acepta internacionalmente la propuesta de numeración basada en la biogénesis de estos metabolitos¹⁶

3.2.1 Galantamina. Alcaloide de la familia Amaryllidaceae

Este grupo estructural de alcaloides derivados de dibenzofurano con uno de los anillos saturado total o parcialmente, podría considerarse como el de mayor

interés desde el punto de vista farmacológico, pues está representado por la Galantamina (Figura No 1), alcaloide que posee una actividad anticolinesterásica, usándose en el tratamiento de la miastenia, miopatías, trastornos del sistema nervioso central, lesiones del sistema nervioso periférico.

Los extractos de las especies *Pancretium maritimum*, *Leucojum aestivum*, y *Narcissus tazetta ssp. tazetta* (**Amaryllidaceae**) presentan alcaloides tipo Licorina, Crinina, Tazetina y Galantamina, evaluado in vitro presentando inhibición en el crecimiento de *Plasmodium falciparum*¹⁷.

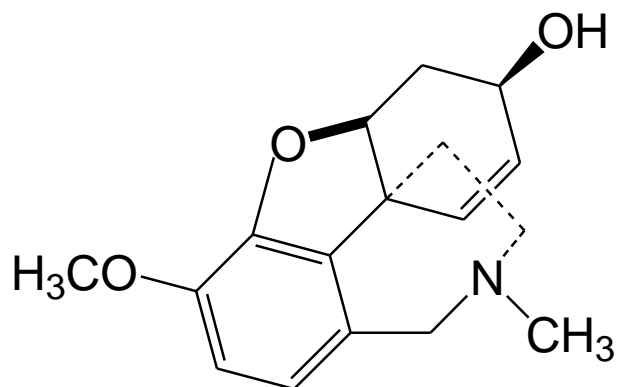


Figura No 1. Estructura química. Galantamina

La Galantamina, alcaloide aislado de un gran número de especies de la familia **Amaryllidaceae**, es uno de los compuestos más interesantes por sus propiedades anticolinesteras asociada con la demencia de Alzheimer¹⁸ y desordenes relacionados. Se han registrado dos medicamentos: uno de ellos, Nivalin[®], es el hidrobromuro de Galantamina inhibidor de la colinesterasa con una toxicidad moderada, se encuentra en las farmacopeas china, rusa, y en occidente.

Otra forma comercializada de este alcaloide, Energix[®], es un preparado a base de hidrobromuro de Galantamina, creatina, fitina y jalea real comercializada en países del Este. En una serie de ensayos clínicos se observó que la administración prolongada de este medicamento no producía efectos colaterales.

El Reminyl® que realiza la acción de la acetilcolina afectando los receptores nicotínicos en el cerebro presenta efectos beneficiosos que pueden disminuir mientras que el proceso de la enfermedad avanza.

3.2.2 Biosíntesis de alcaloides de la familia Amaryllidaceae

Los alcaloides de **Amaryllidaceae** parecen tener un precursor común, la norbelladina, que al igual que sus derivados tienen un esqueleto del tipo C₆-C₁-N-C₂-C₆. La unidad C₆-C₁ es aportada por la fenilalanina (L-Phe), mientras que la unidad C₂-C₆-N es aportada por la L-Tirosina (L-Tyr) ¹⁹, ver figura 2.

El proceso biosintético se inicia con la desaminación oxidativa antiperiplanar de la L-Phe por la acción de la enzima PAL (fenilalanina amonio-liasa) dando lugar al ácido trans-cinámico²⁰.

La unidad C₆-C₁ que lleva al anillo A de estos alcaloides no deriva de tirosina, el cual se hidroxila en posición para, dando lugar al ácido p-cúmarico. Este último experimenta un proceso oxidativo en orto, con respecto al grupo hidroxilo, formándose el ácido caféico. El cual experimenta una reacción de oxidación, con la subsiguiente pérdida del ácido glioxídico para dar lugar al aldehído protocatéquico, el cual por mutilación origina la isovainillina, ambos precursores de la unidad C₆-C₁. Ahora la L-Tyr por su parte se incorpora como tiramina, previa descarboxilación, debida a la acción de la enzima Tirosin descarboxilasa (Tyr) La condensación (reacción de Mannich) del aldehído protocatéquico o isovanillina y la tiramina da lugar a una base de Schiff, que por reducción origina el precursor norbelladina o bien O-metilnorbelladina.

Los pasos posteriores para cada grupo de alcaloides de la especie Amaryllidaceae, se origina en función del tipo de acoplamiento fenolito. Así, el acoplamiento *p-o'* da lugar a los alcaloides tipo galantamina.

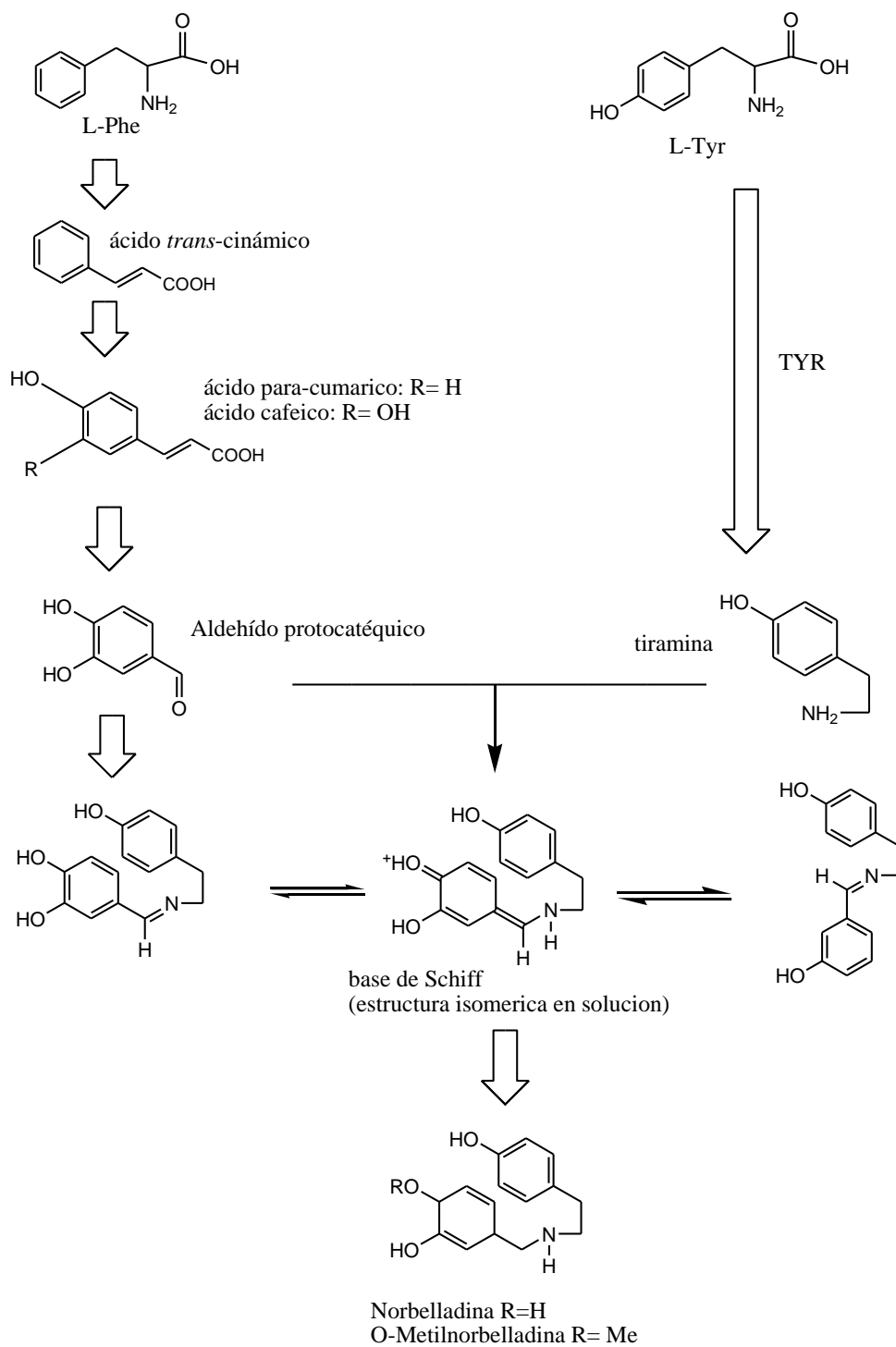


Figura 2. Biosíntesis de precursores de alcaloides de la familia Amaryllidaceae.

3.3 PROCESOS INDUSTRIALES DE EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

Los procesos industriales para la obtención de alcaloides comprenden la extracción de la droga vegetal, seca y molida y la purificación del extracto obtenido. La extracción abarca la obtención del extracto bruto, que contiene, además de la totalidad de los alcaloides presentes en la planta, impurezas, entre las cuales podemos citar: grasas y ceras vegetales, resinas, colorantes, taninos y sales de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico. Para la purificación del extracto bruto es necesario el uso de solventes inmiscibles y variaciones de pH, lo que conlleva a la separación de la fracción alcaloidal bruta, también llamada de “base libre”. El aislamiento del alcaloide de su base libre generalmente ocurre por cristalizaciones sucesivas.

En la actualidad, el procedimiento de extracción de alcaloides a escala industrial en muestras vegetales se realiza por medio de cuatro procesos:

Extracción con solventes no miscibles con el agua

Extracción con solventes miscibles con el agua

Extracción con agua acidulada

Extracción con soluciones de sales de reacción ácida²¹.

3.4 GENERO *Phaedranassa*

Aunque es muy poca la información bibliográfica sobre este género, se conocen seis especies endémicas del Ecuador de las cuales *Phaedranassa schizantha* y *P. tunguraguae* están restringidas a la región andina del norte del Ecuador, las cuales se encuentran en peligro de extinción por la degradación de su ecosistema, la deforestación y la adecuación de tierras para cultivo ²². En Colombia y en Costa Rica se registran dos especies de este género por debajo de los 2000 m.s.n.m.

3.5 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR

La prueba Fitoquímica preliminar es una prueba química de caracterización; consiste en una reacción química que produce la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un producto o de un complejo, que origina una manifestación de un cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas²³, un ejemplo de este tipo de pruebas esta relacionado con los alcaloides, los cuales presentan reacciones, coloridas con ciertos reactivos como:

Reactivo de Mayer, forma precipitado color blanco.

Reactivo de Wagner, forma precipitado color marrón.

Reactivo de Dragendorff, forma un precipitado naranja-marrón.

La gran mayoría de estas pruebas están asociadas a la interacción con el nitrógeno de este tipo de compuestos.

3.6 CLASIFICACION DE LOS METODOS CROMATOGRAFICOS.

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos diferentes. El primero de ellos se basa en la forma en que la fase estacionaria y móvil se pone en contacto. En la cromatografía de columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel, en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad.

Una clasificación fundamental de los métodos cromatográficos se muestra en la tabla 2. Relaciona las tres clases generales de cromatografía: Cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos²⁴.

Tabla 2. Clasificación de métodos cromatográficos en columna

Clasificación General	Método Específico	Fase Estacionaria	Tipo de Equilibrio
Cromatografía líquida (CL) (fase móvil: Líquida)	Líquido-Líquido, o partición	Líquido adsorbido sobre un sólido	Partición entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida	Especies orgánicas unidas a una superficie sólida	Partición entre líquido y superficie unida
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en intersticios de un sólido polimérico	Partición/tamizado
Cromatografía gaseosa (CG) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Partición entre gas y líquido
	Gas-fase unida	Especies orgánicas unidas a una superficie sólida	Partición entre un líquido y superficie unida
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
cromatografía fluida supercrítica (CFS) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas unidas a una superficie sólida	

3.6.1 Cromatografía líquida de alta resolución

Aunque existen diferentes técnicas cromatográficas hoy en día, prácticamente todos los laboratorios que efectúan análisis de constituyentes de plantas poseen un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia. Existen varias razones para esto, entre las cuales podemos citar: el precio de los equipos tiende a disminuir cada día más, lo cual permite su adquisición; permite realizar con ventajas todas las separaciones que se llevan a cabo por cromatografía en capa fina; el hecho de poder realizar los análisis cuantitativos de forma mucho más eficaz y segura. El perfeccionamiento de los detectores específicos para determinadas clases de sustancias permite un análisis selectivo de ellas, incluso cuando se encuentran en mezclas complejas²¹.

La utilización de la cromatografía de alta eficiencia para el análisis de los constituyentes de las plantas ha aumentado en la misma proporción que el desarrollo de los nuevos detectores y de nuevas fases estacionarias²⁴. Por esta razón para analizar extractos naturales sin poner en riesgo la eficiencia de la columna cromatográfica será necesario realizar una purificación previa a través del uso de agentes clarificantes (carbón activado, alúmina, tierra de diatomeas, etc)

Esta purificación puede comprender también una extracción selectiva de la sustancia que va a ser analizada (p.ej. una extracción ácido base) y/o la utilización de otras técnicas cromatográficas. A través de este previo tratamiento se puede extraer en cierta proporción la sustancia que se quiere analizar, dando falsos resultados. Sin embargo, el uso de pre-columnas colocadas estratégicamente entre el inyector y la columna, permite la inyección directa de los fitocomplejos, aumentando paralelamente la vida media de la columna cromatográfica.

Para el análisis de productos fitoterapéuticos, la selección de detector varía de acuerdo con las características de las estructuras que están siendo analizadas. El detector más utilizado es sin duda el que mide la absorción en la región UV-visible, puesto que gran parte de las sustancias a ser analizadas absorben en esta región. Los detectores UV-visible por ejemplo, fueron utilizados inicialmente en onda fija, lo cual limitaba su versatilidad. Hoy en día es posible el empleo de detectores de longitud de onda variable o de arreglo de diodos, pudiéndose obtener además el espectro de absorción molecular de la sustancia. La comparación de estos espectros con los espectros que se encuentran en un banco de datos, suministra valiosas informaciones sobre la clase química de las sustancias presentes en el extracto²¹

Además de las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) que buscan las líneas celulares más productivas de la planta en la producción de alcaloides de la familia **Amaryllidaceae**; la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) también ha sido aplicada al estudio de especies de esta familia dada el comportamiento físico químico de los alcaloides presentes en ellas. Por ejemplo los alcaloides de la especie *Narcissus confusus* fueron analizados a través de la cromatografía líquida de alta resolución encontrándose: Galantamina, N-formylgalantamina, Tazetina, formylnorgalantamina y hemantamina. El detector empleado en estos análisis fue el de UV-visible a una longitud de onda en el rango de 210nm –280nm²⁵.

Dada la alta sensibilidad y rapidez de la técnica de HPLC, en la determinación y cuantificación de GAL en otras especies de **Amaryllidaceae**; en el presente estudio se utilizó esta técnica analítica para cuantificar el contenido del metabolito.

3.7 MACRONUTRIENTES Y MICRONUTRIENTES

3.7.1 Macronutrientes

Son nutrientes que la planta necesita en altas cantidades para favorecer su desarrollo, ellos son: el nitrógeno, el fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre.

Nitrógeno. Es uno de los cuatro elementos que conforman la mayor parte de la biomasa en las plantas y después del fósforo, es el que más limita la producción agrícola en suelos. En la capa arable, se encuentra casi en su totalidad en forma orgánica. Hace parte de un gran número de compuestos como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, alcaloides y hormonas. En la biosíntesis de metabolitos vegetales el nitrógeno a través de las rutas de acetogeninas, ácido mevalónico y ácido shikímico, dan origen a los alcaloides²⁶ entre otros metabolitos.

Las plantas, como todos los organismos, requieren nitrógeno para su crecimiento y su reproducción. El nitrógeno es un constituyente de proteínas, enzimas y de muchos productos metabólicos intermedios. Es el elemento mineral más común en el reino vegetal.

