



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio de los compuestos alcaloides tropolónicos en
la planta *Merendera montana*.

Study of tropolonic alkaloid compounds at
Merendera montana plant.

Autor/es

Raquel Puerto Benito

Director/es

Raquel Zufiaurre Galarza
Daniel Gómez García

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a José Azorín y Daniel Gómez, del Instituto Pirenaico de Ecología (IPE) por la toma de muestras, parte experimental e interés demostrado en la realización de este trabajo.

A José Antonio Manso Alonso y José María Garcés Tebar por su ayuda en el laboratorio.

A mi directora Raquel Zufiaurre Galarza por haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto y por su tiempo, consejos, además de aportarme conocimientos que me ayudaron a estar más cerca de su finalización.

A toda mi familia, por ser un pilar fundamental a lo largo de mi vida y que, gracias a su gran esfuerzo, he podido llevar a cabo este objetivo que es Ciencias Ambientales.

Finalmente agradecer a todos mis compañeros, por todas las aventuras vividas estos años de universidad, sin ellos no habría sido lo mismo. Y a mis amigas, por apoyarme y hacer más fácil este periodo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
OBJETIVOS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Estatus taxonómico, distribución y hábitat de Merendera Montana.....	8
1.2 Composición química de Merendera montana: alcaloides tropolónicos.....	13
1.3 Antecedentes.....	17
1.4 Métodos analíticos para la determinación de alcaloides tropolónicos en material vegetal.....	20
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	24
2.1 Material y reactivos.....	24
2.1.1 Material y equipos de laboratorio.....	24
2.2.2 Reactivos.....	25
2.2 Muestreo y preparación de muestras.....	26
2.2.1 Muestreo.....	26
2.2.2 Preparación de las muestras.....	29
2.3 Metodología analítica.....	30
2.3.1 Determinación de nitratos, amonio y pH en suelos.....	30
2.3.2 Determinación de Nitrógeno Kjeldahl Total (NKT) en hoja y bulbo en planta de <i>M. montana</i>	32
2.3.3 Determinación de alcaloides tropolónicos en hoja y bulbo de <i>M. montana</i>	33
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
3.1 Análisis del suelo: pH y nitrógeno inorgánico.....	46
3.2 Contenido de Nitrógeno Kjeldahl Total en planta Merendera montana.....	52
3.3 Identificación y cuantificación de compuestos alcaloides tropolónicos en hoja y bulbo de Merendera montana.....	55
3.4 Análisis multivariante de los resultados.....	71
3.5 Comparación con datos bibliográficos y con otros estudios (otras especies <i>Colchicum</i>).....	79
4. CONCLUSIONES.....	86
5. BIBLIOGRAFÍA.....	88
ANEXOS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de Merendera montana.....	11
Figura 2. Hoja y bulbo Merendera montana.....	9
Figura 3. Reproducción sexual y asexual Merendera montana. Fuente: Gómez et al (2004).	10
Figura 4. Ciclo anual de la Merendera montana a 2000 y 200 metros de altitud.	11
Figura 5. Mapa de distribución de Merendera montana a nivel nacional.	12
Figura 6. Mapa de distribución de Merendera montana en Aragón.	12
Figura 7. Localización municipios de muestreo de Merendera montana.	27
Figura 8. Municipios de muestreo Merendera montana. Fuente: IDEARAGÓN (2009). ..	27
Figura 9. Recipientes con muestras de hoja y bulbo de algunas zonas de muestreo.....	30
Figura 10. Recta de calibrado nitratos (NO_3^-).	31
Figura 11. Recta de calibrado amonio NH_4^+	32
Figura 12. Ejemplo cromatograma multipatrón 10 ppm obtenido por HPLC-UV 245 nm. 35	
Figura 13. Rectas de calibrado multipatrón de alcaloides.	35
Figura 14. Ejemplo cromatograma HPLC-UV 245 nm muestra de hoja de Aísa.....	38
Figura 15. Cromatograma muestra hoja Aisa analizado por UHPLC-uv a 245 nm (UPV).39	
Figura 16. Cromatograma método 1 muestra hoja analizado por HPLC-UV a 245 nm....	42
Figura 17. Resultados cuantificación pico 1 en hoja.....	45
Figura 18. Resultados cuantificación pico 2 en hoja	43
Figura 19. Resultados cuantificación pico 3 en hoja.....	45
Figura 20. Resultados cuantificación pico 4 (Colchicina) en hoja.....	43
Figura 21. Resultados cuantificación pico 5 en hoja.....	44
Figura 22. Resultados cuantificación pico 1 en bulbo.....	46
Figura 23. Resultados cuantificación pico 2 en bulbo.....	44
Figura 24. Resultados cuantificación pico 4 (Colchicina) en bulbo.....	46
Figura 25. Resultados cuantificación pico 5 en bulbo.....	44
Figura 26. Proceso de extracción seleccionado para determinación de alcaloides tropolónicos	45
Figura 27. Comparación concentración de nitratos y amonio y pH en las muestras de suelos.	47
Figura 28. Variación concentración de nitratos y amonio en suelos y precipitaciones.....	51
Figura 29. Porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total en hoja, bulbo y planta.....	53
Figura 30. Cromatograma muestra hoja analizada por HPLC-UV a 245 nm.	55
Figura 31. Cromatograma muestra bulbo analizada por HPLC-UV a 245 nm.	55

Figura 32. Espectro de absorción colchicósido.	
Figura 33. Espectro de absorción 3-Demetil.	56
Figura 34. Espectro de absorción de la Colchicina.	57
Figura 35. Cromatograma hoja analizada por HPLC-UV a 245 nm, con la representación	57
Figura 36. Espectro absorción pico mayoritario 1	60
Figura 37. Espectro absorción pico mayoritario 2	58
Figura 38. Espectro absorción pico mayoritario 3.....	60
Figura 39. Espectro absorción pico mayoritario 4	58
Figura 40. Espectro absorción pico mayoritario 5	58
Figura 41. Cromatograma muestra AISA analizada por HPLC-UV a 245 nm (UPV).	60
Figura 42. Cromatograma muestra hoja AISA analizada a 245 nm por HPLC-MS	60
Figura 43. Cromatograma muestra hoja AISA analizada por HPLC-MS a 245 nm.....	61
Figura 44. Espectro de absorción de la Cornigerina (UPV).	61
Figura 45. Espectro de masas de la Cornigerina analizado por HPLC-MS	62
Figura 46. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras Cubilar de las Vacas....	65
Figura 47. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Puerto de Aísa.	65
Figura 48. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras San Juan de la Peña. ..	66
Figura 49. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Salto de Roldán.	66
Figura 50. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Guasillo.	66
Figura 51. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Montmesa.....	67
Figura 52. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Marcén.	67
Figura 53. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras San Mateo de Gállego. 67	
Figura 54. Concentración de alcaloides(mg/g) en las muestras de Monzón.....	68
Figura 55. Comparativa concentración total de alcaloides en las muestras	68
Figura 56. Distribución de las variables estudiadas.	74
Figura 57. Distribución de las muestras analizadas.	75
Figura 58. Distribución de las variables estudiadas.	78
Figura 59. Distribución de las muestras analizadas.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación sistemática de <i>Merendera montana</i> . Fuente: EURO+MED, 2011. ...	8
Tabla 2. Tipos de alcaloides tropolónicos. Fuente: Sangster et al, 1964.....	15
Tabla 3. Alcaloides tropolónicos objeto de este estudio. Fuente: Pubchem.....	16
Tabla 4. Características climatológicas y coordenadas de las zonas de muestreo. Fuente: AEMET.....	28
Tabla 5. Rectas de calibrado de los alcaloides tropolónicos de interés.	35
Tabla 6. Condiciones cromatográficas de trabajo en HPLC-UV.....	37
Tabla 7. Composición gradiente fase móvil HPLC.....	37
Tabla 8. Condiciones de los métodos de extracción de alcaloides en planta.	42
Tabla 9. Valores de pH y concentración de nitratos y amonio (mg/kg) en las muestras de suelo.	47
Tabla 10. Concentración de NKT en hoja y bulbo de <i>Merendera montana</i>	52
Tabla 11. Tiempos de retención (Tr), longitudes de máxima absorción (UV_{max}) y datos espectrales de masa de los picos cromatográficos de la Figura 46.....	63
Tabla 12. Concentración (mg/g) de colchicósido, 3-demetilcolchicina, colchicina y cornigerina en hoja y bulbo y contenido total (mg/g) de alcaloides en planta.	64
Tabla 13. Matriz de correlaciones de las variables: alcaloides individuales y totales en hoja y bulbo; NKT en planta; nitratos, amonio y pH en suelos.	72
Tabla 14. Matriz de componentes.	73
Tabla 15. Matriz de correlaciones de las variables: alcaloides en hoja y bulbo; NKT en planta; nitratos, amonio y pH en suelos; y la variable altitud.	77
Tabla 16. Matriz de componentes.	78
Tabla 17. Comparativa cantidad de alcaloides en hoja, expresado como %.	80
Tabla 18. Comparativa de la cantidad de alcaloides en bulbo, expresado como %.	81
Tabla 19. Comparativa de la cantidad total de nitrógeno en planta, expresado como %NKT.	82
Tabla 20. Comparativa cantidad alcaloides en hoja y bulbo, expresado como mg/g.	83
Tabla 21. Cuantificación de alcaloides en cormos de distintas especies, expresado en mg/g. Fuente: Ondra, 1994.....	84

RESUMEN

Los alcaloides tropolónicos son compuestos resultado del metabolismo secundario de las plantas, sintetizados a partir de aminoácidos y que contienen nitrógeno en su estructura. Su presencia ha sido contrastada en los géneros *Colchicum*, *Merendera* y *Gloriosa*, y su función es actuar como defensa y adaptación vegetal. Además, estos compuestos llevan utilizándose desde mucho tiempo atrás en medicina humana. Debido a la incertidumbre que existe en torno al comportamiento de estos alcaloides en las plantas, su variación temporal y espacial y su posible relación con la cantidad de nitrógeno mineral presente en el medio, el presente trabajo de fin de grado tiene por objeto la determinación de los alcaloides tropolónicos presentes en las hojas y bulbos de la especie *Merendera montana*. Se han seleccionado nueve zonas de muestreo pertenecientes al territorio aragonés: Cubilar de las Vacas, Puerto de Aisa, San Juan de la Peña, Salto de Roldán, Guasillo, Montmesa, Marcén, San Mateo de Gállego y Monzón. Para ello se ha utilizado la cromatografía de líquidos con espectrometría de absorción UV (HPLC-UV). Previamente al análisis de las muestras se ha llevado a cabo una optimización de las etapas de extracción del material vegetal y la puesta a punto del proceso de separación cromatográfica. Los compuestos identificados son el colchicósido, 3-demetilcolchicina, colchicina y cornigerina. Los resultados de este trabajo muestran las diferencias existentes entre hoja y bulbo de *M.montana*. Las hojas presentan mayor cantidad de alcaloides y en ellas no se ha detectado el colchicósido. Se establece la correlación entre el contenido total de alcaloides, el contenido de nitrógeno total en planta y el contenido de nitratos en los suelos muestreados en las zonas de estudio.

PALABRAS CLAVE

Merendera montana, alcaloides tropolónicos, nitrógeno planta, nitrógeno mineral, suelos, cromatografía de líquidos..

ABSTRACT

The tropolonic alkaloids are compounds resulting from the secondary metabolism of plants, synthesized from aminoacids and that containing nitrogen in its structure. Its presence has been contrasted in the genus *Colchicum*, *Merendera* and *Gloriosa*, and its function is to act as a plant defense and adaptation. In addition, these compounds have been used for a long time in human medicine. Because of the uncertainty that exists in the behaviour of these alkaloids in plants, their temporal and special variation and their possible relationship with the amount of mineral nitrogen present in the environment, the present work of degree aims to the determination of tropolonic alkaloids present in the leaves and corms of the species *Merendera montana*. Nine sampling areas belonging to the Aragonese territory have been selected: Cubilar de las Vacas, Puerto de Aisa, San Juan de la Peña, Roldán Falls, Guasillo, Montmesa, Marcén, San Mateo de Gállego and Monzón. For this purpose, liquid chromatography with UV absorption (HPLC-UV) has been used. Prior to the analysis of the samples, an optimization of the extraction stages of the plant material and the start-up of the chromatographic separation process was carried out. The identified compounds are colchicoside, 3-demethylcolchicine, colchicine and cornigerina. The results of this work are the differences between the leaf and the bulb of *M.montana*. The leaves present a greater quantity of alkaloids and in them colchicoside has not been detected. The correlation between the total alkaloid content, the total nitrogen content in the plant and the nitrate content in the soils sampled in the study areas is established.

KEYWORDS

Merendera montana, tropolonic alkaloids, plant nitrogen, mineral nitrogen, soils liquid chromatography.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificar, cuantificar y tratar de interpretar la variación espacial de los compuestos alcaloides tropolónicos, en hoja y bulbo de la *Merendera montana*, y su posible relación con el contenido de nitrógeno mineral del suelo.

➤ Objetivos específicos:

- Poner a punto el procedimiento analítico para separar y determinar alcaloides tropolónicos en hoja y bulbo mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).
- Identificar y cuantificar los compuestos alcaloides tropolónicos (principalmente colchicósido, 3-demetilcolchicina y colchicina) en las muestras analizadas mediante el uso de HPLC con detector de Espectrofotometría de Absorción Ultravioleta-Visible.
- Determinar el contenido de nitrógeno Kjeldahl total en las muestras de hoja y bulbo y el contenido de nitratos y amonio en el suelo.
- Evaluar las posibles diferencias en el contenido de alcaloides entre las dos partes de la planta (hoja y bulbo) y entre las localidades muestreadas.
- Evaluar la relación entre el contenido total de alcaloides y el contenido total de nitrógeno en la planta.
- Evaluar la relación entre el contenido total de alcaloides, el contenido de nitrógeno mineral del suelo y la altitud a la que se encuentran las localidades muestreadas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estatus taxonómico, distribución y hábitat de *Merendera Montana*

Merencera montana (L.) Lange (= *M. bulbocodium* Ramond, *M. ((Pounet)/P.R.Fourn))* es una planta vascular perteneciente al género *Merendera* Ramond, de la familia LILIACEAE. Entre sus nombres comunes en la región pueden citarse “quitameriendas” y “espantapastores” que aluden a su particular fenología ya que la planta florece al final del verano cuando se hace ostensible el acortamiento del día.

Muestra un parentesco muy cercano al género *Colchicum*, de manera que la relación de estos dos géneros ha sido muy discutida desde hace casi dos siglos, por autores como K. Persson (2007), B. Stefanov (1926), o J. Manning (2007). Cada uno de estos autores sostiene, con algunas variaciones en el número de géneros a incluir, que el género *Colchicum* debe aglutinar también los restantes géneros de la familia Colchicaceae que se encuentran en el territorio de *Flora Ibérica: Merendera, Bulbocodium y Androcymbium*. Sin embargo, otros trabajos (Hoyo et al, 2009) consideran más apropiado seguir con el concepto restringido de *Colchicum* y mantener la separación tradicional, de los cuatro géneros mencionados. De esta manera las especies de *Merendera* quedarían aisladas del resto de los *Colchicum* (Castroviejo et al, 1986-2012).

Para la elaboración de este trabajo se va a considerar la clasificación empleada en el estudio taxonómico de la Flora de la Península Ibérica e Islas Baleares desarrollado por Castroviejo, 1986-2012.

La clasificación sistemática de la *Merendera montana* se muestra en la Tabla 1, de acuerdo con la sistemática de Cronquist (1992).

Tabla 1. Clasificación sistemática de *Merendera montana*. Fuente: EURO+MED (2011).

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Lilianaes
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Género	<i>Merendera</i>
Especie	<i>Merendera montana</i>

Respecto a su distribución, se trata de una especie ampliamente distribuida en la Península Ibérica y subendémica de dicho territorio ya que alcanza algunos puntos del Pirineo francés. En su ámbito peninsular la planta está presente en la práctica totalidad de las provincias, aunque aparece muy dispersa en el tercio meridional (Rico en Castroviejo et al. *Flora ibérica*).

M. montana es un pequeño geófito perenne, alcanza 8-15 cm de longitud y sitúa sus flores de color lila a ras de suelo, junto con tres o cuatro hojas lineares y un cormo subterráneo (Figuras 1 y 2). Generalmente, los geófitos almacenan una cantidad considerable de nutrientes en el cormo, de forma que esta parte de la planta se convierte en un excelente recurso alimentario para muchos animales, sobre todo para los mamíferos subterráneos (Gómez et al, 2004). Por ello, como gran parte de otros geófitos desarrolla estrategias de defensa y, en concreto, sintetiza y acumula alcaloides tropolónicos que disuaden a los grandes herbívoros del consumo de sus hojas (Gómez et al, 2004).



Figura 1. Flor de *Merendera montana*.

Fuente: Herbario de Jaca.



Figura 2. Hoja y bulbo *Merendera montana*.

Fuente: Instituto Pirenaico de Ecología.

En cuanto a la reproducción, se puede producir de forma asexual, clonal, mediante el desarrollo de un brote desde el ápice del bulbo viejo durante el invierno, que puede separarse fácilmente de la planta madre dando paso a un nuevo individuo (como se puede observar en la Figura 3 b). Por otro lado, a través de reproducción sexual, donde la floración marca el inicio de un ciclo de vida anual de un nuevo órgano de almacenamiento que será sustituido por otro el año siguiente (Gómez et al, 2004). Existen hipótesis acerca de que hay una compensación entre la reproducción sexual y clonal, de manera que éstas pueden

cambiar en función del entorno, el grado de las características de perturbación y de la dinámica poblacional (Gómez et al, 2009).

La floración se produce al final del verano (entre agosto y septiembre) y la flor se desarrolla a partir de un nuevo bulbo subterráneo que crece junto y a partir del correspondiente al año anterior como se representa en la Figura 3a. Inmediatamente después y una vez que se han marchitado las flores, emergen de la superficie tres (rara vez cuatro) hojas, que permanecen verdes durante el otoño, invierno y hasta el final de la primavera. El ovario subterráneo tarda entre ocho y diez meses en desarrollar una cápsula madura, permaneciendo bajo el suelo durante el otoño e invierno hasta mayo-junio del siguiente año, donde emerge y lleva a cabo la dispersión de sus semillas. Concluyendo con la senescencia foliar, la dispersión de semillas ocurre en el verano, mientras el corno permanece latente. Sin embargo, en algunas ocasiones las cápsulas no llegan a la superficie, por lo que las semillas pueden germinar "in situ" (Figura 3c), de manera que se desarrolla un grupo de plántulas y plantas jóvenes que dará lugar a una colonia de individuos clonales (o "neighborhood") (Figura 3d) (Gómez et al, 2004).

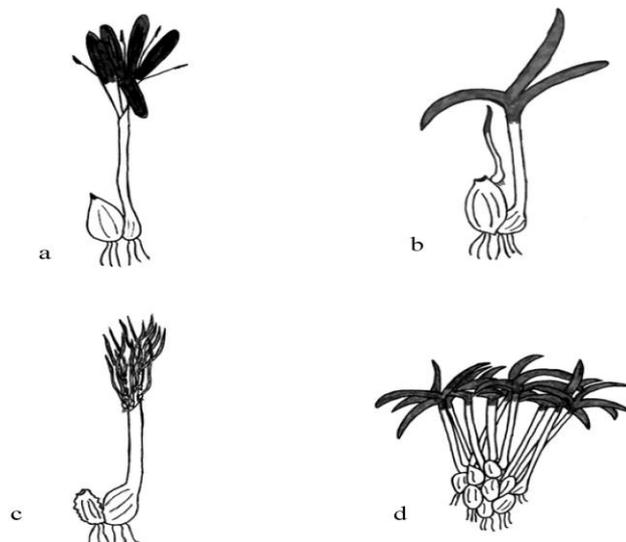


Figura 3. Reproducción sexual y asexual *Merendera montana*. Fuente: Gómez et al (2004).

La anacronía de la emersión de las hojas y la floración define a esta planta como histeranta. En consecuencia, no hay órganos aéreos presentes durante la temporada de verano, cuando la mayoría de las plantas de montaña crecen y florecen en este periodo que les resulta el más favorable en cuanto a condiciones climáticas y humedad del suelo. Esta fenología se adapta a un clima mediterráneo, que crea condiciones duras en verano debido a las altas temperatura y la sequía. Por el contrario, en las altas altitudes de los

Pirineos, este desarrollo fenológico obliga a la planta a permanecer con las hojas verdes a través del otoño, invierno y primavera y hacer frente al periodo de nieves (Gómez et al, 2009).

En la Figura 4 se muestra el ciclo anual de *M. montana* descrito anteriormente, a 2000 y 200 metros de elevación, para poder observar las diferencias temporales que existen en la fenología de estas plantas a lo largo del gradiente de elevación (Gómez et al, 2009).

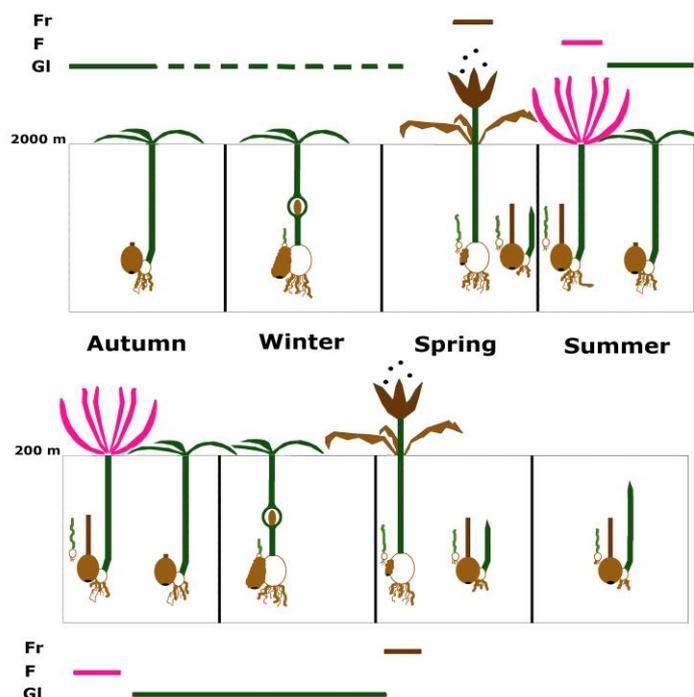


Figura 4. Ciclo anual de la *Merendera montana* a 2000 y 200 metros de altitud.

Fuente: Gómez et al, 2009)

El hecho de que esta especie vegetal presente sus hojas en otoño, invierno y primavera, podría corresponderse con el desarrollo y crecimiento asíncrono, otro conocido sistema de defensa frente a la actividad de los herbívoros. Con él, algunas plantas son capaces de hacer coincidir las etapas más importantes de su desarrollo, con las épocas de mínima actividad de los herbívoros, evitando al máximo su consumo, pisoteo y estercolado (Azorín et al, 2008).

M. montana vive en suelos de distinta naturaleza, aunque parece preferir los que se desarrollan en sustratos calizos (Gómez et al, 2003); las poblaciones que muestran mayores densidades poblacionales se dan en suelos perturbados, bien por severos regímenes de compactación (como las causadas en pistas de montaña por el tráfico estacional de vehículos), o bien por la actividad excavadora de micromamíferos (Gómez et al, 2009).

La distribución a nivel nacional de esta especie se puede observar en la Figura 5.

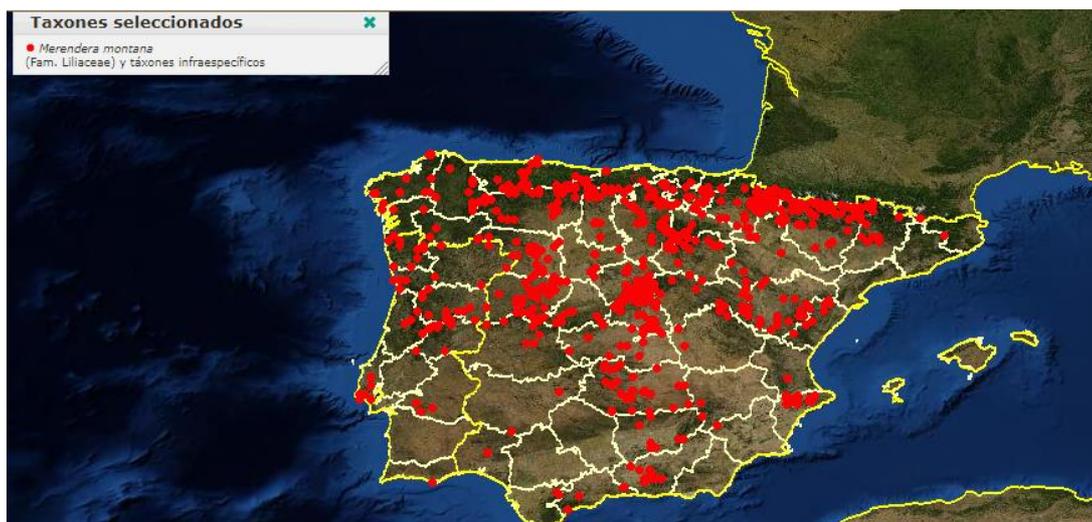


Figura 5. Mapa de distribución de *Merendera montana* a nivel nacional.

Fuente: ANTHOS, 2012.

Por último, en la Figura 6 se muestra la distribución de la *M. montana* en la Comunidad Autónoma de Aragón. En él se puede apreciar lo que se ha comentado anteriormente acerca de su distribución desde zonas de escasa altitud a los Pirineos (200 a 2300 metros aproximadamente).

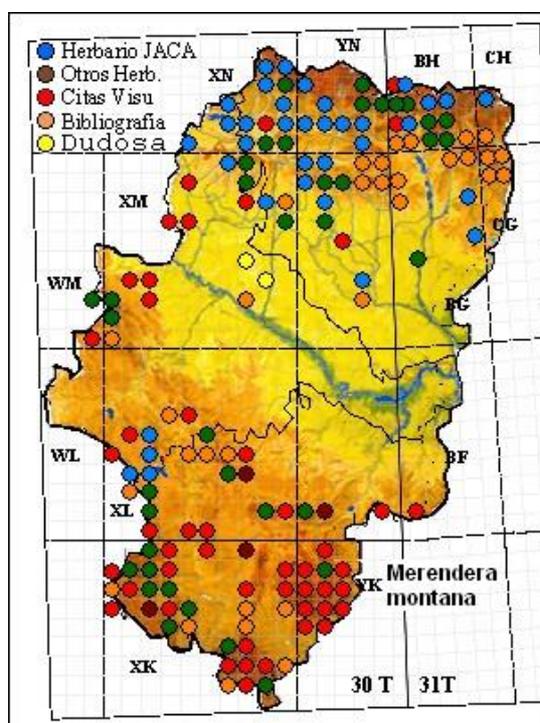


Figura 6. Mapa de distribución de *Merendera montana* en Aragón.

Fuente: Atlas de la flora de Aragón (2005).

1.2 Composición química de *Merendera montana*: alcaloides tropolónicos

Para tratar de entender el éxito ecológico de esta especie en términos de ocurrencia espacial y abundancia, se han llevado a cabo diversos estudios centrados en conocer la forma en que esta especie se adapta a este amplio rango ecológico, altitudinal y climático (Gómez et al, 2003, 2004 y 2009); así como su composición fitoquímica (Ondra 1995; Rosso et al, 1998). En dichos estudios se ha revelado la presencia de distintos metabolitos secundarios, a los que las plantas destinan una cantidad significativa del carbono y nitrógeno asimilado y de energía. Entre estos metabolitos destacan los denominados alcaloides tropolónicos, objeto de este estudio.

Los alcaloides son una gran familia de metabolitos secundarios, sintetizados a partir de aminoácidos, dependiendo de la estructura específica del alcaloide (Cseke et al, 2006), que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica. La mayoría de ellos son compuestos heterocíclicos, aunque algunos son nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como sería el caso de la colchicina (Ávalos et al, 2009). Hay una gran variedad de productos de plantas diferentes que tienen nitrógeno en sus estructuras. Quizás el más diverso de estos tipos de compuestos (que se encuentran en 20 a 30% de las plantas vasculares) son los alcaloides que, como la mayoría de los otros compuestos que contienen nitrógeno, se sintetizan a partir de aminoácidos (Cseke et al, 2006).

Muchos de los alcaloides en los que se han descrito sus estructuras químicas, se caracterizan por sus propiedades en la defensa de plantas contra herbívoros y patógenos. La potente actividad biológica de algunos alcaloides también ha llevado a su explotación como productos farmacéuticos, estimulantes, narcóticos y venenos. Los alcaloides derivados de las plantas, actualmente en uso clínico, incluyen los analgésicos morfina y codeína, los agentes anticancerosos como vinblastina, la colchicina supresora de la gota, el relajante muscular tubocurarina, la ajmalina antiarrítmica, el antibiótico sanguinarina y la escopolamina como sedante. Otros alcaloides importantes de origen vegetal son por ejemplo la cafeína, la nicotina, la cocaína o la heroína (Facchini, 2001). La química de los alcaloides del género *Colchicum* ha sido ampliamente revisada debido a sus características estructurales únicas y su amplia actividad biológica (Rosso et al, 1998).

En cuanto a la clasificación de los alcaloides, existen formas muy diversas en función del punto de vista de los autores. En numerosas ocasiones la clasificación se basa en los anillos presentes en la molécula, de manera que encontramos: alcaloides isoquinolécicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos

y alcaloides indólicos, como sería el caso del estudio de Facchini (2001). Como podemos observar en ningún momento aparecen los alcaloides tropolónicos, por lo que se ha optado por seguir la clasificación descrita en el trabajo de Sangster & Kenneth en 1964. En esta revisión, los alcaloides se han agrupado en líneas estructurales convencionales, de lo simple a lo más complejo en: derivados simples de amina, alcaloides tropanos, alcaloides esteroidales, porrolizidinas, quinolizidinas, imidazoles, alcaloides tropolónicos, piridina/piridona/piperidina alquídica, grupo isoquinolina, grupo amaryllidaceae, grupo quinoleico, grupo de acridina, alcaloides fenantroindolicidina/fenantroindolicidina, indoles/alcaloides de dihidroindoles, quinazolina/alcaloides de quinazolina, grupo de benxofenantridina, grupo de purinas y alcaloides misceláneos.

Es importante distinguir entre alcaloides tropanos o tropánicos y alcaloides tropolónicos, ya que la similitud de los nombres puede llevar a confusión. Los alcaloides pertenecientes al grupo de los tropanos tienen un espectro UV con máximos a 230, 274 y 281 nm (Sangster et al, 1964) y se encuentran principalmente en las plantas de la familia de las Solanáceas, incluyendo los fármacos conocidos como atropina, hiosciamina, escopolamina y la cocaína. Además, se componen de un esqueleto de azabicyclo[3,2,1]octano, siendo el nombre sistemático para el tropano el 8-metil-8-azabicyclo (Lounasmaa et al, 1993). Mientras tanto, los alcaloides tropolónicos poseen máximos de absorción en dos bandas, entre 245-260 nm y alrededor de 350 nm. Asimismo, su presencia ha sido establecida de forma confiable tan sólo en tres géneros de plantas: *Colchicum*, *Merendera* y *Bulbocodium*, todos ellos pertenecientes a la familia LILIACEAE (Yusupov et al, 1978).