Las plantas utilizan o absorben el nitrógeno en dos estados a saber:

- Estado amoniacal (NH_4^+)
- Estado nitrato (NO_3^-), la forma de ión nitrito (NO_2^-) puede ser tóxica en pequeñas cantidades para la mayoría de las plantas.

Las funciones generales del nitrógeno en la planta son:

- Forma parte esencial del proceso de fotosíntesis generando el color verde a las plantas.

- Promover su crecimiento rápido.
- Aumenta el contenido de proteínas en los productos de las cosechas alimenticias.
- Es nutrimento de los microorganismos del suelo que actúan en la descomposición de la materia orgánica.
- El exceso de nitrógeno favorece excesivamente el crecimiento vegetativo, disminuye la absorción de potasio y retarda la maduración.
- Por ser un elemento de alta movilidad en la planta, sus síntomas visuales de deficiencia se observan en hojas viejas, con las siguientes características: Amarillamiento y caída de las hojas más viejas; reducción en el crecimiento de la parte aérea y raíces; tallos cortos y delgados; caída prematura de hojas y supresión del crecimiento lateral; marcollamiento pobre en cereales como trigo, cebada, avena, arroz, etc²⁷.

Fósforo Elemento esencial para las plantas, hace parte de estructuras como ácidos nucleicos: DNA y ARN. Se encuentra en el suelo como ortofosfato: H_2PO_4^- , derivado del ácido fosfórico H_3PO_4 .

El fósforo hace parte de estructuras que almacenan energía²⁸ como ATP, el cuál proviene de la fotosíntesis (fosforilación) y producción de intermediarios metabólicos importantes como la fosfoenol piruvato, que junto con fragmentos carbonados del ciclo de Krebs en la biogénesis del ácido mevalónico, dan origen a la producción de alcaloides²⁶.

En general la disponibilidad de fósforo, como hemos visto, disminuye con la acidez del suelo. Existen evidencias de que un exceso de aluminio en solución, en suelos fuertemente ácidos, causa deficiencia de fósforo en la planta por la formación de compuestos insolubles o por inactivación del fósforo absorbido por la raíz.

A medida que el pH aumenta ($\text{pH} > 5.5$), el aluminio es precipitado en el suelo como $\text{Al}(\text{OH})_3$ y no ocurre la inactivación del fósforo en la planta²⁷.

Las formas aprovechables de fósforo en los suelos agrícolas son:

- Ión mono fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$)
- Ión di fosfato (HPO_4^{2-})

Las funciones generales del fósforo en la planta son:

- Estimula el desarrollo de las raíces y, por consiguiente, el crecimiento aéreo de la planta.
- Acelera la maduración
- Es indispensable en la formación de semillas y en la transmisión de factores hereditarios.
- Participa en reacciones de fosforilación (transporte de energía), fotosíntesis, respiración y en la síntesis de carbohidratos.

Por ser un elemento móvil en la planta, sus síntomas visuales de deficiencia se manifiestan generalmente en hojas viejas con las siguientes características: Coloración roja o púrpura en las hojas más viejas de la planta; las raíces detienen su crecimiento y poseen poca ramificación; la madurez de la planta se retarda; Los cultivos más susceptibles a deficiencias de fósforo son: maíz, papa, arroz, trigo, cebada y hortalizas de hoja²⁷.

Potasio. Es uno de los principales elementos consumidos por las plantas, junto con el nitrógeno y el calcio; es indispensable para la resistencia de las enfermedades y para la salud vegetal, se encuentra en el suelo de forma inorgánica, cumple funciones de regulación, neutralización. Promueve o favorece el incremento en las proteínas de los granos, aceites esenciales.

La forma disponible del potasio en el suelo es el estado iónico K^+ , el cual es fácilmente almacenado en la fase intercambiable.

En Colombia el potasio no es un elemento limitante, la mayoría de las pruebas de fertilidad han demostrado que aunque las plantas extraen grandes cantidades de potasio, la fertilización con fuentes de potasio ha tenido moderada a baja respuesta.

Las funciones generales del potasio en la planta parecen ser mas bien de tipo catalítico, como las mencionadas a continuación:

- Le imparte a la planta vigor y resistencia a las enfermedades. Ofrece un carácter de turgencia a las hojas.
- Ayuda a la planta a la producción de proteína.
- Es esencial en la producción de azúcares, Almidones y aceites.
- Mejora la calidad de las cosechas.
- Controla y regula la actividad de varios elementos minerales, especialmente, nitrógeno.
- Neutraliza fisiológicamente ácidos orgánicos.
- El exceso de potasio disminuye la absorción de nitrógeno y deprime la producción agrícola.

Por ser un elemento muy móvil en la planta, sus síntomas visuales de deficiencia se manifiestan generalmente en hojas medias y viejas de la planta con las siguientes características:

- Secamiento y quemazón de puntas y bordes de las hojas, progresando de las márgenes hacia el centro de las hojas. Generalmente, la vena central de la hoja permanece verde.
- En estados avanzados de deficiencia se observa quemazón marginal de hojas y muerte de tejidos.

- Los cultivos más susceptibles a las deficiencias de potasio son los que tiene un alto índice de producción de azúcares, almidones y aceites como: papa, tomate, banano, caña de azúcar, tabaco, palma africana, trébol, alfalfa, cebolla, maíz, yuca, arroz, café, cacao y frutales (manzano y pera)²⁷

Calcio y Magnesio Se encuentran en forma iónica Ca^{2+} y Mg^{2+} . En el tejido vegetal se encuentran como iones libre, pero mas frecuentemente como sulfatos, carbonatos, fosfatos, oxalatos de calcio en las vacuolas de las células foliares y en la semillas como sales de ácidos fítico o fitína. La función estructural central del calcio es dar firmeza, dureza y estabilidad a la pared celular dando resistencia a la planta del ataque de insectos; actúa como modulador de varias enzimas mediante procesos de fosforilación desfosforilación; regula el contenido de agua, participa en la división celular.

El magnesio hace parte de la molécula de clorofila, participando en el proceso de la fotosíntesis, interviene en el metabolismo energético, participa en la unión y estabilización de las subunidades del Ribosoma, en la biosíntesis de proteínas y en la transcripción del mensaje genético.

Azufre. El azufre generalmente se absorbe por las raíces como sulfato. Es necesario para el metabolismo del nitrógeno y del fósforo. Es constituyente de la coenzima A, importante en la biogénesis de metabolitos secundarios, a través de la ruta del ácido mevalónico en la producción de alcaloides²².

Las plantas con deficiencia de este nutriente presentan un bajo crecimiento, se hacen duras y quebradizas; se produce clorosis generalizada.

3.7.2 Micronutrientes

De los 16 nutrientes esenciales para las plantas, seis de ellos son micronutrientes. Estos elementos son tan importantes para las plantas como los nutrientes primarios y secundarios, pero se requieren en cantidades bajas²⁸. Los micronutrientes son: **Fe, Zn, Cu, Mn, B y Mo.**

El hierro (Fe), participa en el sistema enzimático encargado de la síntesis de la clorofila regulando la síntesis de clorofila ácido delta aminolevulínico, precursor de las porfirinas; actúa como componente integral de la ferredoxina y participa en la reducción de nitratos, sulfatos y en la asimilación de N₂.

Entre los principales factores que determinan la disponibilidad de Fe para las plantas figuran:

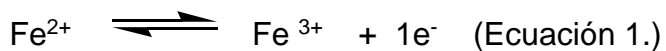
- Cantidad total de Fe presente
- PH del suelo
- Aireación
- Concentración de Mn, Cu y Zn.
- Tensión de O₂.

El contenido de Fe soluble en la solución del suelo es muy bajo; las formas iónicas más comunes son Fe³⁺, Fe (OH)₂⁺, Fe²⁺, Fe (OH)₃⁻, Fe (OH)₄⁻. En suelos bien aireados se favorece la conversión de Fe²⁺ a Fe³⁺ y en suelos inundados se favorece el proceso contrario aumentando en este caso la disponibilidad de Fe para la planta, ambos procesos son el general desarrollados por microorganismos.

Los rangos del contenido de Fe en plantas varía entre 10 y 1000 ppm de materia seca. En general 50 ppm se acepta como un factor crítico para varias cosechas, por debajo de este nivel se observan varios síntomas de deficiencia.

En la mayoría de las plantas el Fe se halla como Fe³⁺. En fosfoproteínas férricas aunque tanto el Fe²⁺ como el Fe³⁺, participan en procesos redox en la planta²⁰.

La alta afinidad de Fe para formar complejos con varios ligandos (por ejemplo, ácidos orgánicos y fosfatos) y la facilidad de cambio de valencia son las dos características más importantes que forman parte de los numerosos efectos fisiológicos de este nutriente.



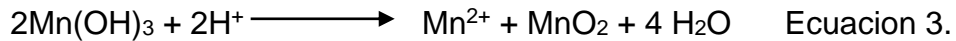
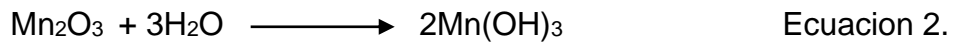
Los dos principales grupos de proteínas que contienen Fe son las proteínas HEMO y las proteínas Fe-S. Las proteínas HEMO se caracterizan por la presencia de un complejo Fe hemo porfirina, la cual actúa, por ejemplo, como un grupo prostético de citocromos que facilitan el transporte de los electrones en la respiración.

El manganeso (Mn), participa en la fotólisis del agua; en la activación de arginasa, una enzima del ciclo de la urea; en la activación de varias enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, ciclo de ácidos tricarbóxicos y fosforilación oxidativa; participa con superóxido dismutasa, enzima la cual tiene como propósito destruir los peligrosos y reactivos superóxidos muy tóxicos para las membranas celulares, en esta función participa junto con otros cationes (Fe, Cu, Zn).

En la mayor parte de los suelos el contenido de este micro nutriente es alto, puede variar desde 20 hasta 6000 ppm, pero comúnmente se encuentra valores entre 250 y 800 ppm de materia seca.

El manganeso participa en algunos procesos redox en el suelo y debido a su alto potencial redox, se puede encontrar en tres estados de oxidación en el suelo permitiendo diferentes procesos:

1. Como ión divalente Mn^{2+} soluble o adsorbido en los complejos de intercambio, de esta manera es asimilado por las plantas.
2. Trivalente. Generalmente aparece como óxido inestable Mn_2O_3 muy reactivo y se descompone según las siguientes reacciones:



3. El Mn tetravalente generalmente como MnO_2 que es una forma muy estable.

Los papeles más importantes y exclusivos del Mn en plantas verdes son la reacción de desdoblamiento de la molécula de agua y el sistema de evolución de oxígeno de la fotosíntesis que ocurre en los cloroplastos y que se denomina reacción de Hill. Como consecuencia de esta función clave en la reacción de desdoblamiento del agua, la deficiencia de Mn afecta principalmente la fotosíntesis y la evolución del oxígeno (Figura 4.)

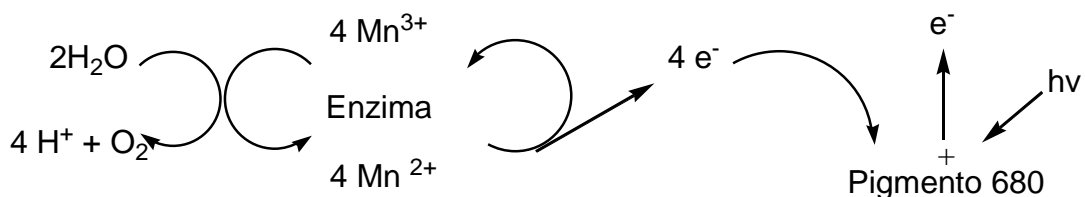


Figura 4. Actividad del Mn en el desdoblamiento de la molécula de H₂O

La prevalencia de uno o de varios estados de oxidación del Mn depende en gran medida del pH como del estado redox en la que reencuentra el suelo. Si el PH está por debajo de 6.5 y en condiciones reductoras, se favorece la reducción del Mn^{4+} a la forma Mn^{2+} , según la siguiente reacción:



A valores altos de pH, la vía que se favorece es la formación de la especie Mn^{4+} y se disminuye la disponibilidad. Igual ocurre en suelos con altos contenido en materia orgánica (MO), debido a la formación de complejos entre la materia orgánica y el manganeso.

El cobre (Cu) se une a una proteína, palstocianína, la cual participa²⁸ en el transporte de electrones entre fotosistema II y el fotosistema I en el proceso de la fotosíntesis. Hace parte del complejo de enzimático de la fenolasa que oxida fenoles y se relaciona con la síntesis de lignina, puesto que genera algunos de sus precursores. Hace parte de la citocromooxidasa, que contiene Cu y Fe y cambia su estado de oxidación de Cu^{2+} a Cu^{1+} .

El contenido de cobre en la mayor parte de los suelos varía entre 5 y 60 ppm de materia seca, los suelos arenosos, de textura gruesa, lo mismo que suelos ácidos derivados de rocas ígneas, tienen bajos niveles (1 a 30 ppm). La capa arable del horizonte A posee mayor contenido que el horizonte B.

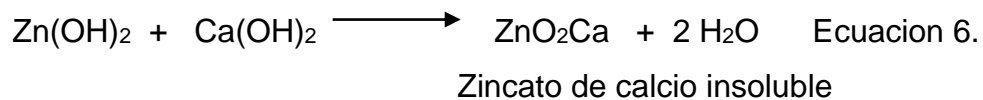
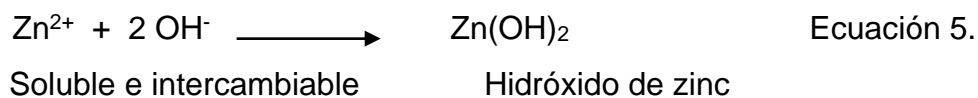
El Zinc (Zn) se requiere para la actividad de al menos 80 sistemas enzimáticos, normalmente formando parte de la estructura de enzimas. Ejemplos NADH deshidrogenasa; Alcohol Deshidrogenasa; Anhidrasa carbónica; Aldolasas; Peptidasas. Participa en la estabilidad del Ribosoma y en la actividad del RNA polimerasa que lo convierte en un elemento regulador de la expresión genética.

Se requiere para la síntesis del aminoácido triptófano, que es uno de los precursores de alcaloides a través de la vía del ácido shikímico de la biosíntesis de metabolitos vegetales²⁶.

El Zn posee una movilidad muy limitada en los suelos. Se pone en contacto con las raíces por flujo de masa y difusión (este último es el más común).

Los principales factores que determinan la disponibilidad de Zn para la planta son:

1. pH. La disponibilidad de este elemento, como en el caso de otros cationes, es mayor a valores ácidos, disminuye con el aumento en el pH hasta llegar a valores mínimos entre 5.5 y 7.0. a pH alcalinos y mediante el encalado, el Zn se insolubiliza:



2. Adsorción. Aproximadamente el 75% de Zn se adsorbe inmediatamente después de su aplicación al suelo, esta absorción se completa después de 24 horas, pero la disponibilidad y grado de adsorción dependen de los distintos factores que intervienen en el proceso de fijación y la forma química como se aplique el elemento al suelo²⁷.
3. Precipitación por el ión fosfato. Con aplicaciones de abonos fosfatados se forman fosfatos de Zn complejos e insolubles que conducen a disminuir la disponibilidad de este elemento.