Por otro lado, el grupo de los alcaloides tropolónicos se puede clasificar en dos tipos principales: el grupo colchicina y las lumicolcicinas, que se diferencian significativamente en sus espectros de absorción (Sangster et al, 1964). Debido a que la colchicina es el alcaloide más accesible en la mayoría de las especies, las propiedades de los alcaloides tropolónicos se relacionan principalmente con este compuesto (Yusupov et al, 1978). Análisis fitoquímicos dentro del género *Merendera* revelaron que los alcaloides tropolónicos constituyen los principales metabolitos secundarios (Husek et al, 1989).

Asimismo, estudios como el llevado a cabo por Ralphs et al (1997) o Gómez et al (2003), indican que la composición de los alcaloides tropolónicos experimenta una gran variabilidad según las partes de las plantas en las que se encuentre, durante las diferentes etapas de crecimiento y periodos del año.

En la Tabla 2 se pueden observar los distintos tipos de alcaloides tropolónicos que existen, junto con los compuestos que forman parte de cada grupo. Además, se incluyen

las longitudes de onda de máxima y mínima absorción UV. Los alcaloides objeto de este estudio son la colchicina, colchicósido, 3-demetilcolchicina y cornigerina, de los cuales se hablará más adelante.

Tabla 2. Tipos de alcaloides tropolónicos. Fuente: Sangster et al, 1964.

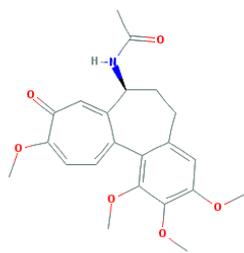
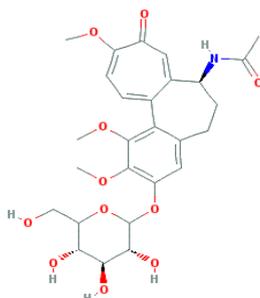
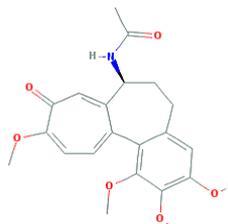
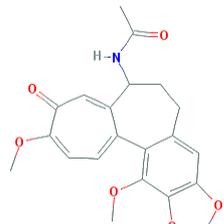
Compound	TABLE VIII TROPOLONE GROUP	
	λ_{max} , m μ	λ_{min} , m μ
	Colchicine	
Tropolone	228, 237, 320, 351	...
Allocolchicine	278	254
Colchicine	244, 351	...
Colchicine	243, 267 sh, 350, 394sh	302
Colchicine ethyl ether	233 sh, 244, 351	...
Colchicine	234 sh, 246, 355	220, 292
Cornigerine ^b	238, 353	292
Demecolceine ethyl ether	245, 350	220, 290
Demecolceine	245, 355	215, 290
Desacetylisocolchicine	244, 345	223, 279
2-Desmethylcolchicine	245, 353	220, 292
3-Desmethylcolchicine	240, 353	220, 293
N-Formyl-desacetylcolchicine	247, 350	220, 292
Isocolchicine ethyl ether	229, 247, 343	233, 283
Isocolchicine	244, 345	226, 278
Isodemecolceine ethyl ether	247, 345	234, 296
Isodemecolceine	245, 345	222, 279
Oxycolchicine	234, 281	...
	Lumicolchicines	
β -Lumicolchicine	225, 266, 282 sh, 340	248, 322
γ -Lumicolchicine	Spectrum identical with β -isomer	
Lumiisocolchicine	218, 260	...

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, la colchicina, el colchicósido y sus derivados no pueden ser detectados por otros métodos y técnicas de detección como la conductividad, fluorescencia o electroquímica (Lu et al, 2006). Sin embargo, como se puede observar en la tabla, tienen dos bandas de absorbancia de UV razonablemente fuertes con λ_{max} que se producen en la región de 245-260 nm y alrededor de 350 nm. La colchicina concretamente posee máximos de absorción a 247 y 355 nm (Capraro et al, 1984). Cotejando con esta tabla de Sangster (1964), otros estudios, como los de Rosso (1998) y Alali (2008), o el análisis realizado por el Laboratorio de Valencia con HPLC-MS, podemos advertir que el resto de los picos mayoritarios que presenciamos en nuestros cromatogramas, poseen bandas de máxima absorción similares a los de este grupo. Sin embargo, no nos ha sido posible identificar ninguno de ellos.

La colchicina y sus análogos naturales (ver Tabla 3) consisten en tres núcleos condensados con varios grupos funcionales: un anillo aromático de seis miembros con grupos hidroxilo libres o alquilados (anillo A), un anillo cicloheptadieno con un grupo

acetamido, amino o alquilamino (anillo B), y un anillo aromático de siete miembros con grupos carbonilo y metoxi (raramente hidroxilo) (el anillo de tropolona C) (Yusupov et al,1978).

Tabla 3. Alcaloides tropolónicos objeto de este estudio. Fuente: Pubchem.

Compuesto	Fórmula	Estructura química
Colchicina	$C_{22}H_{25}NO_6$	
Colchicósido	$C_{27}H_{33}NO_{11}$	
3-Demetilcolchicina	$C_{21}H_{23}NO_6$	
Cornigerina	$C_{21}H_{21}NO_6$	

En cuanto a las propiedades específicas de la colchicina, su nombre en la IUPAC es N-[(7S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-il]acetamida y posee un peso molecular de 399,44 g / mol (Nirmala et al, 2012).

Por otro lado, la colchicina tiene la característica específica, también mostrada hasta cierto punto por otras sustancias, de llevar la división celular a una parada brusca en una etapa particular. Otra faceta de la acción citológica de la colchicina se refleja en los numerosos estudios de su efecto sobre el crecimiento tumoral (Cook et al, 1952).

Con la revisión de las propiedades biológicas de la colchicina, incluyendo la toxicidad, la farmacología y los efectos citológicos generales, se puede comprobar como ejerce una acción sobre el crecimiento tumoral, los efectos que produce sobre el crecimiento de las plantas, la producción de poliploidía en plantas, los efectos sobre animales inferiores... Esto se debe a la capacidad inhibidora de este compuesto sobre las células (haciendo que se detengan en la metafase al unirse a los microtúbulos esenciales para la mitosis) y la inhibición de los leucocitos implicados en el proceso inflamatorio. Por ello, se considera un potente agente antitumoral y para el tratamiento de gota (Caprato et al, 1984).

Así pues, la colchicina es un producto natural que se puede extraer de tres géneros de plantas liliáceas: *Gloriosa superba* y de las distintas especies de *Colchicum* y *Merendera*. Sin embargo, aunque la colchicina se extrae generalmente del azafrán de prado o *Colchicum autumnale*, esta no es la única fuente natural del alcaloide. A través de la revisión bibliográfica realizada, se podrían enumerar muchas especies en las que se ha detectado la colchicina. Buenos ejemplos de ello son los estudios de Khodadoust et al, 2015 sobre optimización de la extracción de colchicina en *Colchicum haussknechtii*; el de Al-Fayyad et al, 2002 acerca de la determinación de colchicina en las especies *Colchicum hiersolymitanum* y *Colchicum tunicatum*; el llevado a cabo por Ondra et al, 1995 donde se determina el contenido de alcaloides en *C. macrophyllum*, *C. turcicum*, *C. cilicium*, *C. kotschyi*, *C. bornmuelleri*, *C. speciosum*, *C. triphyllum*; Cook et al, 1952 esta vez en *Merendera caucásica*, *Merendera sobolifera* y *Gloriosa superba*; los llevados a cabo por Gómez et al en 2003, 2004 y 2009 sobre *Merendera montana*, Hussek et al 1989 determinando alcaloides y fenoles en *Merendera kurdica* y *Merendera manissadjianii*,...

1.3 Antecedentes

Los estudios de la química de los alcaloides tienen una larga historia, que, según Clarke (1970), se remontan al asesinato judicial de Sórates en 399 AC, donde el uso de este tipo de compuestos todavía no se encontraba regulado ni limitado exclusivamente para fines medicinales. Sin embargo, no fue hasta el 78 DC cuando se registraron los primeros indicios sobre la supuesta toxicidad del género *Colchicum*, de mano de Dioscórides (Cook et al, 1952).

Gran parte de la investigación basada en la estructura de productos naturales que comenzó hace alrededor de 150 años se centró en los alcaloides, o "álcalis vegetales", como se les conocía. Las técnicas de aislamiento desarrolladas principalmente por químicos británicos y alemanes permitieron el aislamiento de muestras analíticamente puras que tenían efectos biológicos pronunciados, pero las estructuras químicas eran desconocidas. Los esfuerzos para determinar las estructuras químicas de los alcaloides comenzaron a mediados del siglo XIX y continúan hoy (Cseke et al, 2006).

Concretamente, la colchicina fue aislada por Pelletier y Caventou en 1820 y desde entonces se ha utilizado en medicina para el tratamiento de la gota, convirtiéndose además en la droga de elección en la fiebre mediterránea familiar recientemente. Desde ese momento, se han resumido las propiedades bioquímicas y farmacológicas de la colchicina y sus usos médicos mediante diversos estudios y/o trabajos (Muzaffar, 1991).

Las investigaciones en torno a la familia de los alcaloides tropolónicos fueron iniciadas en 1883 por el químico Simon Zeisel, que seguidas por las de otros trabajos, especialmente por Windaus en 1921, culminaron con el establecimiento de la composición molecular y fórmula estructural para el alcaloide colchicina (Yusupov et al, 1978). Poco después, la obra de Dustin y Lits de 1934, en la Universidad de Bruselas, reveló por primera vez las notables propiedades biológicas que posee la colchicina en la división celular (Cook et al, 1952).

Ulteriormente, la estructura tropolónica de la colchicina propuesta por Dewar en 1945, fue respaldada por varias síntesis totales revisadas y está en pleno acuerdo por los resultados obtenidos por su degradación química (Brossi et al, 1990).

Estos estudios no se vieron completados definitivamente hasta después de 1950, mediante el análisis estructural de rayos X llevada a cabo por King et al (1954) y la síntesis completa de los alcaloides de Schrieber et al en 1961. Aun así, son muchas las revisiones que se han llevado a cabo sobre el establecimiento de la estructura de la colchicina (Orekhov et al 1955; Santavý et al, 1958; Henry et al, 1961...) (Yusupov et al, 1978).

No obstante, la química de los alcaloides del género *Colchicum* fue ampliamente revisada en los siguientes cuarenta años, siendo todavía objeto de investigaciones adicionales, debido a sus características estructurales únicas y su amplia actividad biológica (Rosso et al, 1998).

Así pues, dado que la colchicina se encuentra en el cormo, semillas, flores y otros tejidos de la especie *Colchicum autumnale* (familia *Liliaceae*), es por lo que los extractos crudos de ésta se utilizaron durante muchísimo tiempo en medicina para el tratamiento de gota (Cook et al, 1952). Durante más de cien años se creyó que la colchicina era el único

principio activo de esta especie, pero un examen más detallado de esta y otras especies dio como resultado el descubrimiento de nuevos y abundantes alcaloides tropolónicos, la mayoría de ellos aislados antes de 1965 (Capraro et al, 1984).

Más adelante, una vez pudo establecerse la estructura completa de la colchicina se elaboraron estudios como el de Yusupov et al (1978), más centrado en otros aspectos como la determinación de la naturaleza y las posiciones de sus grupos en su sistema tricíclico. Así, este estudio se centra en la distribución de las plantas que contienen colchicina, los alcaloides tropolónicos aislados en ellas y las transformaciones químicas de estos compuestos.

En dicho estudio se observó que existe una gran cantidad de géneros pertenecientes a la familia LILIACEAE (*Colchicum* L., *Merendera* Ramond. *Bulbocodium* L., *Anthericum* L., *Hemeroeallis* L., *Ornithogalum* L., *Puschkinia* Adams, *Bellevalia* Lapeyrouse. *Lilium* L., *Tulipa* L., *Eremurus* Bieb.) las cuales crecen principalmente en Europa, África y Asia.

Por otro lado, de las especies de plantas colchicáceas, se describen los 24 compuestos alcaloides más difundidos en ese momento y sus correspondientes estructuras. Entre ellos podemos encontrar N-Formilacetilcolchicina, 2-De etilcolchicina, 3-emetilcolchicina, Colchamina, 2-Demetilcolchicina, Colchicósido, Colchiceína, 3-emetil-N-deacetilcolchicina, Especiosina, Cornigerina... (Yusupov et al, 1978).

Mientras que los exámenes anteriores discutieron principalmente la elucidación de la estructura de la colchicina y algunos de sus alcaloides menores, así como su síntesis total y propiedades biológicas, el trabajo de Capraro et al (1984), considera nuevos congéneres, la aplicación de éstos en la determinación estructural, la química de la colchicina misma, y su conversión en alcaloides menores. Se hace hincapié también en los efectos biológicos de la colchicina, su modo de acción y la exploración de las características estructurales que afectan a la unión a tubulina y su toxicidad. Sin embargo, las plantas investigadas más tarde produjeron relativamente pocos alcaloides tropolónicos nuevos.

Las colchicinas fueron revisadas por Boyé y Brossi en 1992, las cuales apenas se han actualizado desde entonces (Larsson et al, 2014). Como bien señalaba Poutaraud (1995), apenas se conocían datos sobre los factores que interfieren con la biosíntesis de los alcaloides de este tipo, impidiendo domesticar a las plantas del género *Colchicum* y existiendo grandes dudas acerca de su inusual biología. Así, los hallazgos encontrados desde 1984 en química y farmacología de la colchicina han sido reunidos en trabajos como el de Boyé et al (1992) o alguno más actual como Nirmala et al (2012).

Hoy en día la colchicina sigue siendo la droga de elección para aliviar los ataques agudos de gota; además, la colchicina y sus análogos se utilizan clínicamente para el tratamiento de ciertas formas de leucemia y tumores sólidos. Debido a su potente afinidad con la tubulina, la colchicina se utiliza en estudios biológicos y de cría para producir poliploidía, multiplicación de los cromosomas en el núcleo celular y ensayos de unión a tubulina como control positivo (Al-fayyad et al, 2002).

Finalmente, cabe señalar que a pesar de existir tres géneros de plantas a partir de los cuales es posible obtener este tipo de alcaloides tropolónicos, el género *Colchicum* es sin duda el más estudiado hasta la actualidad, a diferencia de *Merendera* y *Gloriosa*. Por ello, el Instituto Pirenaico de Ecología lleva varios años trabajando con *Merendera montana*, una de las especies más ampliamente distribuidas por todo el territorio aragonés, muy relacionada con el género *Colchicum* (incluye cerca de diez especies en Europa, África y Asia), que se caracteriza por presentar este tipo de alcaloides y de la cual apenas se ha estudiado la composición química previamente. De esta manera, lo que se pretende es incrementar la información acerca de esta especie, ya que también puede suponer una fuente natural de este tipo de compuestos en un futuro.

Hasta la fecha, el equipo de investigación del IPE ha llevado a cabo diferentes trabajos que van a servir de punto de partida para este estudio. Entre ellos destacan el de Gómez et al 2003, centrado en las variaciones estacionales y espaciales que sufren los alcaloides en *M.montana*; el de Gómez et al 2004, que estudia el efecto de las perturbaciones causadas por pequeños mamíferos excavadores sobre la estructura y dinámica de las comunidades vegetales, y Gómez et al 2009 acerca de la posible relación entre el rendimiento de la vegetación y los disturbios a pequeña escala y elevación.

Tras la lectura de los estudios llevados a cabo por Gómez et al en 2003, 2004 y 2009, nuestro objetivo es realizar un estudio que indague en la posible relación del contenido en alcaloides tropolónicos en la planta con los diferentes recursos nitrogenados en los suelos donde se desarrolla.

1.4 Métodos analíticos para la determinación de alcaloides tropolónicos en material vegetal

Debido a que no existe un método analítico estándar para la determinación de alcaloides, y más concretamente de alcaloides tropolónicos, en material vegetal, ya que depende del compuesto concreto del que se trate y del medio en el que se vaya a medir, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre las metodologías analíticas existentes para tal fin. Generalmente, estas metodologías consisten en un tratamiento químico de la

muestra que permita extraer las especies alcaloides a estudiar, seguido de la aplicación de una técnica cromatográfica para su separación, identificación y cuantificación.

Durante muchos años, diferentes procedimientos de extracción, purificación y separación se han utilizado para el aislamiento de alcaloides en material vegetal, y las ventajas y desventajas de los métodos fueron discutidos críticamente, elaborándose procedimientos más simples. Se evaluaron los métodos de análisis de la colchicina, descritos en varias farmacopeas, y se propusieron las modificaciones apropiadas. Se descubrió como la presencia de alcaloides tropolónicos puede detectarse en el espectro UV a 352 nm. Para el análisis cualitativo, se describieron técnicas cromatográficas en papel y en capa fina, utilizando alúmina o gel de sílice. Para la separación de alcaloides de *Colchicum* se utilizó también cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fases normales o reversas y fue particularmente útil para separar colchicina de sus análogos. El análisis por HPLC de muestras comerciales de colchicina reveló la presencia de alcaloides menores (Caprato et al, 1984).

La extracción es un paso importante en la recuperación de los compuestos presentes en los materiales vegetales (Khodadoust et al, 2015). La extracción, sólido/líquido, implica la utilización de disolventes afines a los analitos y se puede llevar a cabo aplicando distintas técnicas (agitación, maceración, etc) a temperatura ambiente o aportando calor para la recuperación. Por lo general, casi todos los estudios relacionados con la determinación de alcaloides en especies de la familia *Colchicaceae* utilizan disolventes orgánicos con cierta polaridad como metanol, etanol, acetona o cloroformo y éter de petróleo en algunas ocasiones en los procesos de extracción. Por un lado, en algunos trabajos se opta por llevar a cabo una extracción sencilla que no requiere aporte de calor mediante una disolución de metanol:agua o etanol:agua (Ellington et al, 2003; Khodadoust et al 2015, Gómez et al, 2003) acompañada con agitación con ultrasonidos y/o agitación simple. Otros autores optan por las extracciones sucesivas con diversos disolventes polares mediante agitación mecánica o maceración de las muestras (Dvorkov, 1984; Alfayyad, 2002; Alali, 2004).

Uno de los métodos de extracción más utilizados con aporte de calor es el Soxhlet, el método estándar de extracción para muestras sólidas (Simánek et al 1992; Fell et al, 1966; Ondra et al 1995; Husek et al., 1990, Kannan et al., 2007; Shi et al., 2005) ya que se obtienen excelentes recuperaciones. El método Soxhlet, presenta ciertas desventajas, incluyendo el consumo de tiempo, el alto costo y la necesidad de grandes volúmenes de muestras y disolventes orgánicos tóxicos.

Cabe destacar la extracción ultrasónica o sonicación, que es el proceso más rápido en comparación con los métodos tradicionales de laboratorio, debido a la disrupción de partículas del material vegetal (Cseke et al, 2006). Ha sido utilizada en el proceso de extracción de varios analitos en diferentes matrices (Cao et al., 2009; Fan et al., 2012). Es una alternativa barata, sencilla y eficiente a las técnicas de extracción convencionales y se propone como un procedimiento alternativo para el pretratamiento de muestras como metodología más verde que permite una alta reproducibilidad en menos tiempo, fácil manipulación, reducción significativa en el uso de disolvente orgánico a baja temperatura con menor energía (Khodadoust et al, 2015).

Finalmente, comentar que, dentro de las nuevas técnicas de extracción, está la extracción con fluidos supercríticos con CO₂ como una alternativa a la utilización de disolventes orgánicos, técnica cada vez más utilizada por la industria farmacéutica (Ellington et al, 2003).

En cuanto a las técnicas analíticas, son varias las técnicas que se han desarrollado a lo largo del tiempo para la identificación y determinación de colchicina a niveles de traza, tales como la voltametría (Fourier et al., 1994), la espectrofotometría (Singh et al., 2000) y diversas técnicas de cromatografía líquida (Watterson et al., 2014, Al-Fayyad et al., 2002). Hoy en día, son las técnicas cromatográficas las más utilizadas para separación de alcaloides, la purificación y la identificación de los mismos. Y en concreto, es la HPLC la que presenta más prestaciones en cuanto a selectividad y sensibilidad.

En HPLC, para la separación de estos compuestos se trabaja en fase reversa, con columnas apolares tipo C₁₈ y fases móviles polares, generalmente mezclas de disolvente en gradientes lineales. En la mayoría de los casos se trabaja con temperaturas de columna en torno a 30-35°C, para favorecer la separación y se utilizan precolumnas para eliminara interferencias. (Ellington et al, 2003; Gómez et al, 2003; Poutaraud et al, 2006; Gumustas et al, 2015),

Es muy importante seleccionar la composición de la fase móvil para que la separación de estos compuestos sea efectiva. En la mayoría de los estudios emplean mezclas de acetonitrilo (CH₃CN) con agua y/ometanol (MeOH) y con distintas proporciones de ácido ortofosfórico, ácido acético (CH₃COOH) o tampón de fosfato para favorecer la separación (Ellington et al, 2003; Alali et al, 2004; Khodadoust et al, 2015; Nirmala et al, 2012; Gómez et al, 2003). En otros trabajos se utilizan fases móviles compuestas de metanol y agua, con pequeñas porciones de ácido fórmico (CH₂O₂) o trietilamina (N(CH₂CH₃)₃) (Ondra et al, 1995; Poutaraud et al, 2006; Gumustas et al, 2015; Alfayyad et al, 2002).

Tras la separación cromatográfica, existe la posibilidad de que los compuestos sean identificados por dos sistemas de detección. Por lo general, casi todos los sistemas de HPLC están equipados con un detector de Espectrofotometría de Absorción molecular Ultravioleta-Visible. Dado que los alcaloides tropolónicos absorben radiación electromagnética en el ultravioleta y presentan espectros muy específicos con máximos de absorción de longitudes de onda muy concretas (comentadas en el apartado anterior), este sistema de detección es el más idóneo y por tanto el más ampliamente utilizado para la identificación y cuantificación (Ondra et al, 1995; Gómez et al, 2003). (Tradicionalmente, estos detectores de UV eran de longitud de onda única, sin embargo, actualmente existen los detectores “diode-array”, que permiten el escaneo del rango completo de UV-visible, siendo de gran ventaja para la detección de productos naturales (Sangster et al, 1964), ya que pueden poseer diferencias muy grandes en sus valores máximos de UV.

Otro de los sistemas de detección acoplado a la HPLC es la espectrometría de masas, que es la herramienta más importante en la determinación estructural de compuestos orgánicos y de productos naturales gracias a su excepcional sensibilidad (Cseke et al, 2006). Sin embargo, apenas se encuentran estudios en los que se emplee este acoplamiento HPLC-MS para la determinación de alcaloides tropolónicos exclusivamente y en material vegetal. Así, Dvořáčková et al (1983) utilizan ambos detectores para la identificación de alcaloides y demás componentes presentes en *Gloriosa superba*. Hayashi et al (1988) utiliza también ambas técnicas para la detección de los alcaloides en extractos de *Colchicum autumnale*. Lu et al (2006) utilizan espectrometría de masas para determinar la presencia de colchicina, aunque en biofluidos humanos; Ondra et al (1995) donde este método es usado para la determinación de compuestos fenólicos en el género *Colchicum*; o Sutherland et al, 2002 que desarrolla un método basado en este tándem HPLC-MS para la determinación de 3-desmetilticolchicina en plasma humano. Esto puede deberse a diversas desventajas que presenta este acoplamiento, tales como la complejidad de la interpretación de los espectros de masas; que los iones moleculares son difíciles de producir, y por tanto, las fórmulas moleculares de los compuestos desconocidos son difíciles de determinar; la necesidad de eliminar la enorme cantidad de disolvente que acompaña al analito antes de su introducción en el espectrómetro, para lo cual es necesario utilizar interfases (Cseke et al, 2006).

Así pues, tras la revisión de diversos estudios encontrados a lo largo de la recopilación bibliográfica, se llevará a cabo una puesta a punto de la metodología analítica empleada para la determinación de alcaloides tropolónicos en planta de Merendera montana.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material y reactivos

A continuación, se exponen todos los reactivos y equipos de laboratorio que se han utilizado para poder llevar a cabo el presente trabajo (además del material de trabajo básico de un laboratorio, como son pipetas, probetas, vasos de precipitado, matraces aforados y frascos ámbar):

2.1.1 Material y equipos de laboratorio

- Etapa de extracción:
 - Balanza de precisión (Sartorius)
 - Baño ultrasonidos (Fungilab)
 - Centrífuga (Mixtasel)

- Cromatografía:
 - Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) equipado con un Espectrofotómetro de Absorción Molecular en el rango ultravioleta-visible “diode Array” (Waters 600 HPLC System)
 - Bomba (Waters 600 Controller)
 - Columna Waters nova-pack C₁₈ (4µm, 250 x 4,6 mm)
 - Detector UV (Photodiode Array Detector Waters 996)
 - Cromatógrafo de Líquidos de Líquidos de Alta Resolución equipado con Espectrómetro de masas (UPLC-qTOF/MS) (Waters).

- Nitrógeno Kjeldahl Total:
 - Balanza de precisión (Sartorius)
 - Digestor Kjeldahl (Grupo Selecta)
 - Destilador Kjeldahl (Büchi Distillation Unit, K-314)

- Nitratos, amonio y pH:
 - Balanza de precision (Metler)
 - Espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-240)
 - Phmetro (Thermo)
 - Tamiz de 2 mm

2.2.2 Reactivos

Para desarrollar las etapas mencionadas anteriormente, se han utilizado los siguientes reactivos:

- Etapa de extracción:
 - Metanol (CH₃OH)
 - Hexano (C₆H₁₄)

- Cromatografía:
 - Metanol (CH₃OH) (Panreac)
 - Ácido fórmico 0,1% (CH₂O₂)
 - Patrón de colchicósido (99% pureza, TRC Canadá)
 - Patrón de 3-demetilcolchicina (99% pureza, TRC Canadá)
 - Patrón de colchicina (95% pureza, Sygma)

- Nitrógeno Kjeldahl Total:
 - Pastilla catalizadora
 - Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄)
 - Ácido bórico 2% (H₃BO₃)
 - Indicador mixto (Rojo de metilo y Verde de bromocresol)
 - Hidróxido sódico concentrado (NaOH)
 - Ácido sulfúrico (H₂SO₄) (0,02465 M)
 - Carbonato sódico (Na₂CO₃)

- Nitratos, amonio y pH:
 - Cloruro potásico 2M (KCl)
 - Resinas de intercambio iónico (la mezcla de Amberlite IR120 y Amberlite IRA410)
 - Salicilato sódico (NaC₇H₅O₃) y
 - Nitroprusiatosódico (Na₂Fe(CN)₅NO.5H₂O)
 - Solución amortiguadora (a partir de citrato de sodio y NaOH)
 - Hipoclorito (a partir de hipoclorito comercial 10% cloro activo)
 - Solución estándar de amonio (a partir de (NH₄)₂SO₄)

2.2 Muestreo y preparación de muestras

2.2.1 Muestreo

Para poder realizar este trabajo de fin de grado, el primer paso es la toma de muestras de la especie objeto de estudio. En este caso, se han tomado muestras de hoja y bulbo de *M. montana* y del correspondiente suelo en el que viven. El muestreo fue llevado a cabo por el personal de Instituto Pirenaico de Ecología (IPE) durante los meses de febrero y marzo de 2017, ya que era el punto óptimo de la fenología de la planta, donde hojas y bulbo se encuentran en perfecto estado (más adelante las hojas se secan y pierden, de acuerdo con el ciclo vegetativo descrito en la Figura 4).

Para los muestreos, se seleccionaron nueve localidades, todas situadas en Aragón: Cubilar de las Vacas, Puerto de Aísa, San Juan de la Peña, Salto de Roldán, Guasillo, Montmesa, Marcen, San Mateo de Gállego y Monzón. En la Tabla 4 se indica el término municipal, las coordenadas y la altitud de cada una de ellas. De esta manera, se tiene representación de un amplio rango altitudinal, desde las zonas más altas en el Pirineo Aragonés (a unos 1600 metros) hasta las zonas más bajas como son las de Zaragoza (a 200 metros). En la Figura 7 y 8 se puede observar la ubicación de los nueve puntos en el territorio español y aragonés, respectivamente. Además, en el Anexo I se recogen la ubicación de las zonas de muestreo más detalladamente.

Junto al rango altitudinal, el criterio más importante en la elección de estas zonas de muestreo ha sido el tratar de recoger un gradiente en el contenido en nitrógeno mineral en las distintas localidades. De esta manera, y atendiendo a los tipos de vegetación dominantes en cada zona, se esperaba encontrar suelos más pobres en nitrógeno en las localidades situadas a menor altitud y más ricos en las estaciones más altas. Con este gradiente altitudinal y el de nitrógeno en suelo se pretendía abordar la relación del contenido en los compuestos alcaloides tropolónicos de *Merendera montana* con dichas variables.



Figura 7. Localización municipios de muestreo de *Merendera montana*.

Fuente: Iberprix (Instituto Geográfico Nacional).



Figura 8. Municipios de muestreo de *Merendera montana*. Fuente: IDEARAGÓN (2009).

En cuatro de las localidades indicadas la planta es escasa, por lo que únicamente se recolectó una muestra de hoja y bulbo junto a su correspondiente muestra de suelo; en los cinco restantes se recolectaron tres muestras de planta y suelo. Las zonas con tan sólo

una réplica de campo son Monzón, San Mateo de Gállego, Marcén y Montmesa, mientras que Guasillo, Salto de Roldán, San Juan de la Peña, Puerto de Aísa y Cubilar de las Vacas disponen de tres réplicas de campo. En total se recogieron 57 muestras, 19 de hoja, 19 de bulbo y 19 de suelo, teniendo en cuenta además que cada muestra de *M. montana* está formada por 20 individuos.

En cuanto a la forma en que se recolectaron estas tres réplicas de campo de la planta, en los lugares en los que fue posible, se intentó que éstas estuviesen lo más alejadas posible unas de otras, pero siempre manteniendo la homogeneidad de la zona en cuanto a la topografía y vegetación. En el caso de las muestras de suelo se utilizó el mismo criterio, siendo tomados a cinco centímetros de profundidad e inmediatamente debajo de las plantas muestreadas.

En la Tabla 4 se muestra un resumen de las características climatológicas, precipitación y temperatura media anual, en las coordenadas y altitud en las que se encuentra cada una de las zonas de muestreo, para que se puedan apreciar las diferencias.

Tabla 4. Características climatológicas y coordenadas de las zonas de muestreo. Fuente: AEMET.