El Boro (B) participa en el ciclo de las pentosas. Formando un complejo con el 6 - fosfogluconato e impidiendo que este sustrato penetre a la vía de las pentosas y a la síntesis de hemicelulosa y otros materiales relacionados con la pared celular. Participa en el metabolismo de carbohidratos y en la respiración celular. Participa en la síntesis del ARN. Participa en la síntesis de hormonas del crecimiento, es esencial en la formación de los granos de polen, en el crecimiento del tubo polínico y para la formación de semillas, paredes celulares y fructificación. Parece que una de las principales funciones del boro radica en su participación en el metabolismo de auxinas y compuestos fenólicos mediante la activación de las enzimas auxina oxidasa y beta-glucosidasa²⁸.

Las funciones generales de del boro en la planta son:

- Importante en el desarrollo de meristemos de crecimiento.
- Está relacionado con la utilización del calcio dentro de la planta.
- Mejora la calidad de frutos y granos.
- Importante en los procesos de floración y fructificación, pues participa en la formación del polen²⁹.

4. METODOLOGÍA

4.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS

En el desarrollo de los procesos enmarcados en la metodología propuesta se utilizaron reactivos y solventes de grado reactivo para la extracción y análisis de las muestras de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y de sus suelos asociados, como grado cromatográfico para las determinaciones de galantamina en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la unidad de análisis industriales laboratorio de aguas.

Reactivos

Ácido acético 2.5%

Hidróxido de amonio 50%

Solventes

Metanol

Éter etílico

Cloroformo

Acetonitrilo

Tetrahidrofurano (THF)

Acetato de etilo

Equipos

Rota evaporador HEIDOLPH LABOROTA 4001

Espectrofotómetro ultravioleta visible GENESIS 6

Cromatógrafo de líquidos HEWLETT PACKARD 1100, desgasificador G 1322^a, bomba cuaternaria G 1311^a, detector UV-VIS G1314A, columna Altech C18; 3 μ m x 4.0 x 250mm.

Equipo de digestión BUCHI B-426 y destilación BUCHI K-314

pH-metro 744 Metrohm

Centrifugadora Hermle Labortechnik Z200A 6000rpm

Ultrasonido Branson 2510R-MTH

Lampara ultravioleta UV GL-58 handheld 254/365 nm

Dispositivo de posicionamiento global GPS Garmin 76S

Equipo de Absorción Atómica.

4.2 UBICACIÓN GEOGRAFICA

Las muestras vegetales a analizar se recolectaron entre los Municipios de Rosas y la Sierra, para un total de seis puntos de recolección ubicados en las siguientes veredas: (a) el Marqués (km-6 antes de Rosas); (b) La Violeta (km-1 antes de Rosas); (c) Loma Grande (km-3 antes de Rosas); (d) el Porvenir (km-2 después de Rosas) (e) Santa Rosa (km-8 antes de la Sierra) (f) la Sierra (Cabecera Municipal) previa verificación del investigador e identificación Botánica.

4.3 COLECCIÓN Y CLASIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL

Phaedranassa dubia (Figura 5.) fue colectada en los municipios de Rosas y la Sierra, departamentos del Cauca. Esta especie fue identificada por el especialista Bernardo Ramírez del Herbario de la Universidad del Cauca: ejemplar de herbario clave: 17-169.



Figura 5. Flor de *Phaedranassa dubia*

4.4 TOMA DE MUESTRA

Una vez realizada la identificación botánica de la especie, se ubicaron las zonas de muestreo; se determinó su ubicación geográfica, temperatura promedio; se tomó aproximadamente 1kg de aquellas plantas en estado de floración que presentaban un peso de bulbo entre 50 -100 g, en buenas condiciones físicas, descartando aquellas con mancha y señales de ataque²¹ por insectos y hongos; se almacenaron en bolsas plásticas evitando la pérdida de las flores u hojas.

El material vegetal fresco se pesó y se secó a 40°C durante un periodo de 3 a 5 días, separando bulbo de parte aérea; se pulverizaron y se almacenaron en bolsas plásticas previamente marcadas para su posterior análisis.

La toma de muestras de suelos asociados a la especie *Phaedranassa dubia* (**Amaryllidaceae**) fue compuesta siguiendo técnicas³⁰ ya estandarizadas y que corresponden al horizonte A de las zonas de muestreo de los sitios de colecta.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio Química de Compuestos Bioactivos, la unidad de Análisis Industrial (Laboratorio de Aguas) y en el Laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca.

La recolección de la muestra de suelo, como del material vegetal, se hizo teniendo en cuenta aspectos tales como: el relieve, vegetación, tipos de cultivo, manejo del suelo, peso de los bulbos, etapa en que se encuentra la planta.

El muestreo por criterio, tiene en cuenta la información disponible sobre la población objeto de muestreo (sí la planta esta florecida; peso del bulbo; asociación con otras plantas y ubicación). Este método de muestreo aunque permite obtener menor numero de muestras, limita el número de variables independientes las cuales pueden influir en los resultados del análisis agroquímico y analítico propuestos.

Las muestras de suelo seleccionadas, fueron aquellas asociadas a la planta colectada, extrayendo los primeros 20 cm. de profundidad de aproximadamente 10 a 15 submuestras de suelo con una pala de forma cuadrada, eliminando los bordes, y la vegetación superficial de ellas. Con esta profundidad se pretendió abarcar la capa arable.

Se colectó aproximadamente 1kg de muestra compuesta de suelo; se almacenó en bolsas negras y se identificaron adecuadamente; se secaron a temperatura ambiente por 3 días extendidas en papel, se procedió a tamizar; utilizando para ello un tamiz de malla 2 mm. Se empacaron y se identificaron de manera adecuada para su posterior análisis.

4.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GAL POR HPLC

La extracción de GAL se hizo partiendo del extracto metanólico posterior tratamiento ácido base²¹. El análisis preliminar del extracto de las hojas y de los bulbos de *Phaedranassa dubia* comprendió la identificación de diferentes metabolitos secundarios presentes en la planta a través de prueba²⁶ con el reactivo de Dragendorff y reactivo de Mayer los cuales dan positivo para la presencia de alcaloides y cromatografía en capa delgada (CCD) para aproximarnos al mejor eluyente, a través de la fase estacionaria de sílice.

Para su identificación y cuantificación se utilizó³¹ cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC en fase reversa con detector ultravioleta, a una longitud de 215 nm, utilizando una columna C18 y una curva de calibración de GAL como técnica de cuantificación, para ello fue necesaria primero implementar y validar la metodología de cuantificación del metabolito galantamina estandarizando los siguientes parámetros por HPLC: curva de Van Deemter; sensibilidad, midiendo la longitud de onda a la cual absorbe el metabolito patrón GAL; se midieron parámetros de exactitud, precisión del método, límite de cuantificación a través de la medición de una curva patrón de GAL de concentraciones reducidas desde 0 a 1 ppm y límite de detección; que permitieron una mejor determinación y cuantificación del metabolito GAL, en las muestras de *Phaedranassa dubia*, tomadas en los sitios de muestreo de los municipios de Rosas y la Sierra del departamento del Cauca.

4.6 EXTRACCION DE ALCALOIDES EN LA ESPECIE DE *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y ANALISIS POR HPLC.

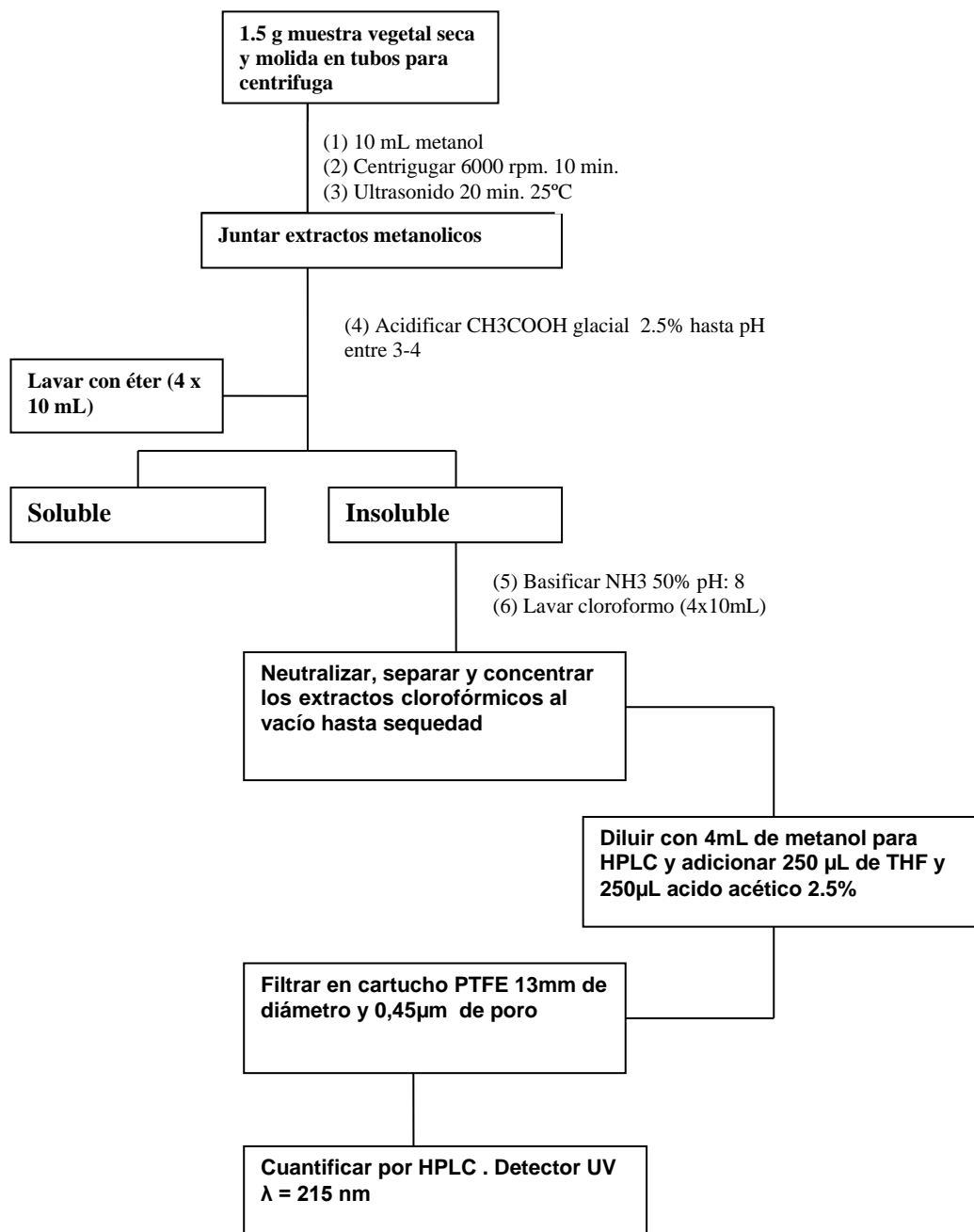


Figura 6. Método de extracción de alcaloides en las especies de Amaryllidaceae para Análisis por HPLC. Análisis por triplicado

4.7 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Phaedranassa dubia*.

Se obtuvo el extracto etanólico de *Phaedranassa dubia* a partir de 887.80 g de material vegetal fresco el cual fue secado a temperatura ambiente, pulverizado por medio de un molino eléctrico; obteniéndose 110.98 gramos de material vegetal seco y molido. Del material colectado se colocaron ejemplares vivos en el Jardín Botánico Álvaro José Negret, Universidad del Cauca, para efectos de conservación de la especie (figura 7.)



Figura 7. Plantación de *Phaedranassa dubia*, ubicado en el jardín botánico Álvaro José Negret (Popayán - cauca)

Una vez pulverizada la planta seca, se obtuvo el extracto etanólico tanto de la parte aérea (tallo y flores) como el de la parte subterránea (bulbo) empleando el método de extracción en frío³², con etanol grado analítico.

Se dejó el etanol en contacto con el material vegetal por 24 horas (en reposo), se filtró y se repitió el proceso hasta que la prueba de Dragendorff fué negativa; al cabo de las cuales se obtiene la solución etanólica. Posteriormente se rotavaporó para concentrar la solución y recuperar el solvente, se obtuvieron los extractos secos los cuales se evaluaron para identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en ellos.

La extracción y cuantificación de GAL en la especie *Phaedranassa dubia* se realizó por triplicado (reproducibilidad) y se inyectó por triplicado (repetitividad). La extracción ácido base permitió la purificación selectiva del extracto, además, la muestra antes de pasar por la columna; pasó por una precolumna C₁₈, con las mismas especificaciones de la columna lo que garantizó una limpieza adicional del extracto de *Phaedranassa dubia*.

4.8 ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Con el objeto de caracterizar los suelos a estudiar se practicaron inicialmente análisis físicos y químicos a las muestras de suelo de acuerdo a técnicas ya estandarizadas³³

4.8.1 Análisis físicos.

Se practicaron las siguientes determinaciones:

Determinación de Humedad.

Mediante el método gravimétrico³³

Pesando 10 g de suelo en una cápsula de porcelana previamente tarada, y se llevó a estufa por 24 horas a 105⁰C. Con la diferencia de pesos se determinó la humedad de la muestra.

Determinación de Textura.

Se utilizó el método de Bouyoucos, el cual consiste en determinar la cantidad de sólidos suspendidos por medio de un hidrómetro, el cual varía la profundidad de su centro de flotación con la densidad de la suspensión y con la textura del suelo. La lectura se visualiza sobre una escala que este contiene y el valor observado se convierte a densidad mediante una escala adecuada. La prueba se realiza sobre la muestra en agua, haciendo las lecturas a diferentes tiempos: la primera se toma a los 40 segundos de preparada la suspensión, tiempo en el cual han sedimentado las arenas, midiéndose la densidad de limos más arcillas. Luego se toma otra lectura a las 2 horas, tiempo en el cual han sedimentado los limos, quedando en suspensión las arcillas midiéndose la densidad de ellas.

Para determinar la textura de las muestras de suelo asociadas a la planta en estudio, se pesaron 50g de suelo en base seca y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL; se adicionó 160 mL de agua destilada, se mezcló y se agregaron 10 mL de solución dispersante (hexametáfosfato de sodio), se agitó la solución del suelo durante dos horas, y se adicionó a un cilindro de bouyoucos, completando con agua destilada hasta la primera línea del cilindro, se agitó fuertemente por 30 segundos, se introduce el hidrómetro y a los 40 segundos se tomó la primera lectura. La segunda lectura se realizó a las dos horas.

4.8.2 Análisis químicos.

Los análisis químicos, se realizaron con la metodología ya establecida³³.

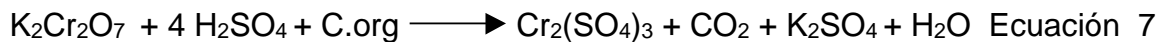
Determinación de pH.

El pH se determinó por medio del método potenciométrico, basado en la comparación del potencial eléctrico producido por los iones H^+ en la solución. Con un pH-metro 744 Metrohm, utilizando una suspensión de suelo: agua 1:1; (Así se pesaron 20.0 g de suelo y se les adicionó 20.0 mL de agua destilada. Se agitó

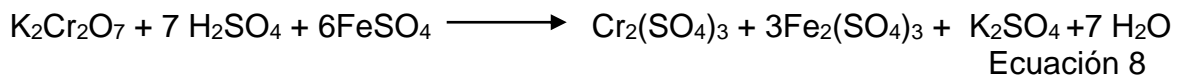
periódicamente durante 1 hora y luego se midió el valor de pH con el potenciómetro.

Determinación de Materia Orgánica.

Se realizó mediante el método de Walckley – Black³³, que consiste en oxidar el carbono orgánico presente en el suelo. El oxidante utilizado fué dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$ 1N) y H_2SO_4 concentrado. La reacción general es la siguiente:



Como subproducto de la reacción queda materia orgánica que no se oxida y $K_2Cr_2O_7$ sin reaccionar entonces se valora volumétricamente el $K_2Cr_2O_7$ con una solución de sulfato ferroso amónico 0.5N . La reacción es la siguiente:



Determinación de Nitrógeno.