Localidades	Fecha de muestreo	Coordenadas UTM	Altitud (m)	Periodo de 30 años		Año de estudio (2016-2017)	
				T _m (°C)	Pp _m (mm)	T _m (°C)	Pp _m (mm)
Cubilar de las Vacas	20/03/2017	X: 698505 Y: 4729264	1603	9,18	1258,88	8,71	1081,21
Puerto de Aísa	21/03/2017	X: 697405 Y: 4734859	1557	10,00	1080,38	11,18	1171,20
San Juan de la Peña	16/03/2017	X: 691802 Y: 4787470	1208	12,32	587,20	15,25	576,21
Salto de Roldán	21/02/2017	X: 715652 Y: 4681519	1009	13,70	680,20	10,23	989,07
Guasillo	23/02/2017	X: 698825 Y: 4716606	806	11,18	783,33	9,88	749,93
Montmesa	21/02/2017	X: 692430 Y: 4669154	427	13,80	425,35	12,74	543,93
Marcén	14/02/2017	X: 725709 Y: 4645912	405	14,66	419,03	13,69	52,34
San Mateo de Gállego	14/02/2017	X: 918 Y: 387	288	14,98	347,78	14,17	327,29
Monzón	02/2017	X: 259518 Y: 4647725	278	14,69	391,72	14,4	367,29

Para la obtención de estas medias, se ha necesitado de la colaboración de la Agencia Estatal de Meteorología de Aragón, la cual nos ha facilitado series de datos de 30 años, de las estaciones meteorológicas más cercanas a las localidades de estudio. Gracias a ella, se dispone de series de datos lo suficientemente prolongadas en el tiempo como

para que las medias anuales obtenidas sean representativas para la descripción general del territorio. Esta serie abarca desde el año más reciente del cual se disponen datos completos, en este caso 2016, hasta 1986. Por otro lado, gracias a los datos proporcionados por AEMET de los años 2016-2017, también se ha podido llevar a cabo una determinación de la temperatura y precipitación media anual del año de estudio.

En cuanto a los hábitats en los que se sitúan las zonas de estudio, se incluyen ambientes áridos en Marcén, San Mateo de Gállego y Monzón correspondientes a claros de matorral y comunidades herbáceas del ámbito de la encina carrasca (*Quercus ilex* L. *ballota* (Desf.) Samp.) y la coscoja (*Quercus coccifera* L.); pastos mesófilos (*Bromion erecti*) en San Juan de la Peña; comunidades nitrófilas o majadas para el descanso del ganado (*Rumicion pseudoalpini*) en Cubilar de las Vacas y el Puerto de Aísa, pastos muy transitados y caminos en Guasillo y pastos xerófilos/mesófilos con paso ocasional de ovejas en el Salto de Roldán.

2.2.2 Preparación de las muestras

Una vez tomadas las muestras de material vegetal y suelo, es necesario llevar a cabo una etapa previa de preparación y conservación de las mismas, que fue elaborada por el personal del IPE para facilitar los análisis posteriores.

La preparación de las muestras de la especie objeto de estudio, tanto de hoja como de bulbo, ha consistido en un lavado de las mismas, con su correspondiente secado en estufa de aire a 40°C, durante 3-4 días. Una vez secas, es necesaria su molienda con un molino de bolas para disminuir su tamaño y poder obtener muestras homogéneas. Secas y molidas, ambos tipos de muestra se guardan en pequeños botes de plástico, con una etiqueta con la zona donde fueron recogidas cada una ellas, la fecha y su correspondiente número de réplica (Figura 9). Finalmente, todas ellas se almacenan en condiciones de ausencia de luz y refrigeradas.

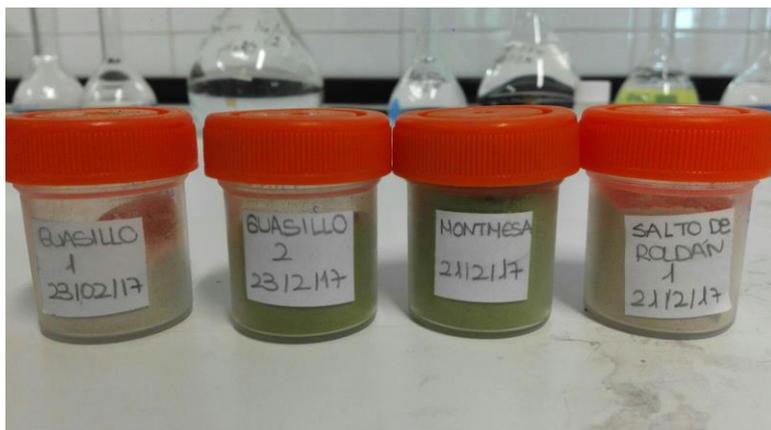


Figura 9. Recipientes con muestras de hoja y bulbo de algunas zonas de muestreo.

Por otro lado, las muestras de suelo tomadas bajo los individuos muestreados se almacenan en bolsas cerradas herméticamente, en cámara fría (4°C) y en ausencia de luz hasta su análisis. Después, los suelos frescos se tamizan con un tamiz de 2 mm y con una alícuota de 50 gramos aproximadamente se calcula la humedad de los mismos.

2.3 Metodología analítica

2.3.1 Determinación de nitratos, amonio y pH en suelos

Para la determinación del pH se ha utilizado un pHmetro, de manera que la medición se lleva a cabo en extracto de suelo fresco, tamizado con un tamiz de 2 mm y utilizando una parte de suelo con dos partes de agua desionizada (1:2 v/v).

En la determinación de nitratos y amonio, primero se realiza una extracción, tomando 5g de suelo y añadiendo 50ml con KCl 1M, durante una hora en agitador orbital. Posteriormente, se somete a un centrifugado unos diez minutos a 3000 rpm y finalmente los extractos se filtran. De esta forma, la determinación se hizo sobre dichos extractos, siguiendo el método descrito por Kaneko et al, 2010 en el caso de los nitratos, y el de Kempers et al 1986 para el amonio, ambos métodos espectrofotométricos.

La determinación de nitratos se realiza mediante espectrofotometría de absorción molecular en el UV, a una longitud de onda de 220 nm. Como el carbono orgánico disuelto (DOC) y presente en los extractos, también absorbe a dicha longitud de onda, es necesario realizar una segunda medida de corrección a 260 nm, longitud en la cual solo absorbe el DOC. Antes de comenzar, es necesario obtener los espectros de absorción de cada

extracto en el rango 200-300 nm mediante un espectrofotómetro para poder conocer la relación de la absorbancia a 220 y 260 nm, que en este caso es:

$$[\text{UV220}] \text{ NO}_3 = [\text{UV220}] - [\text{UV260}] * K_{220 / 260}$$

Aquí, [UV220] es un valor de absorbancia a 220 nm en los extractos. [UV260] es un valor de absorbancia a 260 nm en los extractos. $K_{220 / 260}$ es la relación entre la absorbancia a 220 nm y la a 260 nm originada a partir de DOC.

Seguidamente, tras medir las absorbancias en cada extracto a 220 y 260 nm, se puede estimar la absorbancia de 220 nm originada por los nitratos mediante dicha fórmula.

Para el calibrado se preparan patrones de nitratos en un rango de concentración entre 0,05 y 20 ppm. En la Figura 10 se representa la recta de calibrado obtenida.

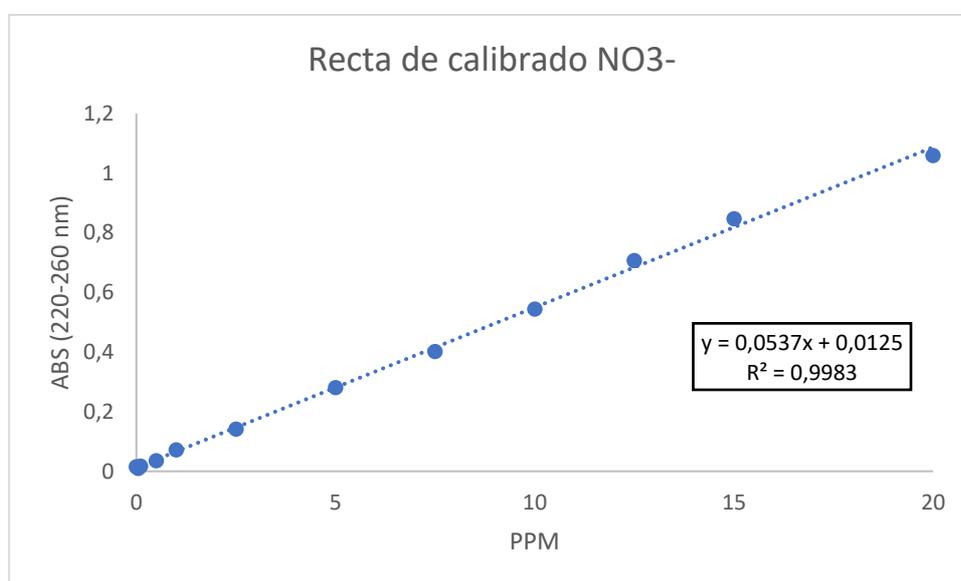


Figura 10. Recta de calibrado nitratos (NO₃⁻).

Por otro lado, la determinación de amonio se realiza mediante el método colorimétrico del salicilato de Kempers et al, 1986, consiste en la formación de un indofenol sustituido con salicilato de sodio como reactivo fenólico. Para ello, se toman 4 ml de extracto de KCl para introducirlos en un tubo de centrifuga protegido de la luz incidente (por pintura negra o en un bloque de madera con perforaciones), junto con 0,9 ml de un reactivo formado por 1 parte de salicilato sódico (elaborado a partir de NaC₇H₅O₃ y Na₂Fe(CN)₅NO.5H₂O) y dos partes de solución amortiguadora (a partir de citrato de sodio y NaOH). El tubo se introduce inmediatamente en un vortex y se añade 0,1 ml de reactivo de hipoclorito. Los tubos de la centrifuga deben permanecer en la oscuridad, a temperatura ambiente durante unos 120 minutos, hasta desarrollar el color azul esmeralda. Una vez pasado este tiempo, están listos para medir la absorbancia del cromóforo, a 647 nm.

Finalmente, la concentración de amonio en los extractos se determina también con ayuda de una recta de calibrado previamente elaborada. Para ello se preparan patrones en un rango de concentración entre 0,01 y 1 ppm. En la Figura 11 se representa la recta de calibrado obtenida.

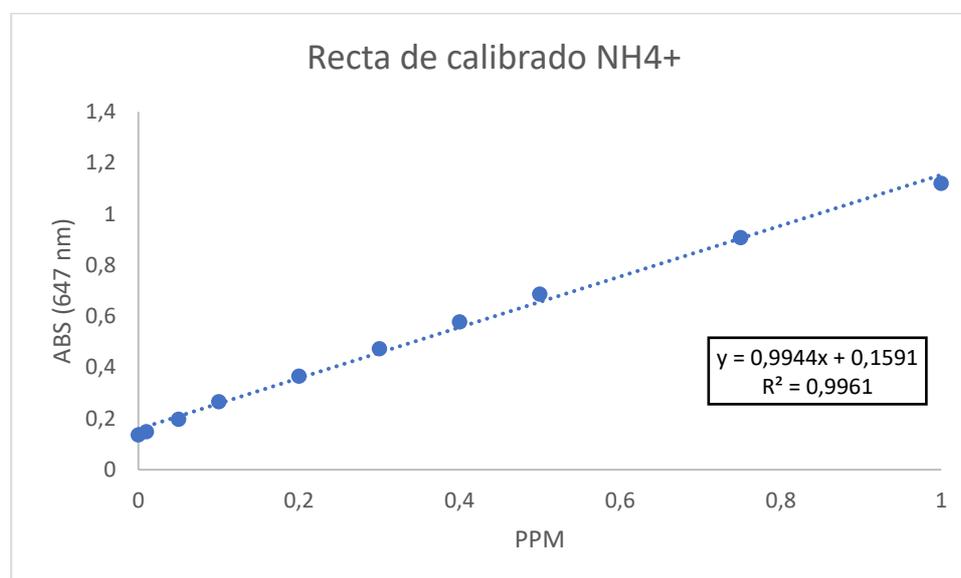


Figura 11. Recta de calibrado amonio NH₄⁺.

La razón de que se utilice KCl para la extracción de amonio es porque el potasio permite desplazar al amonio del complejo de cambio donde se encuentra retenido, de manera que se obtenga una correcta determinación del amonio intercambiable.

Finalmente, cabe señalar que tanto en la determinación de pH, como en la de nitratos y amonio, en análisis de cada muestra de suelo se ha llevado a cabo por duplicado.

2.3.2 Determinación de Nitrógeno Kjeldahl Total (NKT) en hoja y bulbo en planta de *M. montana*

El método más comunmente utilizado para la determinación del nitrógeno total de una muestra es el denominado método Kjeldahl. De esta forma, el Nitrógeno Kjeldahl Total abarca el nitrógeno orgánico junto al nitrógeno amoniacal, debido a que otras especies nitrogenadas como los nitratos y nitritos se consideran pequeñas fracciones despreciables (Garrido, 1993).

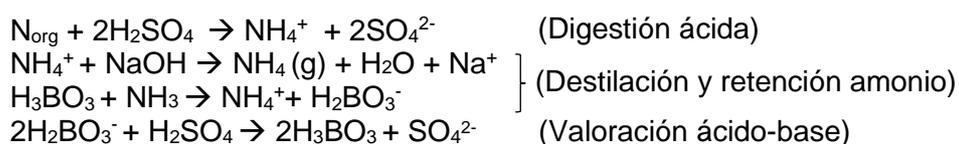
Para comenzar, la muestra se descompone mediante una digestión en medio ácido y a ebullición, por lo que se transpasan 0,2 g de la muestra a tubos digestores y se añaden 10 ml de ácido sulfúrico concentrado junto con una pastilla de catalizador que acelera el

proceso. Las muestras permanecen alrededor de una hora en el digestor hasta una temperatura máxima de 420°C, cuando el color de la disolución torna a transparente, señal de que se ha completado la digestión total de la muestra.

Una vez finalizada la digestión, se sacan los tubos del digestor y se dejan enfriar antes de proceder a la destilación. En el aparato destilador se coloca, por un lado, un erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico (H_3BO_3) al 2% junto con tres gotas de indicador mixto, y por otra, uno de los tubos al que se añade sosa concentrada (NaOH). El destilado se recoge en el erlenmeyer, una vez el indicador ha virado a verde.

Por último, el destilado contenido en el erlenmeyer se valora con una disolución de ácido sulfúrico 0,025 M, previamente estandarizada, hasta que se produce nuevamente un viraje a rosa.

Para conocer la cantidad de NKT presente en las muestras, se deben tener en cuenta las siguientes reacciones químicas:



2.3.3 Determinación de alcaloides tropolónicos en hoja y bulbo de *M montana*

En primer lugar, se desarrolla el método de análisis aplicado a las hojas y bulbos de *M.montana* para la determinación de los compuestos alcaloides tropolónicos seleccionados para el estudio. El método requiere una etapa previa de extracción seguida de la separación y cuantificación de los compuestos extraídos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Seguidamente se muestran los ensayos previos realizados para la puesta a punto tanto del método de extracción como de la separación cromatográfica.

2.3.3.1 Método aplicado

Se describe el procedimiento de extracción, las condiciones cromatográficas empleadas para la separación y cómo se lleva a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo mediante HPLC-UV.

Procedimiento de extracción

El procedimiento de extracción es el siguiente. Se pesan 0,2 gramos de hojas y bulbo secas y trituradas, se depositan en un tubo de ensayo ámbar, se adicionan 5 ml de metanol y se lleva a un baño ultrasonidos durante 45 minutos. Posteriormente, se centrifuga durante 10 minutos para favorecer la decantación del material vegetal y facilitar la retirada del extracto metanólico. Tras dejar reposar unos minutos en la nevera. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se traspasa el extracto y se filtran antes de su paso a un vial ámbar con un filtro de jeringa. En el caso de los extractos de hojas es necesario diluir una alícuota al 50% con metanol en otro vial ámbar antes de introducirlo en el HPLC. Los extractos se guardan en nevera hasta su análisis.

Cuantificación de alcaloides en extractos

Se dispone de patrones sólidos de tres de los cuatro alcaloides seleccionados (colchicósido, 3-demetilcolchicina y colchicina). A partir de los mismos, se prepararon disoluciones patrón madre para cada compuesto, en metanol, en concentración de 1000 mg/L. A partir de las disoluciones anteriores, se preparan, por un lado, disoluciones patrón individuales diluidas en metanol, y, por otro lado, disoluciones multipatrón en la cual estarán los tres compuestos citados. Para la preparación de las disoluciones multipatrón se toma un volumen conocido de cada uno de los patrones individuales en función de la concentración que se desea obtener y se añade metanol hasta obtener un volumen final de 2 ml de disolución.

La preparación de estas disoluciones patrón y multipatrón, se lleva a cabo gravimétricamente, empleando una balanza de precisión, por lo que las concentraciones de cada compuesto en la disolución se pueden calcular en $\mu\text{g/g}$ (además de en mg/L), o sea, en microgramos de compuesto por cada gramo de disolución. Sin embargo las unidades que se van a utilizar en todo momento son mg/L.

A lo largo de la realización del trabajo se prepararon diferentes disoluciones multipatrón, todas ellas almacenadas en el congelador (a -18°C) con el frasco envuelto en parafilm para evitar su alteración y en condiciones de oscuridad. Este almacenamiento se lleva a cabo para intentar preservar los compuestos y evitar su degradación.

Previo análisis de las muestras de hoja y bulbo es necesario preparar rectas de calibrado con las disoluciones multipatrón elaboradas. Para ello se inyectan en el cromatógrafo cada una de las disoluciones patrón, y una vez inyectados todas, en los distintos cromatogramas obtenidos se mide el área del pico de los tres compuestos (Figura 12). El rango de concentraciones de los multipatrones va desde 5 mg/L hasta 30 mg/L. En

la Tabla 5 se muestran los datos obtenidos en el calibrado para la realización de los cálculos del proyecto (a lo largo del periodo de análisis se han efectuado varios calibrados) y en la Figura 13 su representación conjunta.

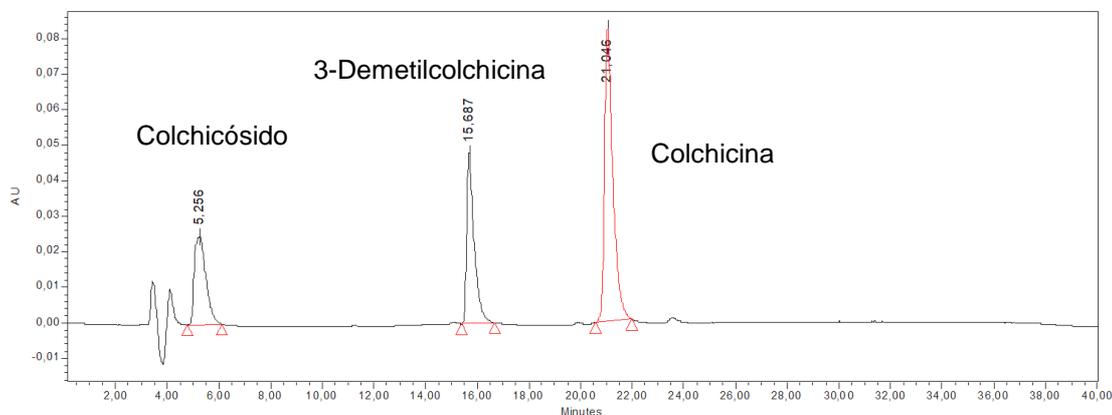


Figura 12. Ejemplo de cromatograma multipatrón de 10 ppm obtenido por HPLC-UV a 245 nm.

Tabla 5. Rectas de calibrado de los alcaloides tropolónicos de interés.

Alcaloide	Ecuación recta calibrado	R ²
Colchicósido	Y= 80961x + 47491	0,9969
3-Demetilcolchicina	Y= 112170x - 600294	0,9900
Colchicina	Y= 101340x + 124617	0,9917

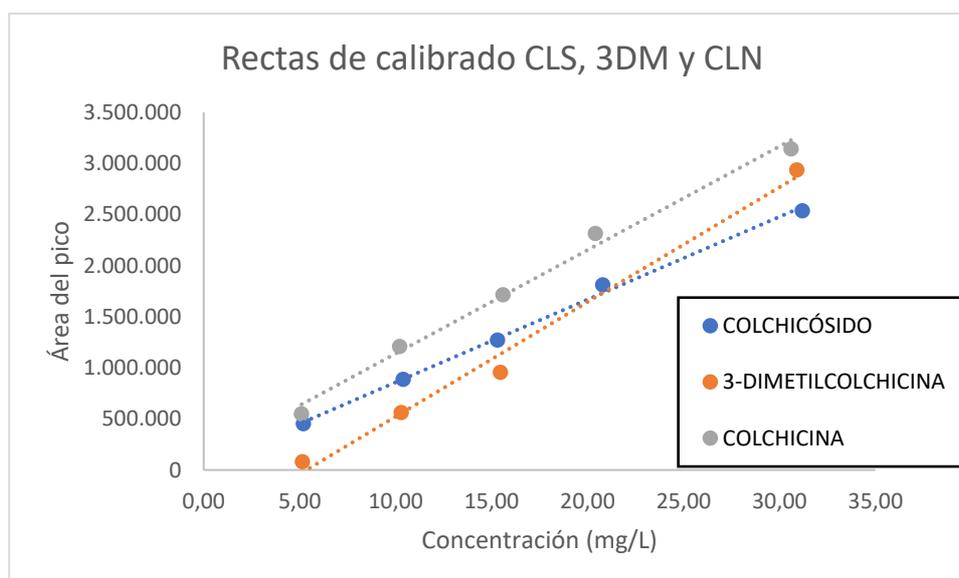


Figura 13. Rectas de calibrado multipatrón de alcaloides.

Cabe señalar que tan sólo se dispone de patrones sólidos de tres de los compuestos seleccionados: colchicósido, 3-demetilcolchicina y colchicina, a excepción de la cornigerina. La cuantificación de este compuesto se llevará a cabo con la recta de calibrado propia de la colchicina.

Separación cromatográfica de alcaloides en extractos

La separación de los compuestos contenidos en los extractos metanólicos, su identificación y la cuantificación de los alcaloides, se ha llevado a cabo mediante un equipo de Cromatografía Líquida de Alto Resolución (Waters 600 HPLC System) equipado con un Espectrofotómetro de Absorción Molecular “diode Array”. ultravioleta-visible. Todos los cromatogramas se han registrado a la longitud de onda de 245 nm debido a que es el pico de máxima absorción de la colchicina.

Para la separación cromatográfica se trabaja en modo “fase reversa”, que se basa en una fase móvil líquida polar que fluye a través de la columna con fase estacionaria apolar. Así pues, la separación que realiza este tipo de cromatografía es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas que contiene la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria, debido a la diferencia entre sus polaridades.

Las muestras son inyectadas por duplicado (tanto hoja como bulbo) en el equipo mediante una microjeringa, de manera que la fase móvil actúa de portadora de la muestra por el equipo. La fase móvil se encuentra formada por una mezcla de acetonitrilo y agua con ácido fórmico al 0,1% suministrada por una bomba cuaternaria y un programa de gradiente lineal. Para ello se preparan cuatro fases (A, B, C y D), compuestas por proporciones distintas de acetonitrilo y agua con ácido fórmico, que se irán modificando en función del gradiente aplicado. De esta manera se va variando la polaridad de la fase móvil, de mayor a menor polaridad según el porcentaje de agua. De esta manera, los compuestos presentes en los extractos van siendo retenidos por la fase estacionaria en función de su afinidad, provocando diferentes tiempos de retención, que serán característicos de cada compuesto. En la Tabla 6 se resumen las condiciones cromatográficas utilizadas y en la Tabla 7 la composición de la fase móvil y el gradiente aplicado. El hecho de utilizar mezclas con ácidos, en este caso ácido fórmico, es porque se trata de favorecer la separación de estos compuestos que son de carácter iónico.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas de trabajo en HPLC-UV.

Columna apolar	Waters nova-pack C ₁₈ (4um, 250 x 4,6 mm)
Precolumna	Altech C ₁₈
T ^a de la columna	35°C
Fase móvil polar	Acetonitrilo/Agua (0,1% ácido fórmico)
Volumen de inyección muestra	20 µl
Flujo	0,8 ml/min
Condiciones EAM uv-vis	200-400 nm

Tabla 7. Composición gradiente fase móvil HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% A	%B	%C	%D
0	0,8	100	0	0	0
5	0,8	100	0	0	0
7	0,8	0	100	0	0
12	0,8	0	100	0	0
15	0,8	0	0	100	0
25	0,8	0	0	100	0
27	0,8	0	0	0	100
35	0,8	0	0	0	100
40	0,8	100	0	0	0

* Composición de las distintas fases en %ácido fórmico y %agua(con 0,1% de ac.fórmico): Fase A= 15:85; Fase B= 25:75; Fase C= 35:65; Fase D= 50:50.

La razón por la que se lleva a cabo la preparación de las cuatro fases por separado es que el equipo empleado presenta problemas para realizar de manera automática el gradiente. Se forman burbujas lo que provoca cambios en la presión, y por lo tanto variaciones en los tiempos de retención con el consiguiente retraso de los picos y/o solapamientos de los mismos. Este problema no se ha conseguido solventar del todo, a pesar de las distintas modificaciones que se han llevado a cabo para optimizar el proceso de separación. Por lo tanto, se trabaja con un “falso gradiente”. Esta característica ha provocado algunos problemas de principio a fin durante el análisis de las muestras.

En la figura 14 se muestra un ejemplo de cromatograma obtenido en el análisis de un extracto de hoja.

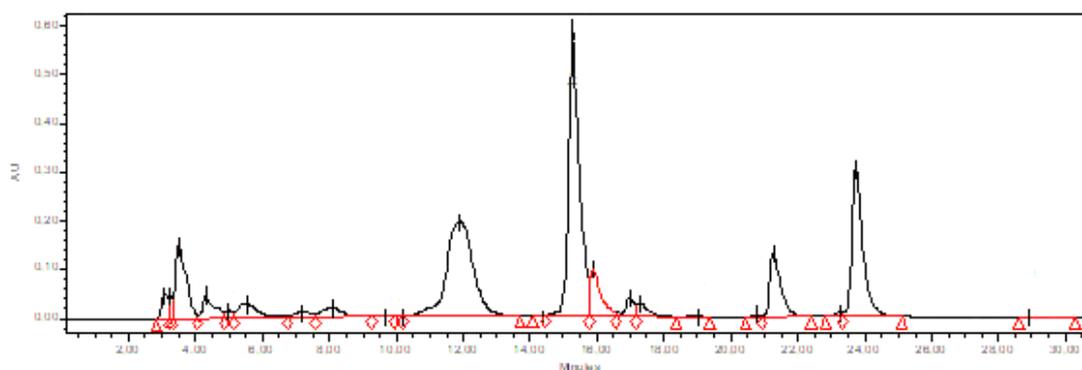


Figura 14. Ejemplo de cromatograma HPLC-UV a 245 nm para una muestra de hoja de Aísa.

Antes de escoger estas condiciones cromatográficas se han llevado a cabo varias pruebas en torno a la variación de la composición de la fase móvil, concretamente el gradiente empleado para conseguir una mayor eficacia en la separación de los compuestos. Sin embargo estos cambios de gradiente ocasionan numerosos problemas debido al desplazamiento de los picos.

Identificación alcaloides en los extractos

Seguidamente a la obtención de los cromatogramas de cada muestra, la identificación de los compuestos se lleva a cabo teniendo en cuenta los tiempos de retención y sus correspondientes espectros de absorción obtenidos en el mismo equipo instrumental (barrido de longitudes de onda) y cotejados con los espectros de los patrones certificados de dichos compuestos o con los obtenidos a través de diferentes bases bibliográficas consultadas.

2.3.3.2 Análisis mediante HPLC-MS

Para completar este estudio y poder ampliar la información sobre los compuestos presentes en las muestras a estudio y dadas las limitaciones de la técnica de Espectroscopía UV para la identificación de compuestos basados solo en los espectros de absorción, se ha realizado un análisis mediante cromatografía líquida de alta definición acoplado a un Espectrómetro de masas (UHPLC-MS, Q-TOF). Estos análisis se han llevado a cabo en el Servicio de Metabolómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC).

Para ello, se ha analizado uno de los extractos de hoja de la muestra Aisa y a través de los espectros de masas de los picos separados, se puede realizar una tentativa o confirmación de los compuestos presentes. Se ha trabajado en las dos modalidades de

ionización, en modo positivo (ES+) y en modo negativo (ES-). Además, el equipo está también acoplado a un Espectrofotómetro diode array, por lo que también se obtienen los espectros UV-vis. Con el perfil cromatográfico obtenido y comparando con nuestros análisis, o bibliografía consultada, se puede ampliar la información.

A modo de ejemplo en la figura 15 se muestra el cromatograma de un extracto de hoja (Aisa) obtenido a 245 nm. Como se puede observar, comparando con el cromatograma de la figura 16, la separación con este equipo es mucho más definida y el tiempo empleado en la cromatografía es mucho menor.

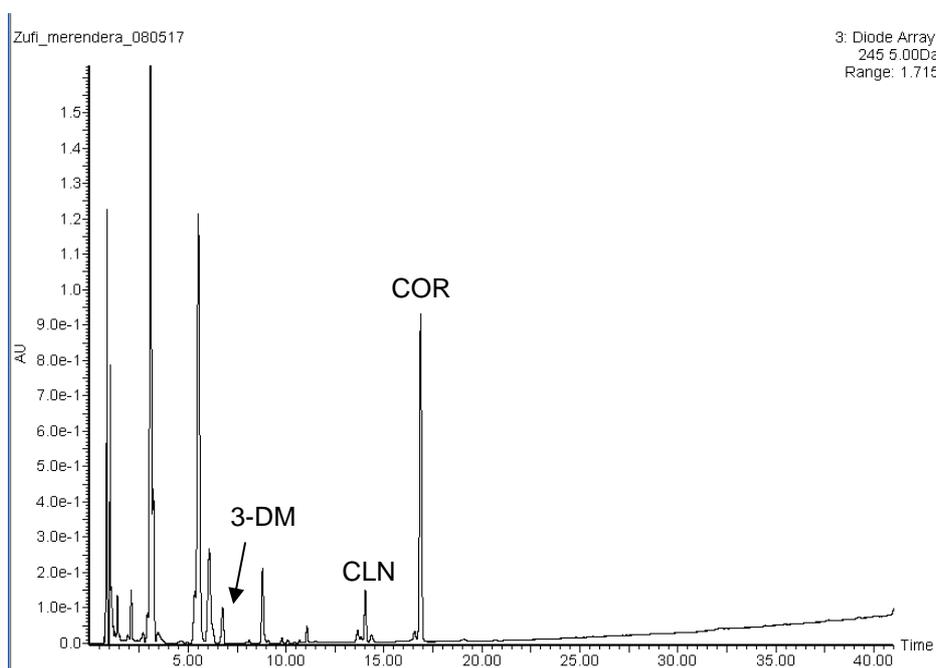


Figura 15. Cromatograma muestra hoja Aisa analizado por UHPLC-uv a 245 nm (UPV).