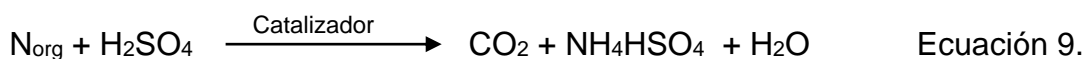
Se determinó en las muestras de suelo asociadas a la especie *Phaedranassa dubia* en estudio, mediante el método de Kjeldahl³³.

Este método es utilizado para la determinación cuantitativa de nitrógeno que proviene de diversos materiales; consta de tres etapas:

Etapas 1.

Oxidación de la muestra

Las muestras de suelo se trataron separadamente con H_2SO_4 y una mezcla catalizadora de $CuSO_4$ selenio y K_2SO_4 para oxidar la materia orgánica y convertir el nitrógeno en sulfato ácido de amonio según la siguiente reacción.



El equipo utilizado en la digestión fue el BUCHI B-426

Etapa 2.

Descomposición del sulfato ácido de amonio

El sulfato de amonio se descompone por medio de un exceso de álcali para liberar el amoniaco, el cual se recoge por destilación sobre ácido bórico. Las reacciones son las siguientes:



El equipo de destilación utilizado fue BUCHI K-314

Etapa 3.

Titulación del borato de amonio



Ó



Determinación de la Acidez Intercambiable.

Se realizó a través de la titulación de las especies catiónicas que generan acidez potencial o cambiabile³³, tales iones son el H^+ y Al^{3+} . Utilizando KCl como solución extractora y posterior titulación con NaOH. Una vez titulados estos iones, se valoró indirectamente el ión Al^{3+} por titulación del NaOH producido al adicionar NaF.

Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

El método³³ que se utilizó se basa en desplazar todos los cationes presentes en el suelo y reemplazarlos por otro catión, en este caso el NH_4^+ posteriormente se desplazaron los iones NH_4^+ adsorbidos con NaCl, al 10% obteniéndose NH_4Cl en

solución, que se trató con formaldehído neutro. El HCl obtenido se tituló con NaOH 0.1N. La reacción muestra lo que ocurre:



Determinación de las bases intercambiables

Corresponden al Calcio, Magnesio, Sodio y Potasio. Se determinaron en el primer extracto del tratamiento con acetato de amonio (AcONH_4) de la determinación de CIC y la cuantificación se realizó por espectrofotometría de absorción atómica.

Determinación de Fósforo. El método utilizado es el Bray II, en el cual el ión fluoruro precipita el calcio soluble extrayendo así las formas de P-Ca más solubles. Se determina el fósforo extraído por el método colorimétrico³³ usando espectrometría UV/Vis.

Determinación de Elementos Menores. Para la cuantificación del Fe, Mn, Cu, Zn se usa una solución de ácido etilendiaminopentacético (DTPA), un extractante adecuado para analizar estos elementos en el suelo. Se realiza extracción con solución de ácido etilendiaminopentacético (DTPA) en trietanolamina (TEA) y HCl, la determinación se llevó a cabo en un equipo de absorción atómica Perkin Helmer 3100 AA.

5. DATOS Y RESULTADOS

5.1 BIOREFERENCIACION

No se encuentran registros bibliográficos sobre la referencia de la especie en el departamento del Cauca; se realizó la referenciación geográfica de los diferentes sitios de muestreo de la especie *Phaedranassa dubia* en los municipios de Rosas y la Sierra. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Ubicación geográfica de sitios de muestreo de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) en los municipios de la Sierra y Rosas del Departamento del Cauca

Municipio	Zona de Muestreo	Altura sobre el nivel del mar (msnm)	Coordenadas geográficas
Rosas	I	1810	02° 16' 13,7'N 076° 43' 53,7 W
Rosas	II	1568	02° 16' 48,8 N 078° 43' 34,7 W
Rosas	III	No disponible	No disponible
La Sierra	IV	1527	02° 13' 53 N 076° 43' 46W
La Sierra	V	1666	02° 13' 13 N 076° 43' 46W
La Sierra	VI	1759	02° 13' 11 N 76° 44' 28 W

5.2 TAMIZAJE FITOQUIMICO

El extracto etanólico obtenido de la especie *Phaedranassa dubia* recolectado en los sitios de muestreo referenciados fué evaluado cualitativamente para identificar núcleos característicos de metabolitos secundarios; los análisis fueron realizados en el laboratorio de compuestos Bioactivos de la universidad del Cauca los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados tamizaje fitoquímico para el extracto etanólico de la especie *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae)

Extracto etanólico <i>phaedranassa dubia</i>		
Prueba	Parte aéreo	Parte bulbo
Alcaloides		
1. Mayer	+	+
2. Dragendorff	+	+
Flavonoides		
1. Shinoda	-	-
2. Pew's	-	-
3. NaOH	+	+
Triterpenos	-	-
Saponinas	+	-
Glucosidos	+	+
Cardiotoniocos		
Glucosidos	+	+
Cianogeneticos		
Taninos	-	+

5.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES

En la determinación y la cuantificación del metabolito secundario, galantamina se establecieron aquellas condiciones experimentales óptimas en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación y cuantificación del mismo en *P. dubia* (**Amaryllidaceae**); matriz compleja con potencial de producción de galantamina.

Diferentes variables pueden afectar la eficiencia de la columna, como el efecto de la velocidad de flujo de la fase móvil, por lo cual se determinó el flujo óptimo de arrastre para la determinación y cuantificación de galantamina, a través de la curva de Van Demmter de una solución estándar de galantamina (10ppm)

Se midieron diferentes parámetros cromatográficos (ver tabla 4.) que permitieron optimizar el proceso de determinación y cuantificación del metabolito galantamina en la especie *Phaedranassa dubia*

Tabla 5. Condiciones de trabajo seleccionadas en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Parámetro	Características
Detección	Visible $\lambda = 215$ nm
Elusión	Isocrática
Temperatura	Ambiente (19-23)°C
Flujo	0.8 mL/min
Volumen de inyección	20 μ L
Columna	Alltech C18; 3 μ m x 4.0 x 250mm.
Fase Móvil	Metanol/buffer acetato 0.001M pH: 4.92
Tiempo de retención	3.9-4.1 minutos
Tiempo total de corrida	10.0 minutos

5.3.1 Elección de la fase móvil

Debido a la solubilidad del patrón de galantamina en metanol, se trabajó la elusión en modo isocrático para lo cual se evaluaron diferentes proporciones de fase móvil que permitieran la separación, determinación y cuantificación del metabolito. Se tuvo en cuenta la resolución de los picos; la intensidad; la definición.

La concentración porcentual de las fases móviles evaluadas fueron las siguientes:

- Metanol: (100)
- Acetonitrilo: (100)
- Metanol: Acetonitrilo (50:50); (80:20)
- Metanol: Agua:Acetonitrilo (78:20:2)
- Metanol: Acetonitrilo:Agua:THF (75:20:5:0.1)
- Metanol: Acetonitrilo:THF (50:45:5)
- Metanol:Dietilamina (90:10)
- Metanol: Buffer Acetato 1%
- Metanol: Acido fosforico 0.001M
- Buffer fosfato 1% pH: 2.7
- Buffer Acetato 1% pH: 4.92

5.4 IMPLEMENTACION Y VALIDACION DEL METODO ANALITICO

5.4.1 Evaluación de la linealidad del sistema

Se midió la linealidad del sistema con el propósito de determinar la proporcionalidad entre la concentración de galantamina y su respuesta en el cromatógrafo de líquidos (HPLC) y demostrar la capacidad del método para obtener resultados lineales.

Se trabajó solo con las soluciones estándar de galantamina, por lo que se validó solamente el sistema (bomba, detector, etc)

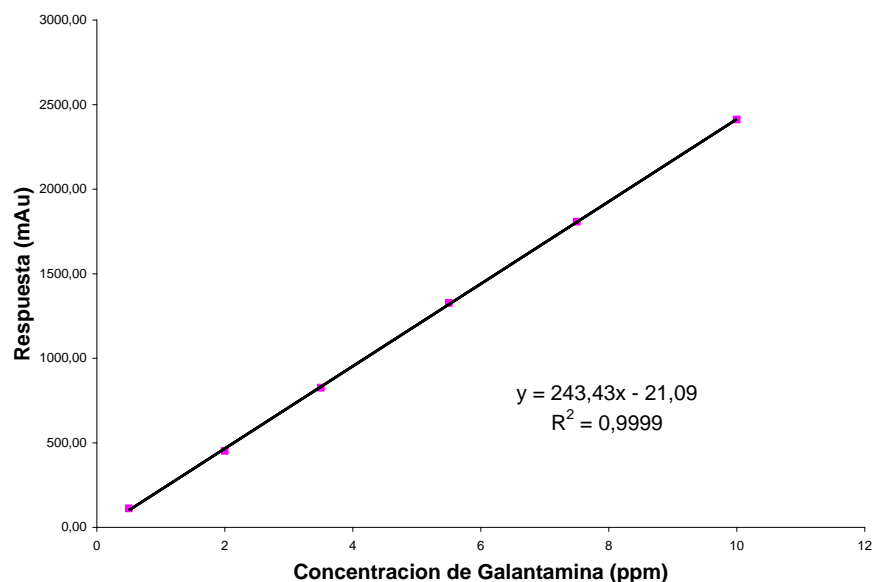


Figura 8. Curva de calibración para Galantamina

Se evaluó la normalidad de los resultados aplicando la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk. Se determinó que los datos provienen de una población con distribución normal, lo que permitió aplicar métodos paramétricos para la evaluación estadística de los resultados obtenidos. En la Figura 8 se ilustra la curva de calibración y seguidamente en la tabla 6. Se presentan los valores de b, a y r obtenidos para dicha curva.

Tabla 6. Parámetros para evaluación de la linealidad del sistema

Parámetro	Símbolo	Valor
coeficiente de correlación	r	0,999
Pendiente	b	243,43
Intercepto	a	-21,09
Desviación estándar para el intercepto	S _a	7,88
Desviación estándar para la pendiente	S _b	1,35
Test estadístico para el intercepto	t _a	-2,6
Test estadístico para la pendiente	t _b	180,3

5.4.2 Determinación del test estadístico de la pendiente y del intercepto

Con el propósito de verificar la linealidad del sistema, se aplicó la prueba de tests estadístico para la pendiente (b) y el intercepto (a)

Los resultados obtenidos de la determinación de la curva de calibración para galantamina muestran una correlación significativa entre las diferentes concentraciones del patrón y la respuesta del equipo (área).

Para el intercepto se plantean las siguientes hipótesis

HIPOTESIS NULA (H_0): "a" es significativamente diferente de cero ($a \neq 0$)

HIPOTESIS ALTERNA (H_1): "a" es igual a cero ($a=0$)

El criterio de aceptación para el intercepto debe cumplir que el test experimental (t_{exp}) debe ser menor que el test tabulado (t_{tab}), según las condiciones mencionadas, entonces el valor de "a" es aceptable

Los criterios de aceptación muestran que para el intercepto (a) el valor t_{exp} (-2.6) es menor que el t_{tab} (2.78)

Por otra parte se aplicó un test de hipótesis para la pendiente (b) y se verificó la correlación lineal. Las hipótesis son las siguientes:

HIPOTESIS NULA (H_0): "b" es igual a cero ($b=0$)

HIPOTESIS ALTERNA (H_1): "b" es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$)

Para la pendiente el criterio de aceptación establece que el valor del test experimental (t_{exp}) es mayor que el test tabulado (t_{tab}), entonces la hipótesis nula se rechaza. Por lo tanto $b \neq 0$. Se determinó que el test experimental (t_{exp}) es muchísimo mayor que el test tabulado (t_{tab}), entonces la pendiente es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$). El valor de t_{exp} (180.3) es mucho mayor que el valor tabulado para $n-2$ grados de libertad y un nivel de

confianza del 95% ; se demuestra la correlación lineal entre las concentraciones del metabolito y las respuesta del equipo de cromatografía líquida (HPLC)

5.4.3 Limite de confianza de la pendiente y del intercepto

Los límites de confianza con un nivel de confianza del 95 % para el intercepto como la pendiente en la medición de la linealidad del sistema se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Límites de confianza para la pendiente y el intercepto

Metabolito	b±LCb $\alpha=0,05$		a±LCa $\alpha=0,05$	
Galantamina	239.7	247.2	-42.9	0.8

LC para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza de 95% = 2.78

5.4.4 Reproducibilidad

Tabla 8. Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de galantamina en un periodo de 15 días.

Concen tración (ppm)	Día 1 (mUA)	Día 3 (mAU)	Día5 (mAU)	Día10 (mAU)	Día 15(mAU)	Área promedio (mUA)	Desviación (S)	CV (%)
2.0	479.3	486.6	469.76	463.1	470.0	473.75	9.21	1.94
3.5	830.0	825.0	846.13	832.0	835.2	833.66	7.89	0.95
5.5	1264.5	1267.1	1276.3	1264.7	1268.2	1268.16	4.82	0.38

C.V= coeficiente de variación (Criterio de aceptación $\leq 5\%$) mAU: mili unidades arbitrarias

El criterio de aceptación determinado para el coeficiente de variación (CV) de las áreas medidas de las tres soluciones patrón de galantamina es $\leq 5\%$. Los valores bajos de desviación muestran que los datos medido para la cuantificación de

galantamina en *Phaedranassa dubia* presentan baja desviación y altos niveles de confianza

5.4.5 Sensibilidad

La sensibilidad del equipo se determinó midiendo el límite de detección (LD) realizando una curva de calibración utilizando un rango de concentración de galantamina entre 0.1 y 0.4 ppm.

Tabla 9. Curva de calibración. Límite de detección y cuantificación de galantamina en *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae)

Nivel de concentración (NC)	Concentración (ppm)	Promedio Área (mAU)	Desviación Estándar (S)	(CV)%
1	0.1	20.67	0.75	3.62
2	0.2	39.74	1.07	2.69
3	0.3	56.74	1.50	2.65
4	0.4	80.37	2.50	3.11
5	0.5	102.93	1.52	1.48

CV: coeficiente de variación: % desviación estándar relativa NC: Nivel de Concentración

Tabla 10. Evaluación de la linealidad. Determinación de límite de detección y cuantificación

Parámetro	Símbolo	Valor
coeficiente de correlación	r	0,997
Pendiente	b	205.1
Intercepto	a	-1.455
Desviación estándar para el intercepto	S _a	2.50
Desviación estándar para la pendiente	S _b	7.56
Test estadístico para el intercepto	t _a	0.58
Test estadístico para la pendiente	t _b	27.13

Los resultados obtenidos con base en las hipótesis planteadas y los criterios de aceptación para la pendiente (b) y el intercepto (a) muestran que para el intercepto (a) el valor t exp (0.58) es menor que el t tab (3.18) para un 95% de intervalo de confianza y para la pendiente el test estadístico muestra que el test experimental (27.13) es mucho mayor que la prueba del test tabulado (3.18) para un 95 % de limite de confianza, lo que muestra una correlación lineal entre la s concentraciones medidas y la respuesta del equipo de cromatografía.

A través de las ecuaciones para el límite de detección (LOD) y cuantificación se determinó la cantidad mínima detectable y cuantificable de galantamina por HPLC³⁴.

$$LOD = \frac{3 s_{interceptos}}{m_{prom}} \qquad LOQ = \frac{10 s_{interceptos}}{m_{prom}} \qquad \text{(Ecuación 15)}$$

Primero se determinó la cantidad mínima de galantamina que puede ser detectada por el equipo de cromatografía líquida (límite de detección), los resultados se muestran en el tabla 9.