Las condiciones separación cromáticas y de trabajo son las siguientes:

- Columna Agilent Eclipse XD8-C18
- Fase móvil formada por agua con 0,1% de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo (fase B). Gradiente: .85% A (5 min), 85–80% de A hasta 5 min, 80–75% de A hasta 10 min, 75–65% de A hasta 10 min, 65–50% de A hasta 10 min, y retorno a 95% de A en 1 min, y acondicionamiento con 95% durante 5 minutos más.
- Flujo fase móvil: 0.4 ml/min.
- Sistema ionización espectrómetro: 300 °C y 2.9 kV. Registro de masas en el rango: 100 -1200 m/z. Modo de adquisición datos: en positivo y negativo.
- Espectrofotómetro uv-vis: longitudes de onda registro, de 200 a 800 nm.

2.3.3.3 Ensayos previos de separación cromatográfica de alcaloides mediante HPLC

Son varias las pruebas que se han realizado antes de proceder al análisis de las muestras para conseguir que la separación de los compuestos presentes en los extractos de planta sea efectiva.

La separación cromatográfica se ha llevado a cabo en todo momento en fase reversa, columna apolar y fase móvil polar. Se han empleado dos columnas cromatográficas, con y sin precolumna columna apolar C18 y fases móvil polar de distinta composición y gradiente.. nicialmente las primeras pruebas de separación cromatográfica se realizaron con la columna Terra RP18, con unas dimensiones distintas a la columna waters empleada. Los resultados no eran reproducibles y finalmente se desestimó. Las distintas pruebas realizadas en estos ensayos previos giran todos en torno a la variación de la composición de la fase móvil, concretamente del gradiente empleado para conseguir una mayor eficacia en la separación de los compuestos. Se apostó desde el principio por la fase más comúnmente utilizada en este tipo de estudios, mezcla acetonitrilo/agua (0,1% ácido fórmico) (Ellington et al, 2003; Alali et al, 2004; Khodadoust et al, 2015; Nirmala et al...). La razón de utilizar mezclas con ácidos, en este caso ácido fórmico, es favorecer la separación de estos compuestos que son de carácter iónico. Resaltar que también se probaron otras fases con mezclas de metanol y disolución tampón de fosfato pero se desestimó por los problemas ocasionados en el equipo, problemas de presión.

Se trabaja con un gradiente que partede una Fase A, formado por la mezcla de acetonitrilo/agua 15:85, hasta llegar a la Fase D, en proporción 50:50. Los tiempos se van modificando pasando por las fases intermedias, de tal manera que las separaciones pueden más o menos efectivas a la hora de evitar posibles solapamientos, lo que provoca a su vez que varíe el tiempo cromatográfico (pasando de 25 a 45 minutos). Tras todas las pruebas realizadas se seleccionaron las condiciones expuestas en la tabla 7.

Comentar que debido a la gran cantidad de cambios realizados y por lo tanto de cromatogramas obtenidos en cada una de las pruebas, se ha optado por no mostrar en la presente memoria. Al margen de esto, fueron muchos los problemas que dio el equipo cromatográfico lo que provocaba que los tiempos de retención se desplazan utilizando las mismas condiciones.

2.3.3.4. Ensayos previos de procedimientos de extracción de alcaloides en material vegetal

Tomando como referencia los artículos científicos relacionados con la extracción de este tipo de compuestos alcaloides -principalmente los de Gómez y Rosso mencionados en la introducción se han llevado a cabo una serie de ensayos para optimizar la etapa de extracción de los alcaloides del material vegetal y observar con cuál de ellos se obtienen mejores resultados. De esta manera, se trata de conseguir un procedimiento de extracción que nos permita obtener las mejores señales cromatográficas, a la vez que una reducción en la cantidad de reactivos necesarios y en el tiempo empleado.

Entre los distintos sistemas de extracción estudiados en la bibliografía consultada, se observa que normalmente los métodos de extracción sólido líquido se basan en la adición de disolventes orgánicos, con una polaridad similar a la de los analitos que se pretende extraer, y luego la mezcla es calentada o puesta en un baño ultrasonidos para facilitar la extracción. Dado que la principal forma de calentamiento es mediante el uso de un sistema Soxhlet, que implica el uso de un gran volumen de disolventes no beneficiosos para el medio ambiente, además de un tiempo de extracción elevado, se opta por el uso del baño ultrasonidos. De esta manera, se escoge la alternativa con menor incidencia sobre el medio ambiente y que requiere menor inversión de tiempo de extracción.

Así pues, se seleccionan ocho procedimientos para la optimización de la extracción, utilizando en todos ellos el metanol (MeOH) como extractante, pero con variaciones en las condiciones como: periodo de maceración o agitación previa, limpieza previa con hexano, % metanol o volumen extractante. Estos ensayos se ejecutan sobre unas muestras de hoja y bulbo aleatorias, determinando el área de los cinco picos o compuestos principales observados en los cromatogramas obtenidos. La razón de utilizar este extractante reside en que de acuerdo con los estudios similares consultados, éste es el disolvente más adecuado para la extracción de este tipo de compuestos (disolvente de carácter polar, afín a los compuestos alcaloides de estudio) (Ellington et al, 2003; Ondra et al 1995; Gumustas et al, 2015; Fahim et al, 2015; Gómez et al, 2003).

En la Tabla 8 se muestra de forma simplificada el procedimiento de cada uno de los métodos de extracción.

Tabla 8. Condiciones de los métodos de extracción de alcaloides en planta.

Método 1	0,2 g muestra +5 ml MeOH 45 min US -> extracción
Método 2	0,2 g muestra + limpieza hexano + US + 5 ml MeOH + 45 min US -> extracción
Método 3	0,2 g muestra + 5 ml MeOH + maceración noche + US -> extracción
Método 4	0,2 g muestra + 5 ml MeOH:H ₂ O (80:20) + 45 min US -> extracción
Método 5	0,2 g muestra + 10 ml MeOH + 45 min US -> extracción
Método 6	0,2 g muestra + 5 ml MeOH + 45 min US -> extracción + 5 ml MeOH + 45 min US -> extracción
Método 7	0,2 g muestra + 5 ml MeOH + 18 h agitación noche + 45 min US -> extracción
Método 8	0,2 g muestra + 5 ml MeOH + 10 min agitación magn. + 45 min US -> extracción

En todos los casos se emplea el ratio muestra/disolvente 1:25, que para minimizar la cantidad de disolvente se toman 0,2 g de material vegetal por cada 5 ml de extractante. Se incluyen dos variaciones con doble cantidad de extractante en una única etapa o en etapas consecutivas. Además uno de los procedimientos incluye la utilización de hexano, un disolvente apolar que se usa para eliminar posibles interferencias (como por ejemplo ceras) y otro añade cierta cantidad de agua al extractante para comprobar si se facilita su extracción al aumentar la polaridad. Y finalmente, se mantiene previa a la extracción con ultrasonidos, un tiempo en maceración o agitación.

La optimización del procedimiento de extracción se lleva a cabo al inicio del proyecto, a falta de patrones con los que poder llevar a cabo una identificación de compuestos. Por ello, estos ensayos se centran en hallar el método con el cual se obtienen mejores resultados en la cuantificación de la Colchicina, que es el principal alcaloide objeto de estudio. También se tendrán en cuenta los demás picos mayoritarios, señalados en el siguiente cromatograma de la Figura 16.

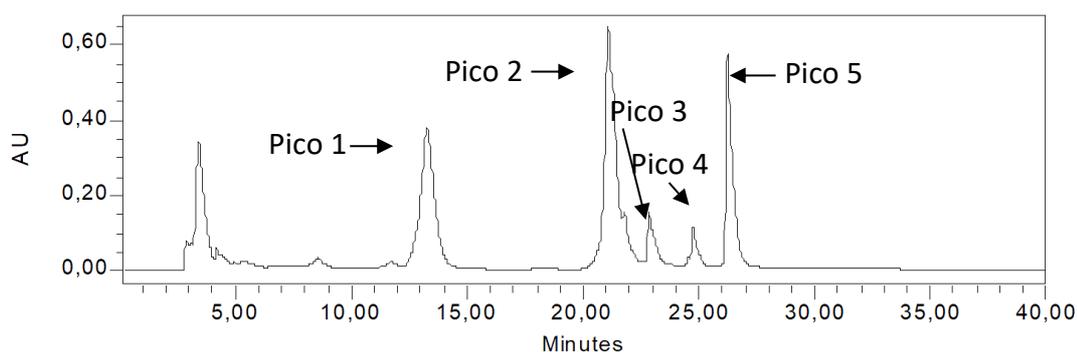


Figura 16. Cromatograma método 1 muestra hoja analizado por HPLC-UV a 245 nm.

Además, para poder obtener el espectro de la colchicina, se tomó como referencia un preparado farmacéutico (Colchimax) que contiene como principio activo colchicina, lo que permitió la identificación de ésta en uno de los picos observados en el cromatograma.

En las Figuras 17 a 21 se recogen los resultados obtenidos para cada método de extracción, es decir, las áreas registradas para cada uno de los cinco picos/componentes de las muestras de hoja.

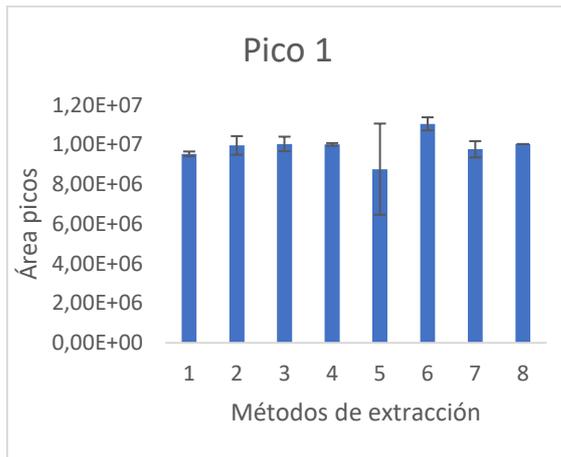


Figura 17. Resultados cuantificación pico 1 en hoja.

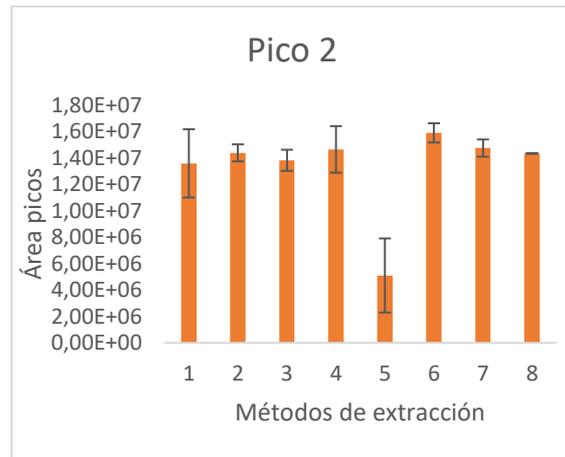


Figura 18. Resultados cuantificación pico 2 en hoja.

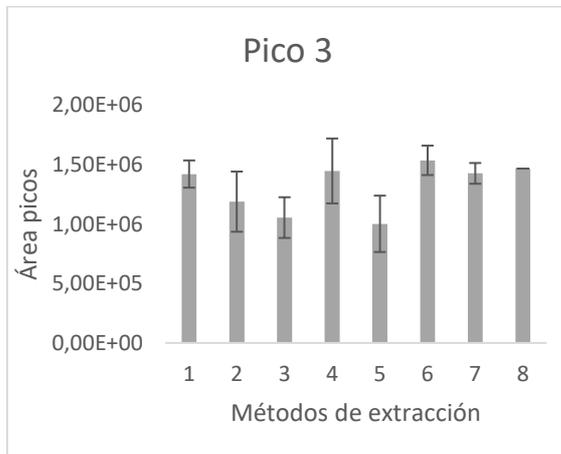


Figura 19. Resultados cuantificación pico 3 en hoja.

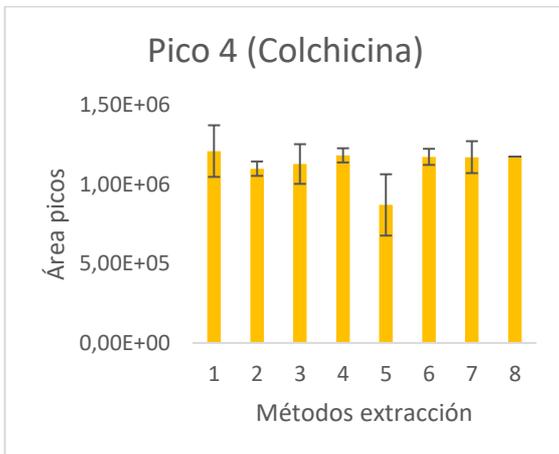


Figura 20. Resultados cuantificación pico 4 en hoja (Colchicina).

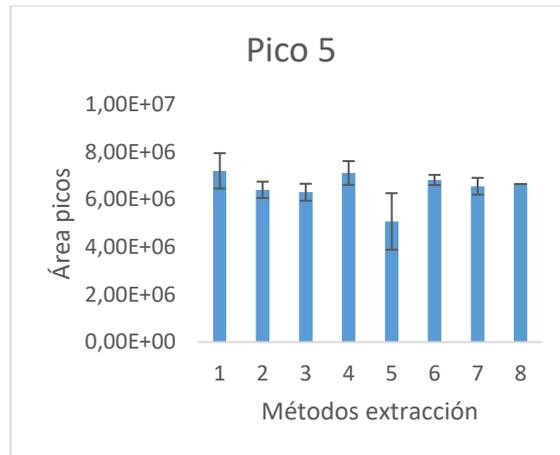


Figura 21. Resultados cuantificación pico 5 en hoja.

En las Figuras 22 a 25 se recogen los resultados obtenidos para cada método de extracción, en este caso, las áreas registradas para cada uno de los picos/componentes de las muestras de bulbo. En el caso del bulbo el tercer pico no ha sido detectado.

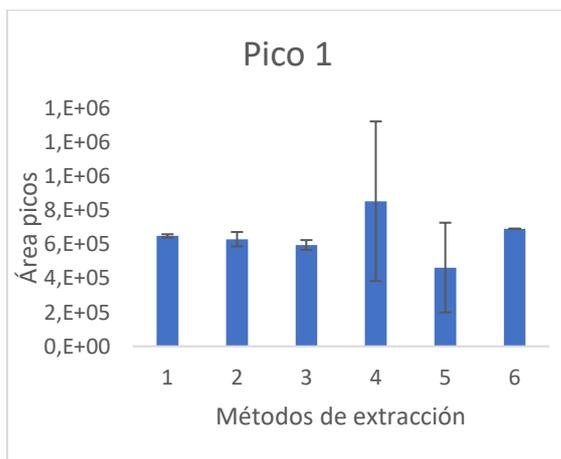


Figura 22. Resultados cuantificación

pico 1 en bulbo.

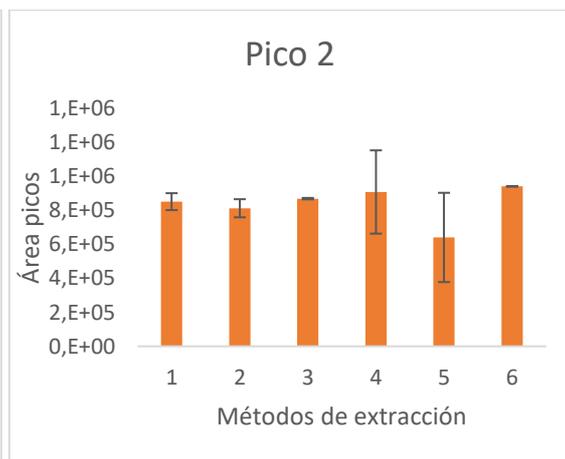


Figura 23. Resultados cuantificación

pico 2 en bulbo.