Tabla 11. Limite de detección (LOD) instrumental para la determinación galantamina en *Phaedranassa dubia*

Metabolito	Desviación estándar de la pendiente Sb	Intercepto con el eje Y Yb	Valor Y	LOD (ppm)
Galantamina	2.39	-1.45	5.7	0.05

La cantidad que puede ser detectada y además cuantificada (limite de cuantificación) se determino usando los datos de la tabla 9 para una curva de calibración en un rango de concentración entre 0.1ppm y 0.5 ppm

Tabla 12. Limite de cuantificación (LOQ) instrumental para la determinación de galantamina en *Phaedranassa dubia*

Metabolito	Desviación estándar de la pendiente Sb	Intercepto con el eje Y Yb	Valor Y	LOQ (ppm)
Galantamina	2.39	-1.45	5.7	0.186

Los valores LOD y LOQ calculados para la cuantificación de galantamina por cromatografía líquida están por debajo del segundo nivel de concentración (NC 2 correspondiente a 0.2ppm) medido; lo que muestra que el método propuesto es muy sensible y es apropiado para determinar y cuantifica residuos de galantamina en muestras vegetales de *P. dubia* obtenidos en los seis sitios de muestreo seleccionados en los municipios de Rosas y de la Sierra.

5.4.6 Exactitud

Se realizó la evaluación estadística (test de student) midiendo los porcentajes de recuperación (%R), desviación estándar (s), y los coeficientes de variación (%CV)

para verificar la proximidad de los resultados obtenidos con el método y los valores reales, los datos obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de galantamina en extracto metanólico de *Phaedranassa dubia*

Nivel de Concentración	%R Promedio	s	%CV
1	94.24	1.02	1.08
2	93.67	3.43	3.66
3	92.10	1.93	2.10
4	93.15	0.83	0.89
5	92.46	1.04	1.13
Promedio	93.12		1.77

CV: coeficiente de variación %R: porcentaje de recuperación s: desviación estándar

Para demostrar que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% se aplicó un test estadístico (test de student), donde debe cumplirse el siguiente criterio de aceptación: el t experimental debe ser menor que el valor de t tabulado, con la probabilidad de cometer error de $p= 0.05$ y n-1 grados de libertad. Los resultados obtenidos para el test de student experimental muestran valores de t_{exp} : 1.74 y el tabulado t_{tabla} : 2.78. La baja desviación que presenta, como el coeficiente de variación muestran que el método de extracción presenta un error sistemático bajo y buena exactitud en la extracción y cuantificación de galantamina en *P. dubia*.

5.5 CUANTIFICACION DE GALANTAMINA

5.5.1 Cuantificación de galantamina en la especie *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) por cromatografía líquida de alta resolución

La validación de la metodología propuesta permitió cuantificar el contenido de galantamina en la especie *P. dubia* obtenida por extracción ácido base; relacionando el área de la señal del metabolito con la ecuación lineal obtenida en la curva de calibración del mismo. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Cantidad promedio de galantamina en la parte aérea y bulbosa de la especie *Phaedranassa dubia* de la zona de la Sierra y Rosas.

Sitio de muestreo	Bulbo (mg/Kg)	Aéreo (mg/Kg)	Contenido total (mg/Kg)	s	%CV
I	4.00	1.68	5.68	0.04	0.66
II	3.63	1.21	4.84	0.04	0.77
III	2.02	2.62	4.64	0.09	1.86
IV	1.23	1.60	2.83	0.05	1.89
V	1.44	43.78	45.22	0.81	1.79
VI	2.90	23.23	26.13	0.93	3.56

S: desviación estándar CV: coeficiente de variación criterio de aceptación CV ≤ 5%

Una vez validada la metodología de identificación y cuantificación de galantamina se realizó una prueba de adición estándar utilizando extractos metanólicos de bulbo de *Phaedranassa dubia* enriquecidos con la solución estándar del metabolito para identificar el tiempo de retención del metabolito. (ver figura 11.)

En los extractos metanólicos del bulbo y hojas de *Phaedranassa dubia* (ver figura 9 y 10) fue identificada la señal para galantamina en un tiempo de retención

alrededor de 4 minutos, la intensidad de los cromatogramas muestran que los extractos metanólicos del bulbo presentan menor cantidad de pigmentos y compuestos que pudiesen alterar la señal del metabolito que los provenientes del extracto metanólico de las hojas, pero es claro que la metodología no solo se aplica para la extracción de galantamina sino también otros compuestos cuyo actividad y potencial no fue evaluado en este estudio al no contar con patrones o soluciones estándar.

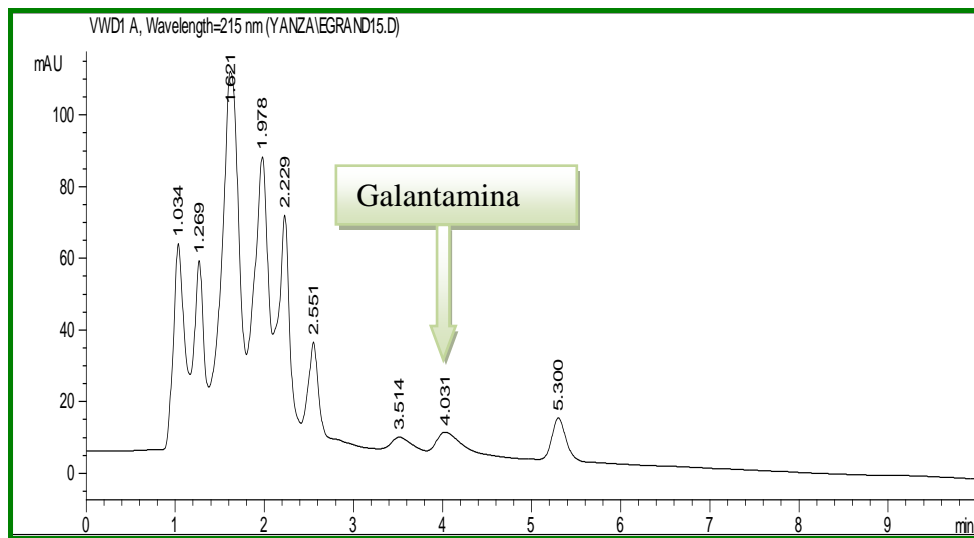


Figura 9. Cromatograma extracto metanólico; bulbo de *Phaedranassa dubia* sin patrón. Sitio de muestreo V.

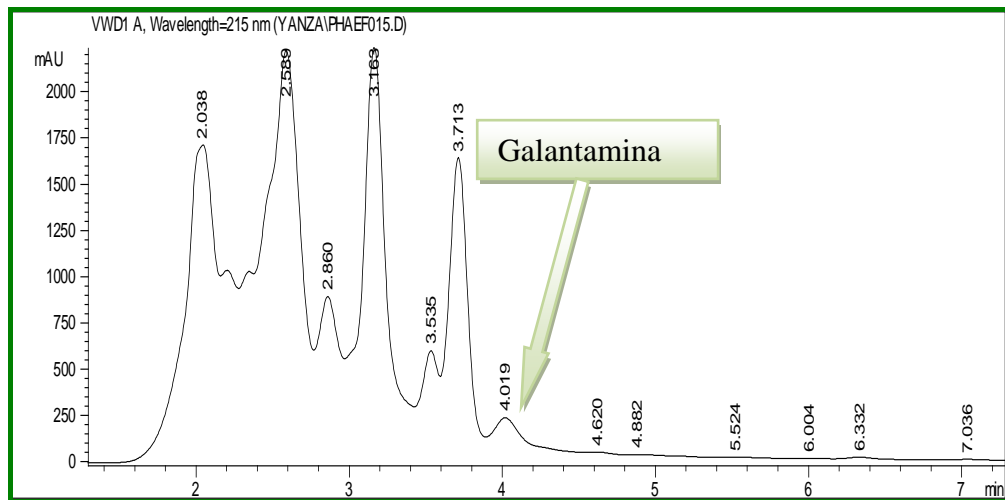


Figura 10. Cromatograma extracto metanólico. Hojas *Phaedranassa dubia*. Sitio de muestreo V

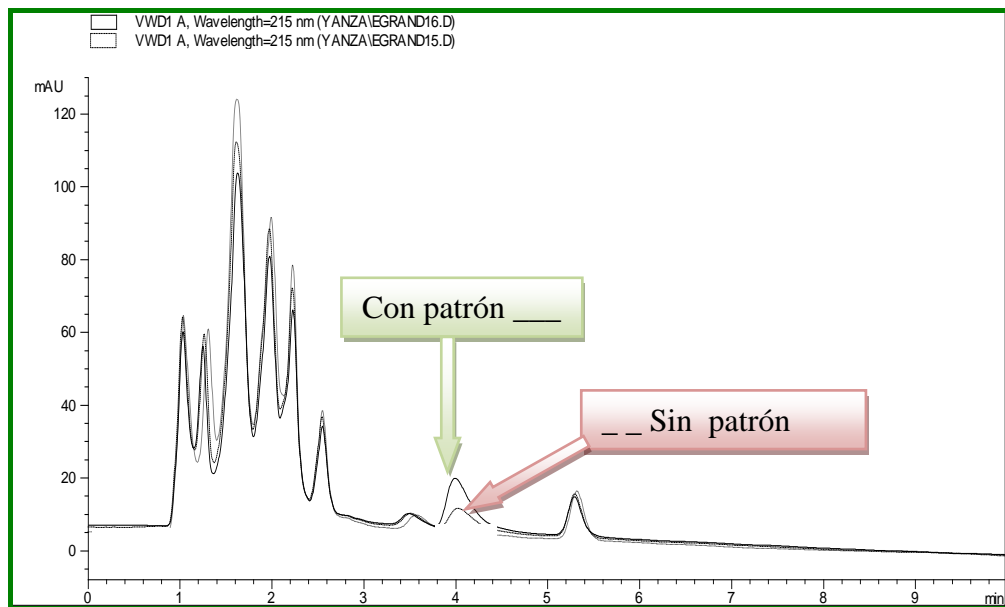


Figura 11. Comparación extracto metanólico de *Phaedranassa dubia* sin patrón y con patrón de galantamina

5.5.2 Contenido de galantamina en las especies *Eucharis amazónica*, *Caliphurria subedentata* y *Eucharis grandiflora* por cromatografía líquida (CLAR)

Se determinó y se cuantificó para efectos de comparación el contenido de galantamina en las especies *Eucharis amazonica*, *Caliphurria subedentata* y *Eucharis grandiflora* utilizando la metodología estandarizada para *Phaedranassa dubia*. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Contenido promedio (mg/Kg) de galantamina en la parte bulbosa y hojas de las especies *Caliphurria subedentata*, *Eucharis amazónica* y *Eucharis grandiflora* (Amaryllidaceae)

Especie (Amaryllidaceae)	Bulbo (mg/Kg)	Hojas (mg/Kg)	Contenido total (mg/Kg)	S	CV %
<i>Caliphurria subedentata</i>	23.7	29.2	52.9	1.60	3.02
<i>Eucharis amazonica</i>	162.1	24.3	186.4	3.47	1.86
<i>Eucharis grandiflora</i>	7.39	2.53	9.92	0.67	6.71

S: desviación estándar CV: coeficiente de variación

Los resultados obtenidos (tabla 15.) muestran que las tres especies de Amaryllidaceae presentan contenidos de galantamina que varían dependiendo de la especie analizada; de las tres especies analizadas *Eucharis amazónica* presentó el mayor contenido de galantamina (186.4 mg/Kg) seguida de *Calyphuria subedentata* (52.9mg/Kg) y por ultimo *Eucharis grandiflora*.

En la parte bulbosa el mayor contenido de galantamina lo presento la especie *Eucharis amazónica*, pero en las hojas (parte aérea) la especie *Calyphuria subedentata* presento el mayor contenido del metabolito (29.2mg/Kg)

Las figuras 12, 13 y 14 muestran los cromatogramas obtenidos de las tres especies analizadas por la metodología estandarizada para *Phaedranassa dubia*.

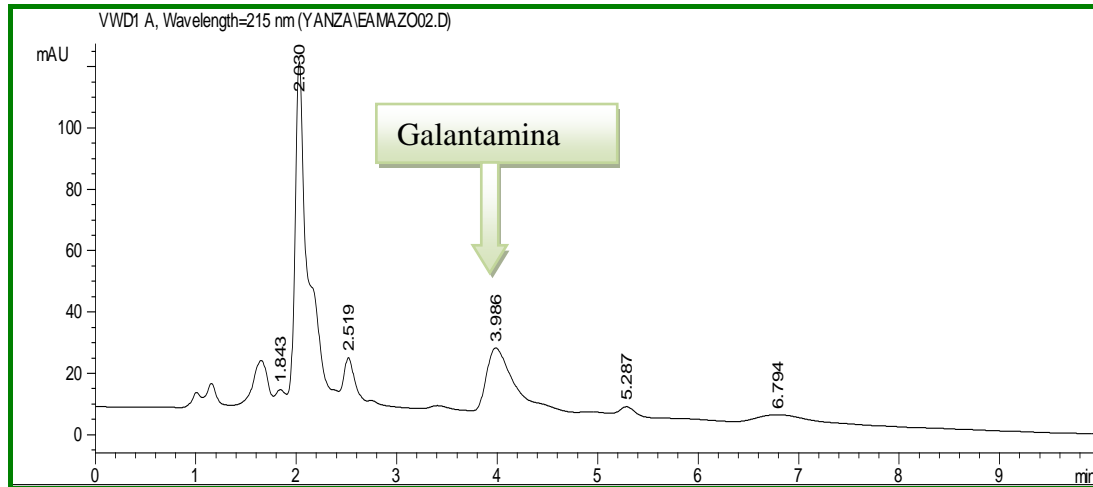


Figura 12. Cromatograma extracto metanólico diluido de parte bulbosa de *Eucharis amazónica* (Amaryllidaceae)

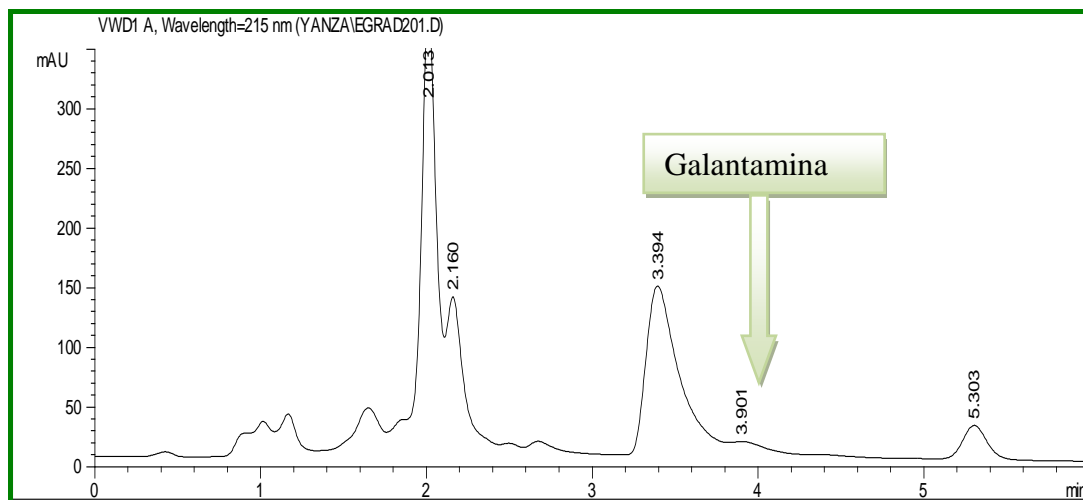


Figura 13. Cromatograma extracto metanólico de parte bulbosa en *Eucharis grandiflora* (Amaryllidaceae)

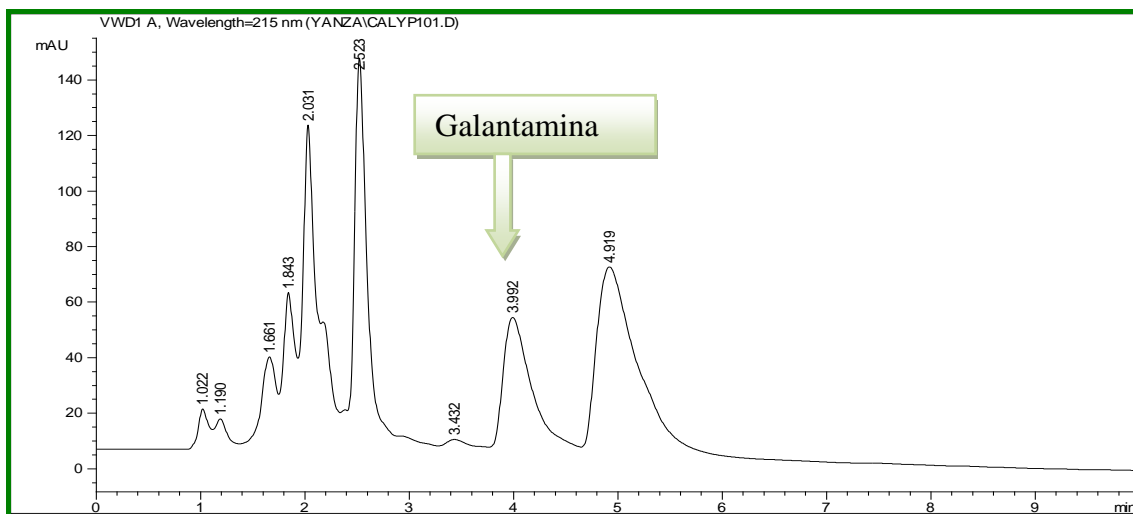


Figura 14. Cromatograma extracto metanólico concentrado de *Caliphuria subdentata* (Amaryllidaceae)

5.6 ANALISIS FISICO Y QUIMICO DE SUELO ASOCIADO A LA ESPECIE *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae)

Se tomaron muestras de suelo asociado a la especie en estudio y se realizó una caracterización de los mismos, los análisis realizados en el laboratorio de Agroquímica del departamento de Química de la Universidad del Cauca, con el propósito de establecer si existe o no correlación entre las propiedades físicas y químicas de estos suelos con el contenido de galantamina presente en los seis sitios de muestreo realizados en las zonas de la Sierra y Rosas del departamento del Cauca; los resultados se corresponden al análisis de las muestras por triplicado y se presentan en la tabla 16, 17 y 18.

Los análisis se realizan con base en los datos de fertilidad reportados por Silva, M,F, sobre la fertilidad de los suelos, pruebas de diagnostico y control³⁵

Tabla 16. Análisis físicos y químicos de suelos asociados a la especie *Phaedranassa dubia*

ZM	Humedad %	Textura	C.E mS cm	pH unid	C.I.C meq 100	CIC efec	Acidez Interc	Al Meq 100	C.O %	M.O %	N Total %	C/N	NO ₃ ⁻ ppm	NH ₄ ⁺ ppm	P ppm	S ppm
I	5.06	F. Arenosa	0.12	5.03	42.15	24.06	0.84	0.69	1.43	2.47	0.12	11.92	3.23	ND	1.16	9.18
II	2.70	F. Arenosa	0.09	5.12	38.36	26.34	1.05	0.84	1.10	1.91	0.09	12.22	4.19	2.24	ND	11.20
III	3.36	F. Arenosa	0.14	4.52	46.74	13.6	2.21	2.12	1.23	2.12	0.10	12.30	ND	ND	ND	7.45
IV	4.70	F. Arenosa	0.10	4.87	51.17	15.22	2.20	2.02	1.21	2.09	0.10	12.10	ND	1.12	1.0	20.1
V	11.58	F. Arenosa	0.13	4.96	32.56	32.02	1.42	1.21	1.34	2.31	0.10	13.40	1.11	ND	ND	12.1
VI	9.25	Arenosa	0.11	5.06	45.45	20.13	1.23	1.07	2.0	3.44	0.16	12.5	2.25	ND	ND	9.18

ZM: zona de muestreo Textura: Bouyucos; pH: relación suelo:agua (1:1); Acidez Intercambiable : método volumétrico; Materia Orgánica: Wakley Black;; CIC: Método volumétrico

Tabla 17. Contenido de Bases de Cambio y saturación de suelos asociados a la especie *Phaedranassa dubia*

ZM	Bases de Cambio						% Saturación de Bases y de Al					
	Ca meq 100g	Mg meq 100g	K meq 100g	Na meq 100g	Ca/Mg	Ca +Mg/K	%SB	%SCa	%SMg	%S K	%SNa	%SAI
I	20.48	1.66	0.40	0.68	12.34	55.35	96.51	85.12	6.90	1.66	2.83	2.87
II	20.91	3.96	0.32	0.10	5.28	77.7	96.01	79.38	15.03	1.22	0.40	3.19
III	7.74	2.91	0.64	0.10	2.66	16.64	83.75	56.91	21.40	4.71	0.74	15.59
IV	9.54	3.00	0.33	0.15	3.18	38	85.54	62.68	19.71	2.17	0.99	13.27
V	23.88	6.07	0.55	0.10	3.93	54.49	95.45	74.58	18.97	1.72	0.31	3.78
VI	15.09	2.92	0.79	0.10	5.17	22.79	93.89	74.96	14.51	3.92	0.50	5.32

ZM: Sitio de muestreo, ppm: partes por millón, %S: porcentaje de saturación, meq: mili equivalentes

Tabla 18. Contenido de Micronutrientes de suelos asociados a la especie *Phaedranassa dubia*

Z.M	Fe ppm	Cu ppm	Mn ppm	Zn ppm	B ppm
I	10.57	1.36	108.37	13.99	ND
II	10.73	1.81	267.8	6.82	0.10
III	11.45	4.18	166.95	5.82	ND
IV	14.38	9.63	267.19	7.85	0.10
V	10.05	1.21	323.78	14.80	ND
VI	12.60	1.18	183.74	7.04	0.10

Z.M = Zona de muestreo, ppm= partes por millón

5.6.1 Sitio de muestreo I.

Proveniente del municipio de Rosas (1810 msnm), presenta un porcentaje de humedad que se clasifica como bajo. La textura que este suelo presenta es franco arenosa, en la cual las arenas representan más del 72,82%), mientras que el 16.18% corresponde a las arcillas.; que se podría correlacionar con esa baja humedad. También esa baja humedad se puede correlacionar con el bajo porcentaje de materia orgánica que presenta este suelo (menor del 3 %), El valor del pH indicia una fuerte acidez que no proviene de Aluminio ya que su contenido y su saturación son bajos (menores de 1.5 meq/100g y < de 30 respectivamente), indicando no toxicidad de este elemento ni para el suelo ni para las plantas allí cultivada. Sin embargo, es posible que esa baja cantidad de Aluminio se pueda atribuir a un fuerte enclamiento realizado en esta zona comprobada por el muy alto contenido de Ca presente en este suelo (> 6 meq/100g) así como su alta saturación (> 50 %) que no fue suficiente para neutralizar la fuerte acidez, pero si para saturar casi todo el complejo coloidal, lo cual se refleja en una baja saturación de Mg (<15%) aún cuando su contenido de éste en un nivel medio; esto promueve a una alta relación Ca/Mg (>5) induciendo así una posible deficiencia de Mg, resultado del fuerte enclamiento con fuente de Ca. El nivel de K es alto (>0.30), pero su saturación es baja (< 2%) debido a que la mayoría del complejo coloidal está saturada por Ca. El nivel de Na es bajo, normal para este tipo de suelos. La saturación de bases es alta cuyo mayor aporte lo hace el Ca con una saturación superior al 50% que es alta. La alta CIC efectiva (>4) indica que no hay pérdida de bases de cambio por lavado. La CIC es muy alta (>30), pero su valor puede estar fuertemente influenciado por el alto contenido de Ca. Por lo anterior, la saturación de bases es muy alta, siendo 33.63 veces mayor que la de Aluminio, indicando nuevamente que las bases han logrado desplazar al Aluminio de sus posiciones de intercambio en el complejo coloidal, pero que la excesiva aplicación de Ca puede conducir a un daño en la bioestructura del suelo,

ya que ocasionaría compactación al suelo y así dificultad de laboreo. De igual forma afectaría la actividad biológica del suelo. El contenido de N es bajo (< 0.15), sin embargo la relación C/N es normal para un suelo agrícola, indicando un proceso de mineralización normal. Es posible que haya deficiencia de N en las plantas allí cultivadas, ya que la mayoría de ese N se encuentra en forma orgánica no disponible en forma inmediata como se percibe por la baja cantidad de Nitratos y de Amonio en este suelo. La fuerte acidez de este suelo influye en una fuerte retención de Fosfatos, de Azufre y B en este suelo, como se puede apreciar por la fuerte deficiencia de P encontrada (< 15 ppm) y de S (< 10 ppm), sin detectar presencia de B. La deficiencia de macronutrientes puede atribuirse también al bajo contenido de MO. En cuanto al contenido de Micronutrientes hay deficiencias de Fe, B y de Zn, nivel normal de Cu pero muy alto nivel de Mn

5.6.2 Sitio de muestreo II.

Proveniente del municipio de Rosas (1568 msnm), presenta un porcentaje de humedad que se clasifica como muy bajo. La textura que este suelo presenta es franco arenosa, en la cual las arenas representan más del 71% mientras que el 12.18%, corresponde a las arcillas.; que se podría correlacionar con esa baja humedad. También esa baja humedad se puede correlacionar con el muy bajo porcentaje de materia orgánica que presenta este suelo (menor del 3 %). Este bajo contenido de MO induce a una fuerte deficiencia de macronutrientes como el N, P y S que provienen exclusivamente de ella como se aprecia en este análisis. El valor del pH indica una fuerte acidez que no proviene de Aluminio ya que su contenido y su saturación son bajos (menores de 1.5 meq/100g y $<$ de 30 respectivamente), indicando no toxicidad de este elemento ni para el suelo ni para las plantas allí cultivada. Sin embargo, es posible que esa baja cantidad de Aluminio se pueda atribuir a un fuerte enclamiento realizado en esta zona comprobada por el muy alto contenido de Ca presente en este suelo (> 6

meq/100g) así como su alta saturación ($> 50 \%$) que no fue suficiente para neutralizar la fuerte acidez, pero si para saturar casi todo el complejo coloidal, también se detecta un alto nivel de Mg (> 2.5) así como una saturación media en este elemento, indicando un posible encalamiento con cal dolomita fuente de estos dos elementos, la alta relación Ca/Mg (>5) podría inducir a una posible deficiencia de Mg. El nivel de K es alto (>0.30) pero su saturación es baja, debido a que la mayoría del complejo coloidal está saturado con Ca y Mg como se mencionó anteriormente. El nivel de Na y su saturación son bajos, normal para este tipo de suelos. La saturación de bases es muy alta, siendo 30.1 veces superior a la del Al indicando nuevamente que las bases han logrado desplazar al Aluminio de sus posiciones de intercambio en el complejo coloidal, pero que la excesiva aplicación de Ca puede conducir a un daño en la bioestructura del suelo, ya que ocasionaría compactación al suelo y así dificultad de laboreo. De igual forma afectaría la actividad biológica del suelo. La alta CIC efectiva (>4) indica que no hay pérdida de bases de cambio por lavado. La CIC es elevada pero su valor puede estar fuertemente influenciado por el alto contenido de Ca. Igualmente la CIC efectiva es muy alta indicando que no hay pérdida de bases por lavado, sin embargo este valor puede estar afectado por el fuerte encalamiento realizado en este suelo. El contenido de N es bajo (< 0.15), sin embargo la relación C/N es normal para un suelo agrícola, indicando un proceso de mineralización normal. La CIC es elevada. Es posible que haya deficiencia de N en las plantas allí cultivadas, ya que la mayoría de ese N se encuentra en forma orgánica no disponible en forma inmediata como se percibe por la baja cantidad de Nitratos y de Amonio en este suelo. La fuerte acidez de este suelo influye en una fuerte retención de Fosfatos, y de B en este suelo, como se puede apreciar por la fuerte deficiencia de P encontrada, sin detectar su presencia y de B (<0.6 ppm). El nivel de S es normal. La deficiencia de macronutrientes N y P puede atribuirse también al bajo contenido de MO. En cuanto al contenido de Micronutrientes hay deficiencias de Fe, Zn, Cu y de B, alto nivel de Mn,

5.6.3 Sitio de muestreo III.

Proveniente del municipio de Rosas, presenta un porcentaje de humedad que se clasifica como muy bajo. La textura que este suelo presenta es franco arenosa, en la cual las arenas representan más del 65%, mientras que el 10.18%, corresponde a las arcillas.; que se podría correlacionar con esa baja humedad. También esa baja humedad se puede correlacionar con el muy bajo porcentaje de materia orgánica que presenta este suelo (menor del 3 %). Este bajo contenido de MO induce a una fuerte deficiencia de macronutrientes como el N P y S como se aprecia en este análisis ya que provienen exclusivamente de ella. El valor del pH indica una acidez muy fuerte proveniente en gran parte del Aluminio intercambiable cuyo valor está en un nivel medio pudiendo ser moderadamente tóxico para los cultivos y para el suelo, aún cuando su saturación sea baja (< de 30), indicando toxicidad de este elemento para plantas susceptibles. A pesar de la muy fuerte acidez se detectan altos niveles de Ca y Mg con altas saturaciones de los mismos, indicando lo mismo que en los casos anteriores fuertes encalamientos con cal dolomita, igualmente se detecta alto nivel de K y alta saturación del mismo. El nivel de Na y su saturación son bajos, normal para este tipo de suelos. Aún cuando ha habido un fuerte encalamiento, y la saturación de bases es muy alta, supera a la del Al en 5. 4 veces únicamente por debajo de los suelos anteriores, indicando que el encalamiento en este suelo no ha sido tan fuerte como en los dos suelos anteriores y que no se afectó la relación Ca/Mg, ya que está en un valor normal, de esta manera no hay deficiencia de ninguno de estos dos elementos. La CIC es muy elevada (>30) y la CIC efectiva es superior a 4 indicando que no hay pérdida de bases por lavado. Como se mencionó anteriormente, hay fuerte deficiencia de N, P y S debido a falta de MO. La relación C/N es ligeramente superior a 12 indicando una mineralización normal, pero con poco aporte de nutrientes como se ha demostrado en este análisis. También la muy fuerte acidez produce fuerte retención de aniones como Fosfatos, Sulfatos y Boratos induciendo así a su fuerte deficiencia. En cuanto a micronutrientes, se

detectan niveles normales de Cu , alto nivel de Mn y fuerte deficiencia de B, Fe y de Zn

5.6.4 Sitio de muestreo IV.

Proveniente del municipio de La Sierra (1527 msnm), presenta un porcentaje de humedad que se clasifica como bajo. La textura que este suelo presenta es franco arenoso, en la cual las arenas representan más del 58%, mientras que el 18% corresponde a las arcillas, que se podría correlacionar con esa baja humedad. También esa baja humedad se puede correlacionar con el muy bajo porcentaje de materia orgánica que presenta este suelo (menor del 3 %). Este bajo contenido de MO induce a una fuerte deficiencia de macronutrientes como el N y P como se aprecia en este análisis ya que provienen exclusivamente de ella. El valor del pH indica una acidez muy fuerte proveniente en gran parte del Aluminio intercambiable cuyo valor está en un nivel medio pudiendo ser moderadamente tóxico para los cultivos y para el suelo, aún cuando su saturación sea baja (< de 30), indicando toxicidad de este elemento para plantas susceptibles. A pesar de la muy fuerte acidez se detectan altos niveles de Ca y Mg con alta y media saturación respectivamente, indicando que el encalamiento en este suelo no ha sido tan fuerte como en los dos primeros suelos puesto que el pH sigue siendo muy bajo y que no se afectó la relación Ca/Mg, ya que está en un valor normal, de esta manera no hay deficiencia de ninguno de estos dos elementos, igualmente se detecta alto nivel de K y media saturación del mismo. El nivel de Na y su saturación son bajos, normal para este tipo de suelos. La saturación de bases es muy alta, siendo 6.4 veces superior a la del Al indicando nuevamente que las bases han logrado desplazar parcialmente al Aluminio de sus posiciones de intercambio en el complejo coloidal, pero que la excesiva aplicación de Ca puede conducir a un daño en la bioestructura del suelo, ya que ocasionaría compactación al suelo y así dificultad de laboreo. De igual forma afectaría la actividad biológica del suelo.

La CIC es muy elevada (>30) y la CIC efectiva es superior a 4 indicando que no hay pérdida de bases por lavado, aún cuando estos valores pueden estar influenciados por el fuerte encalamiento. La muy fuerte acidez produce fuerte retención de aniones como Fosfatos y Boratos, provocando su fuerte deficiencia en estos suelos. Además, como se mencionó anteriormente, hay fuerte deficiencia de N y P debido a falta de MO. La relación C/N es ligeramente superior a 12 indicando una mineralización normal, pero con poco aporte de nutrientes como se ha demostrado en este análisis. En cuanto a micronutrientes, se detectan niveles normales de Cu, alto nivel de Mn y fuerte deficiencias de B, Fe y Zn

5.6.5 Sitio de muestreo V.

Proveniente del municipio de La Sierra (1666 msnm) presenta un porcentaje de humedad que se clasifica como muy bajo. La textura que este suelo presenta es franco arenosa, en la cual las arenas representan más del 84%, mientras que el 8.2% corresponde a las arcillas.; que se podría correlacionar con esa baja humedad. También esa baja humedad se puede correlacionar con el bajo porcentaje de materia orgánica que presenta este suelo (menor del 3 %). Este bajo contenido de MO induce a una fuerte deficiencia de macronutrientes como el N y P que provienen exclusivamente de ella como se aprecia en este análisis. El valor del pH indica una acidez muy fuerte que no proviene de Aluminio ya que su contenido y su saturación son bajos (menores de 1.5 meq/100g y < de 30 respectivamente), indicando no toxicidad de este elemento ni para el suelo ni para las plantas allí cultivada. Sin embargo, es posible que esa baja cantidad de Aluminio se pueda atribuir a un muy fuerte encalamiento realizado en esta zona comprobada por el muy alto contenido de Ca presente en este suelo (23.88meq/100g) así como su muy alta saturación (> 74.58 %) que no fue suficiente para neutralizar la fuerte acidez, pero si para saturar casi todo el

complejo coloidal, también se detecta un alto nivel de Mg (> 2.5) así como una saturación media en este elemento, indicando un posible encalamiento con cal dolomita fuente de estos dos elementos, con una adecuada relación Ca/Mg. El nivel de K es alto (>0.30) pero su saturación es baja, debido a que la mayoría del complejo coloidal está saturado con Ca y Mg como se mencionó anteriormente. El nivel de Na y su saturación son bajos, normal para este tipo de suelos. La saturación de bases es muy alta, siendo 25.2 veces superior a la del Al indicando nuevamente que las bases han logrado desplazar al Aluminio de sus posiciones de intercambio en el complejo coloidal, pero que la excesiva aplicación de Ca puede conducir a un daño en la bioestructura del suelo, ya que ocasionaría compactación al suelo y así dificultad de laboreo. De igual forma afectaría la actividad biológica del suelo. La CIC es muy elevada (>30) y la CIC efectiva es superior a 4 indicando que no hay pérdida de bases por lavado, aún cuando estos valores pueden estar influenciados por el fuerte encalamiento como se aprecia por la gran similitud entre las dos formas de CIC. La muy fuerte acidez produce fuerte retención de aniones como Fosfatos y Boratos, provocando su fuerte deficiencia en estos suelos. Además, como se mencionó anteriormente, hay fuerte deficiencia de N y P debido a falta de MO. La relación C/N es superior a 12 indicando una baja mineralización, por tanto poco aporte de nutrientes como se ha demostrado en este análisis. En cuanto a micronutrientes, se detectan deficiencias de Cu, B, Fe y de Zn, altos niveles de y Mn

5.6.6 Sitio de muestreo VI.

Proveniente del municipio de La Sierra (1759 msnm) presenta un porcentaje de humedad que se clasifica como bajo. La textura que este suelo presenta es arenosa, en la cual las arenas representan más del 93%, mientras que el 2.2% corresponde a las arcillas que se podría correlacionar con esa baja humedad. A diferencia de todos los otros suelos, los niveles de MO y de N son medios, pero se detectan fuertes deficiencias de P y S. El valor del pH indica una fuerte acidez

que no proviene de Aluminio ya que su contenido y su saturación son bajos (menores de 1.5 meq/100g y < de 30 respectivamente), indicando no toxicidad de este elemento ni para el suelo ni para las plantas allí cultivada. Sin embargo, es posible que esa baja cantidad de Aluminio se pueda atribuir a un fuerte encalamiento realizado en esta zona comprobada por el muy alto contenido de Ca presente en este suelo (> 6 meq/100g) así como su alta saturación (> 50 %) que no fue suficiente para neutralizar la fuerte acidez, pero si para saturar casi todo el complejo coloidal, también se detecta un alto nivel de Mg (> 2.5) así como una saturación media en este elemento, indicando un posible encalamiento con cal dolomita fuente de estos dos elementos en suelos cercanos; la alta relación Ca/Mg (>5) podría inducir a una posible deficiencia de Mg. El nivel de K es alto (>0.30), lo mismo que su saturación. El nivel de Na y su saturación son bajos, normal para este tipo de suelos. La saturación de bases es muy alta, siendo 17.6 veces superior a la del Al indicando nuevamente que las bases han logrado desplazar al Aluminio de sus posiciones de intercambio en el complejo coloidal, pero que la excesiva aplicación de Ca puede conducir a un daño en la bioestructura del suelo. La CIC es muy elevada (>30) y la CIC efectiva es superior a 4 indicando que no hay pérdida de bases por lavado, aún cuando estos valores pueden estar influenciados por el fuerte encalamiento como se aprecia por la gran similitud entre las dos formas de CIC. La fuerte acidez produce fuerte retención de aniones como Fosfatos, Sulfatos y Boratos, provocando su fuerte deficiencia en estos suelos, como se comprueba en este análisis. Aún cuando el nivel de N es medio, es posible que haya deficiencia de N en las plantas allí cultivadas, ya que la mayoría de ese N se encuentra en forma orgánica no disponible en forma inmediata como se percibe por la baja cantidad de Nitratos y de Amonio en este suelo. La relación C/N es superior a 12 indicando una fuerte mineralización, pero con poco aporte de nutrientes como se ha demostrado en este análisis. En cuanto a micronutrientes, se detectan deficiencias de Fe, Cu, B y Zn, y alto nivel de Mn

Tabla 19. Coeficientes de correlación de Spearman entre contenido de galantamina y propiedades fisicoquímicas de los suelos asociados ala especie p. dubia en los municipios de La Sierra y Rosas.

	GAL	%H	pH	Al	M.O	N	C/N	S	Ca	Mg	K	Ca/Mg	$\frac{Ca+Mg}{K}$	Fe	Cu	Mn	Zn	ARENA	ARCILLA
K	1	0,8	0,26	-0,38	0,63	0,48	0,59	-0,08	0,6	0,14	0,48	0,368	0,14	-0,62	-0,91	0,1	0,51	0,8353	-0,8047
Sig.		0,00	0,29	0,12	0,00	0,04	0,01	0,76	0,04	0,58	0,04	0,13	0,58	0,01	0,00	0,6	0,03	0,00	0,00
N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

K: constante de correlacion de Pearson; sig: significancia; N: numero de datos; gal: galantamina

La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Existe significancia entre GAL y el %H, M.O, N, C/N, Ca, K, Fe, Cu, Zn, Arena y arcilla

5.7 CORRELACION DEL CONTENIDO DE GALANTAMINA CON PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE SUELOS ASOCIADOS

Con base en el tratamiento estadístico basado en la prueba bivariada de Spearman y Pearson; los resultados obtenidos de la caracterización física y química de los suelos asociados a la especie *P.dubia*, en los seis sitios de muestreo en los municipios de La Sierra y Rosas se correlacionaron con el contenido de galantamina cuantificado por HPLC, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11.5

Las correlaciones de Spearman y Pearson obtenidas entre el contenido de galantamina y las propiedades fisicoquímicas de los suelos asociados se presentan en la tabla 19 y el anexo 6, respectivamente.

Los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas, no se ajustan a una población con distribución normal según la prueba de normalidad bajo el método de Shapiro – Wilks (ver anexo 3); por lo que se determinaron los coeficientes de correlación a través de la prueba no paramétrica de Spearman (ver tabla 20).

Al comparar, el contenido de galantamina (mg/kg) en la especie *P. dubia* de los sitios de muestreo en los municipios de Rosas y La Sierra, con las propiedades fisicoquímicas de sus suelos asociados, a través de los coeficientes de correlación de Spearman (ver tabla 20) se identificó una relación positiva con el porcentaje de humedad (%H), el porcentaje de arena (% arena), materia orgánica (M.O); nitrógeno, relación C/N, calcio, potasio, zinc y indicando que el contenido del metabolito depende directamente de estas propiedades y el incremento de estas, aumentaría el contenido de GAL, en la planta. Indicando que estas plantas necesitan suficiente humedad y aireación y que se puede aumentar el nivel de M.O para mejorar el suministro de micronutrientes y la bioestructura del suelo.

Además de la correlaciones positivas que se presentaron, también se encontraron correlaciones negativas entre el contenido de galantamina (mg/kg) con el contenido de hierro, cobre y el porcentaje de arcillas indicando que a medida que se aumenten los contenidos de estas variables disminuirá el contenido de galantamina. Las demás propiedades no presentaron influencia directa sobre el contenido de galantamina. Esto significaría que si se aumentan las arcillas es probable que disminuya la aireación afectando el buen desarrollo de estas plantas y que niveles altos de cobre y hierro podrían volverse tóxicos para ellos.

De los seis sitios de muestreo asociados a la especie *P. dubia*. El sitio V (45,22 mg/kg) y VI (26,13mg/kg) presentaron los mayores contenidos de galantamina, El análisis de estos resultados obtenidos por HPLC y comparados con la propiedades fisicoquímicas de sus suelos, revelan una similitud con algunos resultados obtenidos a través de la prueba de correlación Spearman (ver anexo 6)

6. CONCLUSIONES

Se logró la validación de una metodología específica y selectiva para la identificación y cuantificación de Galantamina en extractos de Plantas de **Amaryllidaceae** mediante la técnica de HPLC.

La metodología validada es lineal y precisa con un coeficiente de variación (%C.V) menor a 5% y un coeficiente de correlación de 0,999; exacta brindando un porcentaje de recuperación para la metodología global (% R) equivalente a 93.12% y suficientemente sensible con límites de detección y cuantificación equivalentes a 0.05 y 0.186 mg/kg, respectivamente

Se logró identificar cinco nuevos sitios de muestreo para la especie *Phaedranassa dubia* en los municipios de Rosas y La Sierra en el departamento del Cauca, lo que refleja la disponibilidad, resistencia y adaptabilidad de la especie a las condiciones ambientales de la región frente a las demás especies de **Amaryllidaceae** analizadas.

Se determinó la influencia en los seis sitios de muestreo ubicados en los municipios de La Sierra y Rosas de algunas propiedades físicas de los suelos tales como la humedad el porcentaje de arenas y químicas tales como contenidos de Calcio, materia orgánica y la relación C/N sobre el contenido de Galantamina en *P. dubia* de tal forma que el incremento en el valor de estas propiedades significaría un probable incremento en su contenido.

La influencia de propiedades físicas como porcentaje de arcillas y de Propiedades químicas tales como los contenidos de hierro y cobre de los suelos asociados a la especie *Phaedranassa dubia* en la producción de galantamina podrían indicar

que probablemente un incremento en el valor de estas propiedades implicaría una disminución en el contenido del metabolito.

Se resalta de las correlaciones estadísticas de Speraman que los suelos probablemente apropiados para la producción de galantamina deben tener una adecuada aireación, suficiente humedad y MO así como altos niveles de Ca que permitan un valor de pH adecuado para el cultivo. Además que altos niveles de Cu y Fe afectarían probablemente la producción de este metabolito

De las especies analizadas: *Eucharis amazonica*, *Eucharis grandiflora*, *Caliphruria subdentata* y *Phaedranassa dubia*, la especie *Eucharis amazonica*, presentó el mayor contenido total de galantamina y la especie *Phaedranassa dubia* presentó mayor contenido en el área foliar, significando un mayor potencial de obtención de biomasa.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bott, H. G; DOPKE, W. and Stender , W. Naturwissenschaften, (1958) pp 45:390
2. Colombres. M; Sagal, J; Inestrosa, N. Overview of the Current and Novel Drugs for Alzheimer's Disease with Particular Reference to Anti-Cholinesterase Compounds. Current Pharmaceutical Design. (2004), 10. pp. 3121-3130.
3. Meerow, A.W. Systematics of the Amazon lilies, *Eucharis* y *Caliphurria* (Amaryllidaceae) Ann. Missouri Bot. Gard; (1989), 76, pp. 136-220.
4. Meerow, Flora of the Ecuador (1990) 41; 32-42
5. Paulev, A; Neumann, B and Zenk, M. Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Galanthamine. Plant Med (1993), 51 pp 443-445.
6. Calderón, E. Lista Roja preliminar de plantas vasculares de Colombia, incluyendo las orquídeas, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humbolt 2001.
7. Cabezas, F; Ramirez, A; Viladomat, F; Codina, C and Bastida, J. Alkaloids from *Eucharis amazonica* (**Amaryllidaceae**) Chem.Pharm Bull (2003). 51, pp 315-316.
8. Ingkaninan, K; Karabatak, B; Irth, H; Verpoorte, R. High – performance liquid chromatography with on – line couple UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. Journal of Chromatography. (2000). 872, pp 61-73.
9. Mustafa, N; Rhee, K; Verpoorte, R. Rapid method for Determination of Galanthamine in Amaryllidaceae Plants Using HPLC. Journal of Liquid Chromatography and Technologies. (2003), 26. pp 3217-3233.

10. Pham, L.H; Dopke W; Wagner J; and Mugger. C; Alkaloids from *Crinum amabile*. *Phytochemistry*, 48 No, 2. (1998). pp. 371-376.
11. Andersen, S.O. Sclerotization and tanning of the cuticle. in: Kekrut, G.A; Gilbert, L.I. EDS. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol 3 Oxford, Pergamon Pres.(1985). pp. 59-74
12. Arango, G.J. *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Universidad de Antioquia. Medellín. 2002. pp.88
13. Viladomat, F; Bastida, J; Codina, C; Fair J.J and Campbell, W. Alkaloids of the South African *Amaryllidaceae*; *Recent Res. Devel.in Phytochem*; 1 (1997) pp. 131-165.
14. Harbon, J,B; y Baxter, H. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from plants*. Taylor y francis . London-Washington D.C. (1993) pp. 234.
15. Cordell, G. A. (1981) *Introduction to alkaloids. A biogenetic approach*. Wiley Interscience, 2nd de New York.
16. Ghosal, S; Saini, K.S; Y Razdan, S. *Phytochemistry*, 24;(1985) pp. 2141
17. Orhan, G. *Phytother Res., Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from **Amaryllidaceae***. (2003), 17, 10. pp.1220- 1223.
18. J-M Orgogozo; G W Small; G Hammond; B Van Baelen; S chwalen. Effects of galantamine in patients with mild Alzheimer's disease. *Current Medical Research and Opinion*; (2004); 20, 11; p. 1815
19. Monthes, K; Schutte, H.R; & Luckner, M; *Biochemistry of alkaloids*. VEB Deutscher Verlagder wissenchaf Berlin. (1985).
20. Goldman, J; & Cote, *Aging of the brain dementia of the Alzheimer's type: Principles of neuronal Science*; third edition. E. R; Kandel, J.M; Schwartz & T. M; Jessell. Elsevier Science Publishing Co. Amsterdam. (1991)

21. Sharapin, N. Quebecor – Impreandes. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. (2000). pp 22-24.
22. Oleas, N; Meerow, A. Ortega; A Botanical Society of America 2004. Abstract Detail.
23. Bilbao, M.R. Análisis Fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío. Armenia. 2000. pp. 181
24. Skoog; West and Holler; Química analítica. Sexta edición. McGraw-Hill. México. (1995). pp .491.
25. Selles, M; Bastidas, J; Viladomat, F; Codina, C. Quantitative evaluation of galanthamine and related alkaloids in wild plants an tissue cultures of *Narcissus confusus* by high performance liquid chromatography, *Phytochemistry*, 25;(1997) pp. 156-158.
26. Dominguez, X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. (1973). México. pp. 217-219.
27. Scharpless, R, et al. Retention of zinc by some arid soils treated with cinc sulfate. *Soil Sci, Soc. Am. Proc.* 1969. 33:901-904.
28. Giraldo, E. AGROQUIMICA: un Estudio de los Nutrientes Esenciales en la Producción Agrícola. 2002. pp.76-299.
29. Castro, H. Fundamentos para el conocimiento y manejo de suelos agrícolas, Instituto Universitario Juan de Castellanos. Tunja. Produmedios. 1998. pp. 188.
30. J-M Orgogozo; G W Small; G Hammond; B Van Baelen; S chwalen. Effects of galantamine in patients with mild Alzheimer's disease. *Current Medical Research and Opinion*; (2004); 20, 11; p. 1815.
31. Mustafa, N; Rhee, K; Verpoorte, R. Rapid Method for Determination of Galanthamine in Amaryllidaceae plants Using HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. (2003), 26. pp. 3217-3233.
32. Cabezas, F; Estudio Químico de alcaloides en *Crinum kunthianum* ROEM y *Eucharis amazonica* PLANCHON EX. LINDEN, familia **Amaryllidaceae**. Tesis doctoral, Universidad del Valle. 2002. pp 80-97.
33. Bravo, I; Giraldo, E. Manual de Química Agrícola: Análisis de Suelo. 2003.

34. Miller, J; Miller J. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición.
35. Silva, M.F. Fertilidad de suelos. Diagnostico y Control. SCCS, Segunda Edición. Bogotá. (2001); pp. 13-14, 113-116,155-217.

ANEXOS

ANEXO 1: METODOLOGIA PARA LA CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO.

A continuación se presentan las especificaciones de las metodologías aplicadas en el análisis físico y químico realizado a la muestra de suelo utilizada para la validación.

1. Análisis Físicos.

- **Humedad de campo.** Se refiere al contenido de agua con relación al peso o volumen de la masa de suelo. En este caso se determina por el método gravimétrico que es la relación entre la masa de agua y la masa de los sólidos del suelo. Este método consiste en pesar la muestra antes y después del calentamiento a 105°C con el objeto de eliminar el agua superficial en una estufa con circulación de aire forzado.
- **Humedad.** Igualmente se determina por el método gravimétrico una vez seca la muestra al aire. Este valor se utilizará para expresar los resultados en base seca.
- **Textura.** Se refiere a las proporciones de arena limo y arcilla (partículas menores de 2mm de diámetro) que se encuentran en una masa de suelo. Se determina mediante el método de Bouyoucos que consiste en medir la cantidad de sólidos en suspensión por medio de un hidrómetro. La profundidad del centro de flotación del Hidrómetro varía con la densidad de la suspensión y también con la textura. Después de 40 segundos, todas las partículas mayores de 50 micras sedimentarán de tal manera que no tendrán influencia sobre el hidrómetro. Las lecturas realizadas una hora después, corresponden a partículas mayores de 5 micras y a las dos horas a partículas menores de 2 micras. El método se fundamenta en la ley de Stockes (ecuación 1A) que dice que la velocidad de caída de las partículas de diferente tamaño en un medio líquido es directamente proporcional al cuadrado del radio de la partícula. En resumen, la ley de Stockes está dada por la siguiente ecuación:

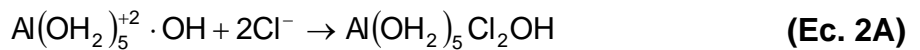
$$V = \frac{2g(d_s - d')r^2}{9\mu} \quad (\text{Ec. 1A})$$

Donde g es la gravedad, d_s es la densidad de las partículas, d' es la densidad del medio en que se encuentran y μ la viscosidad del medio.

2. Análisis Químicos.

➤ **pH.** Se determina mediante el método potenciométrico, en una suspensión suelo: agua en relación 1:1.

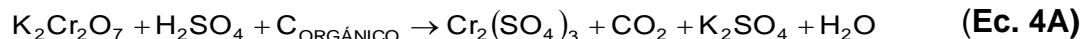
➤ **Acidez Intercambiable.** Se determina mediante el método de desplazamiento con una solución neutra de KCl 1N, que consiste en desplazar los iones H^+ y Al^{+3} de la fase coloidal, por agitación de la muestra de suelo con una solución neutra de KCl. Los iones desplazados son titulados con soda en presencia de fenolftaleína, proceso representado en las siguientes ecuaciones.



La diferencia entre acidez intercambiable y acidez de aluminio da como resultado la acidez debida a H^+ .

➤ **Acidez Titulable.** Se determina con una solución extractora buffer de pH 8.2 la cual ésta constituida por una solución desplazante de $BaCl_2$ y una solución de trietanolamina. Esta última es una base débil que retiene las especies iónicas tales como $Al(OH_2)_6^{+3}$, $Al(OH_2)_5^{+2}$, $Al(OH_2)_4^{+1}$, etc. Se agrega trietanolamina al suelo en exceso y al terminar la reacción se determina la trietanolamina que no reaccionó titulándola con HCl utilizando como indicador verde de bromocresol e indicador mixto. Para determinar la cantidad de meq de trietanolamina agregada se hace un blanco y se titula también con HCl. La diferencia entre los meq totales de trietanolamina y los meq de trietanolamina en exceso se determinan los meq de acidez titulable.

➤ **Materia Orgánica.** Se establece mediante el método de Walckley–Black, el cual consiste en oxidar el carbono orgánico presente en el suelo con un oxidante en medio ácido, de acuerdo con la ecuación 4A.



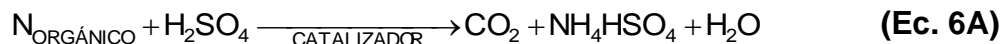
➤ **Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).** Consiste en desplazar todos los cationes que tiene el suelo y reemplazarlos por otro catión, en este caso NH_4^+ . El suelo seco tamizado, se satura con acetato de amonio, tratando de llevar la saturación al máximo. El ion amonio se desplaza con Na^+ (NaCl al 10%), dando lugar a la formación de NH_4Cl ; seguidamente se adiciona formol neutralizado al 40% de tal manera que se produzca la reacción representada en la siguiente ecuación.



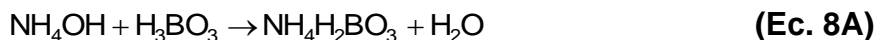
El HCl generado, finalmente se valora con NaOH 0.1N en presencia de fenolftaleína.

➤ **Determinación de nitrógeno por el método de Kjeldhal.** Este método es el utilizado universalmente para la determinación cuantitativa de nitrógeno procedente de diversos materiales, y esta basado en tres etapas:

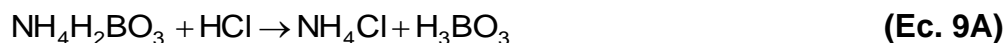
Oxidación de la muestra. La muestra se trata con H_2SO_4 y catalizadores los cuales tienen el propósito de oxidar la materia orgánica y convertir el nitrógeno en sulfato ácido de amonio, según la siguiente reacción:



Descomposición del Sulfato ácido de amonio. El sulfato ácido de amonio se descompone por un exceso de álcali para liberar el amoníaco, él cual se recoge por destilación sobre ácido bórico, de acuerdo con las siguientes reacciones.



Titulación de Borato de Amonio. El borato de amonio formado en el paso anterior se valora con HCl, usando como indicador de punto final una mezcla de rojo de metilo y azul de metilo o rojo de metilo y verde de bromocresol. La reacción implicada en este paso se aprecia en la ecuación 9A.



ANEXO 2. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.

➤ **Factor de capacidad**

$$K' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (\text{Ec. 10A})$$

Donde:

t_R es el tiempo de retención dado por el equipo

t_m es el tiempo muerto.

➤ **Eficiencia:**

$$N = 5.55 \left(\frac{t_n}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{Ec. 11A})$$

Donde:

t_n es el tiempo de retención del pico enésimo

$W_{1/2}$ es el ancho del pico medido a media altura

➤ **Factor de respuesta:**

$$Fr = \frac{\text{Re sputa del analito (área)}}{\text{Concentración del analito } (\mu\text{g} / \text{mL})} \quad (\text{Ec. 12A})$$

ANEXO 3. PRUEBA DE NORMALIDAD BAJO EL MÉTODO DE SHAPIRO - WILK.

Para realizar el análisis correspondiente a la normalidad de los datos se empleo el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5.2.1. Se aplicó la prueba estadística de Shapiro – Wilk, para la cual se tiene como hipótesis nula (H_0) que los datos provienen de una distribución normal, para ello se requiere que el valor de significancia (sig) obtenido al realizar la prueba estadística sea mayor de 0.05 para un nivel de confianza del 95 %. En la tabla A1, se muestran los resultados de

ésta prueba para la evaluación de la linealidad, repetibilidad y precisión intermedia instrumentales, y para la repetibilidad y precisión intermedia de la metodología.

Tabla A1: Resultados para la evaluación de la normalidad de los datos en la evaluación de linealidad y repetibilidad instrumental, precisión intermedia instrumental, repetibilidad y precisión intermedia de la metodología.

Datos correspondientes a:	SHAPIRO - WILK		
	Estadístico	gl*	Sig.*
Linealidad y repetibilidad instrumental.	,900	4	,430
	,878	4	,330
	,972	4	,857
	,990	4	,958
	,914	4	,506
Precisión intermedia instrumental.	,842	5	,170
	,924	5	,555
	,851	5	,197
	,939	5	,660
	,798	5	,077
Repetibilidad de la metodología.	,950	5	,735
	,844	5	,177
	,852	5	,202
	,989	5	,976
	,807	5	,093
Precisión intermedia de la metodología.	,882	4	,347
	,933	5	,619
	,900	5	,408
	,971	5	,882
	,974	4	,863

*gl, grados de libertad; Sig., significancia.

Como se observa en la tabla A1 los valores para la significancia obtenidos en la prueba de Shapiro – Wilk son superiores a 0.05, por lo que H_0 se acepta y se concluye que los datos provienen una población con distribución normal.

ANEXO 4. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD.

- **Evaluación de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación.** Primero se trazan los puntos sobre un plano cartesiano para realizar una inspección visual de los puntos, luego se evalúa si el rango de calibración es lineal. Para

estimar el ajuste de los datos a una línea recta se calcula el **Coefficiente de Correlación** (r). El valor de r está dado por la ecuación:

$$r = \frac{\sum_i \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]^{1/2}} \quad (\text{Ec. 13A})$$

Para evaluar si r es realmente significativo se emplea un **Contraste Estadístico (t)**, en el que se tienen en cuenta el número de datos usados, mediante la ecuación

$$t_{\text{calc}} = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Ec. 14A})$$

Como hipótesis nula (H_0) se tiene que “No existe correlación entre x e y”. El valor t_{calc} se compara con el valor t_{tab} a (n-2) grados de libertad y al nivel de significación deseado. Si $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$ se rechaza H_0 y se concluye que existe correlación significativa.

Posteriormente, ya sabiendo que hay relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración (x), entonces se busca la “mejor” línea recta a través de los puntos de la gráfica de calibrado.

Se calcula la **Pendiente** y el **Intercepto** de la recta mediante las ecuaciones.

$$b = \frac{\sum_i \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Ec. 15A})$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ec. 16A})$$

Los valores calculados para la pendiente (b) y el intercepto (a) se evalúan mediante el estadístico t, en donde:

- Para la pendiente se tiene como H_0 : “b no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando el valor de $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$.
- Para el intercepto se tiene como H_0 : “a no es significativamente diferente de cero”, esta se acepta cuando el valor de $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$.

De esta forma se tendrá la recta de regresión de **y** sobre **x**. Adicionalmente se calculan los **Errores en la Pendiente y Ordenada en el Origen** de la recta de regresión. Inicialmente se realiza el cálculo del estadístico $s_{y/x}$ (errores aleatorios en la dirección y), posteriormente se calculan las **Desviaciones Estándar de la Pendiente y del Intercepto**, (s_b y s_a).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Ec. 17A})$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ec. 18A})$$

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ec. 19A})$$

Los valores de s_b y s_a se utilizan para estimar los límites de confianza de la pendiente y del intercepto, mediante las ecuaciones.

$$b = b \pm t(n-2) s_b, \quad a = a \pm t(n-2) s_a \quad (\text{Ec. 20A})$$

Tabla A2: Regresión y prueba t de Student para r, b y a empleando paquete estadístico SPSS para el ensayo de repetibilidad instrumental.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-21,081	3,375		-6,246	,000
	Concentración (ppm)	243,431	,580	1,000	419,525	,000

a Variable dependiente: AREA (mAU)

Tabla A3: ANOVA mediante paquete estadístico SPSS para el ensayo de repetibilidad instrumental.

ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	14893645,4 27	1	14893645,4 27	176001,35 5	,000(a)
	Residual	1861,691	22	84,622		
	Total	14895507,1 18	23			

a Variables predictoras: (Constante), Concentración (ppm)

b Variable dependiente: AREA (mAu)

ANEXO 5. REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA (% C.V.)

El porcentaje de coeficiente de variación (% C.V) se calculó mediante la aplicación de la siguiente ecuación.

$$\% C.V. = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Ec. 21A)}$$

Donde:

% C.V. es el porcentaje de coeficiente de variación

s es la desviación estándar

\bar{x} es el promedio

ANEXO 6. DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE PEARSON

Tabla A4. Coeficientes de correlación de Pearson entre contenido de galantamina y propiedades fisicoquímicas de los suelos asociados ala especie p. dubia en los municipios de La Sierra y Rosas.

	Gal	%H	pH	Al	M.O	N	C/N	S	Ca	Mg	K	Ca/M g	$\frac{Ca+Mg}{K}$	Fe	Cu	Mn	Zn	ARENA	ARCILLA
K	1.0	0,95	0,04	-0,25	0,43	0,3	0,88	-0,12	0,5	0,74	0,5	-0,18	-0,01	-0,34	-0,48	0,5	0,5	0,793	-0,594
Sig	.	0.0	0,85	0,32	0,07	0,2	0,0	0,64	0,02	0,0	0,04	0,467	0,98	0,163	0,04	0,05	0,02	0,0	0,0093
N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

K: constante de correlacion de Pearson; sig: significancia; N: numero de datos; gal: galantamina

La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