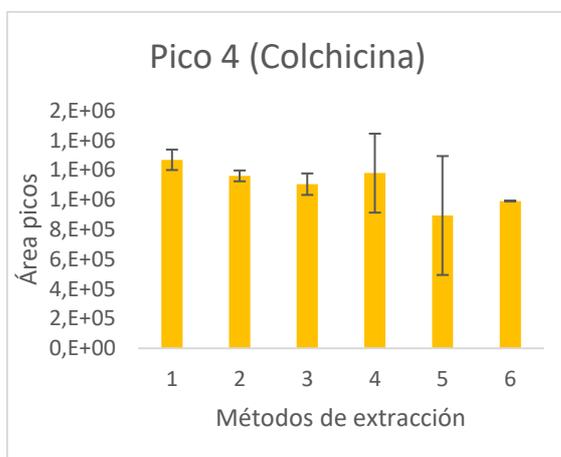


Figura 24. Resultados cuantificación

pico 4 en bulbo (Colchicina).

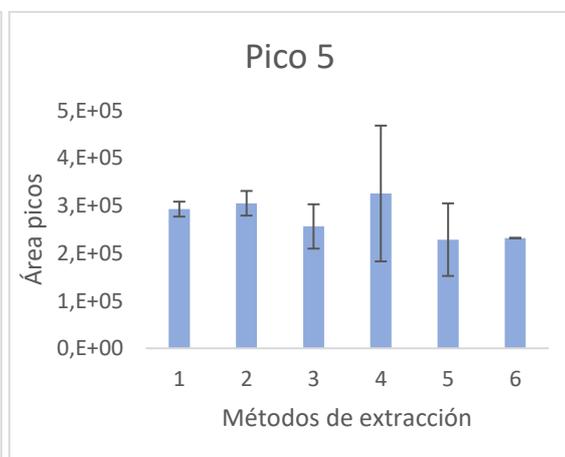


Figura 25. Resultados cuantificación

pico 5 en bulbo.

Teniendo en cuenta que los cambios de recipiente pueden provocar pérdidas de extracto o contaminación exterior, y que se usa una mayor cantidad de extractante, se toma la decisión de prescindir de los métodos 5 y 6, ya que no parecen mostrar diferencias significativas en las áreas obtenidas.

Por otro lado, el hecho de realizar una limpieza con hexano no ayuda en la obtención de mejores señales cromatográficas (o cromatogramas más “limpios”), además de ser necesarias un mayor número de etapas secuenciales, y por lo tanto, más tiempo para realizar el proceso de extracción. Por ello se descarta también el método 2.

Obviamente la maceración y la agitación requieren de una gran cantidad de tiempo, hecho que no fomenta la extracción de los compuestos, derivando en su eliminación como posibles procedimientos de extracción (métodos 3, 7 y 8).

Por último, se obtienen los métodos 1 y 4, los cuales parecen muy similares en cuanto a eficacia de extracción se refiere. Acto seguido, se llevan a cabo nuevos ensayos para corroborar cuál de estos dos métodos es óptimo para llevar a cabo la extracción de alcaloides del material vegetal. Finalmente, se toma la decisión de que el procedimiento más óptimo de extracción para la obtención de los mejores resultados en la cromatografía líquida, y que a su vez implica un menor tiempo de trabajo, es el método 1.

Finalmente se muestra un esquema (Figura 26) de las etapas llevadas a cabo para la extracción de los compuestos.

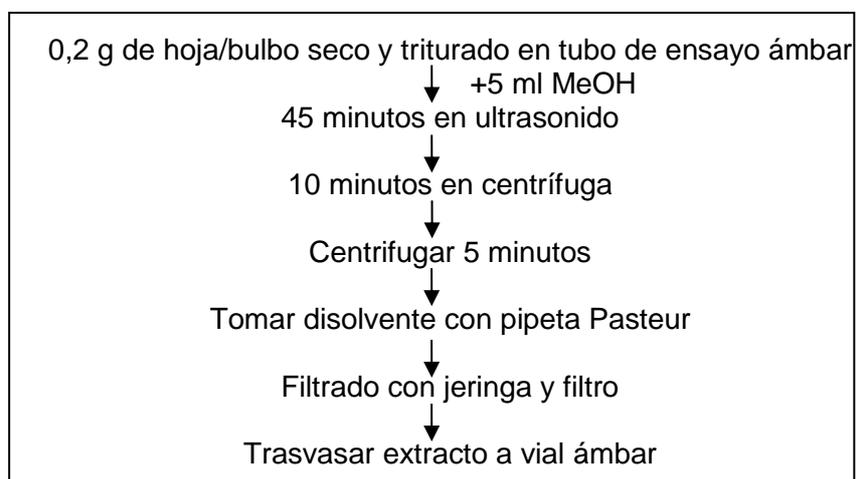


Figura 26. Proceso de extracción seleccionado para determinación de alcaloides tropolónicos en planta *Merendera Montana*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis del suelo: pH y nitrógeno inorgánico

Una de las principales incógnitas en torno a la fabricación de alcaloides, radica en conocer cuánto nitrógeno dedican las plantas para la fabricación de estos compuestos. Como ya se ha comentado, de acuerdo con la bibliografía consultada, en este estudio se parte de la suposición de que cuanto más rico sea un suelo en nitrógeno, mayor será su destinación a la síntesis de metabolitos secundarios (Stuart et al, 1990). Por ello, se lleva a cabo el estudio de la fertilidad del suelo, concretamente de los nitratos y el amonio, las formas de nitrógeno inorgánico más asimilables por las plantas.

La razón de que se haya llevado a cabo un análisis del pH de los suelos reside en que es un factor que afecta a diversas propiedades físicas, químicas y biológicas, entre las que encontramos la disponibilidad de nutrientes, la mineralización del nitrógeno y/o el grado de solubilidad de los minerales presentes en el suelo (Jordán, 2005).

Como ya se ha comentado en el apartado correspondiente, el Instituto Pirenaico de Ecología procedió al análisis de las muestras de suelo presentes en los individuos de *Merendera montana* muestreados. De esta manera, a través del procedimiento descrito, los parámetros edáficos determinados son la concentración de nitratos y amonio, así como el pH. En la el Anexo 2 se muestran más detalladamente los valores obtenidos para cada una de las réplicas de campo y de laboratorio, ya que como las muestras de suelos suelen presentar heterogeneidad, algunos de los resultados difieren. Por otro lado, en la Tabla 9 se exponen los resultados medios obtenidos para cada parámetro.

Reseñar que las muestras de suelos son muestras puntuales tomadas en el mismo momento de recolección de las plantas y diferenciadas en cuanto al tiempo de muestreo, dato a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Tabla 9. Valores de pH y concentración de nitratos y amonio (mg/kg) en las muestras de suelo.

Muestra suelo	Nitratos (NO ₃ ⁻)		Amonio (NH ₄ ⁺)		pH	
	Concentración (mg/kg)				\bar{X}	σ
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ		
CUBILAR DE LAS VACAS	85,00	13,75	9,17	0,83	5,48	0,06
PUERTO DE AÍSA	108,29	23,84	7,23	0,61	6,53	0,11
SAN JUAN DE LA PEÑA	70,69	19,91	6,90	0,97	6,91	0,78
SALTO DE ROLDÁN	87,38	33,94	7,31	3,68	7,82	0,13
GUASILLO	26,72	6,62	3,90	1,18	8,12	0,14
MONTMESA*	11,16	3,05	5,84	0,83	8,33	0,04
MARCÉN*	90,13	0,13	13,42	0,45	8,02	0,01
SAN MATEO DE GÁLLEGO*	64,99	5,02	19,34	0,19	8,16	0,04
MONZÓN*	34,64	0,42	31,99	0,52	8,69	0,03

* No hay réplicas de campo. Media y desviación estándar de las réplicas analíticas.

En la Figura 27 se muestran gráficamente los resultados de estos tres parámetros, para poder observar la variabilidad de las concentraciones obtenidas, en función de la zona a la que pertenezcan las muestras de suelo.

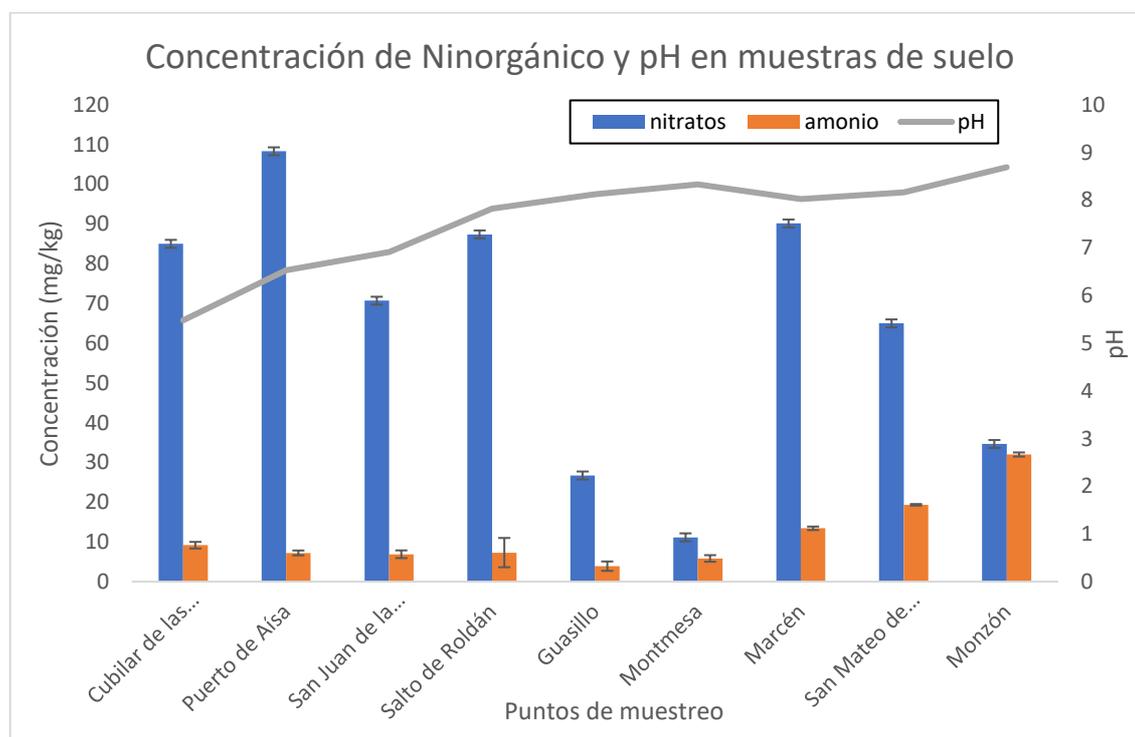


Figura 27. Comparación concentración de nitratos y amonio y pH en las muestras de suelos.

Valor medio (mg/kg) y desviación estándar.

Así pues, el nitrógeno mineral del suelo se encuentra en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), dos formas que las plantas son capaces de asimilar. Aunque de manera general muchas veces se comenta que la mayor parte del nitrógeno es absorbido por las plantas en forma de nitrato ya que el amonio se encuentra absorbido en el complejo de cambio del suelo (el amonio es positivo y los compuestos arcillo húmicos negativos), es muy difícil determinar la disponibilidad del nitrógeno del suelo para ser tomado por la planta. Por un lado, el nitrato, sufre procesos de desnitrificación hasta formas gaseosas de nitrógeno, inmovilización microbiana y lixiviación de nitratos. Por otro lado, en el caso del amonio, existe la posibilidad de que se produzca su volatilización como amoniaco, que sea absorbido por el coloide arcilloso-húmico del suelo y el proceso de nitrificación (UAM, 2008).

Si se observan los resultados obtenidos en la determinación de nitratos y amonio en suelo, se puede comprobar que en todos ellos la presencia de nitratos es mayor a la de amonio. La única excepción que se aprecia es en una de las réplicas de campo de San Juan de la Peña (Anexo 2), donde se obtiene el caso contrario (78,66 mg/kg NO_3^- y 88,04 mg/kg NH_4^+). Además, la concentración de amonio difiere considerablemente de los otros dos valores (6-7 mg/Kg frente a 88 mg/Kg). Dado que este valor tan fuera de lo común provoca una alteración considerable en la media y desviación de la concentración de amonio en este punto de muestreo, se decide prescindir de esta réplica de campo en los cálculos.

Este dato anómalo se debe posiblemente a que, en el momento del muestreo, esta zona estaría encharcada o con nieve, de manera que se crea un ambiente hidromorfo que no permiten la oxidación del amonio a nitrato y haciendo que éste aparezca en mayor cantidad. Generalmente, la presencia de nitratos en suelo suele ser mayor debido a que el ion amonio (NH_4^+) se oxida a nitrito (NO_2^-) por un proceso denominado Nitritación y posteriormente a ion nitrato (NO_3^-) por Nitratación (Garrido, 1993). Sin embargo, cabe señalar que en algunos estudios como el llevado a cabo por Badía et al (2008a), acerca de la química del suelo en zonas de majada, se encuentra que la concentración de amonio es superior a la de nitrato en este tipo de medio. Además, las zonas de mayor concentración de nitrógeno inorgánico se corresponden con la zona central de la majada, disminuyendo su concentración conforme se aleja hacia la periferia, produciéndose grandes variaciones en la concentración en un espacio de apenas 50 metros. Algo similar ocurre en otro estudio realizado por Badía et al (2008b) donde la determinación de las características de un suelo ocupado por un refugio de pastores revela que la concentración de amonio es mucho mayor a la de nitratos, reduciéndose ambas conforme se aumenta la distancia al refugio. Esto quiere decir que algunos datos pueden estar condicionados tanto por el hecho de que

se traten de muestras puntuales, como de las zonas y momentos donde hayan sido tomados.

A continuación, se analizan los resultados de cada uno de los parámetros de forma individual. Como se podrá ver más adelante, los análisis estadísticos, correlaciones y análisis multivariantes, no existen correlaciones significativas entre estos tres parámetros.

Tal y como se menciona al inicio del trabajo, la razón de elegir estas zonas de estudio concretamente reside en la suposición de que el gradiente altitudinal y la riqueza en nitrógeno de los suelos, poseen una relación directamente proporcional. Esto se debe a que la topografía o el relieve, afecta al contenido de nitrógeno del suelo a través de su influencia sobre el clima, la escorrentía, la evaporación y la transpiración. Harradine y Jenny (1958) encontraron que las cantidades de nitrógeno en los suelos de las laderas occidentales de las montañas de Sierra Nevada en California estaban relacionadas con el clima, es decir, que el contenido de nitrógeno del suelo aumentaba con la disminución de la temperatura y el aumento de la precipitación. También Knoepp et al, en su estudio de 1998, señaló que las tasas de mineralización del nitrógeno fueron mayores en los sitios de mayor elevación. Por esto, cabe esperar que el mayor contenido tanto de nitratos como de amonio sea el de Cubilar de las Vacas, y este vaya disminuyendo en el resto de los puntos de muestreo, siendo Monzón el de menor cantidad.

Comenzando por el contenido de nitratos, obviamente esto no es lo que se muestra en la Figura 27. Si bien es cierto que las zonas con mayor altitud poseen mayor riqueza en nitratos, como son Puerto de Aisa, Salto de Roldán, Cubilar de las Vacas y San Juan de la Peña (de 108,29 a 85,0 mg/kg), las zonas intermedias como Guasillo y Montmesa, poseen los valores más bajos (26,72 y 11,16 mg/kg), superados por los de las supuestas como zonas pobres o de menor contenido, Marcén, San Mateo de Gállego y Monzón (entre 90 y 34 mg/kg).

Como se puede observar, a pesar de que lo más normal sería que en las majadas, que además de estar a mayor altitud, se corresponden con zonas donde descansa el ganado, se disparara la presencia de nitratos, esto no ocurre. Por el contrario, la concentración de nitratos es mayor en una de las zonas más meridionales y áridas como es el caso de Marcén, a pesar de que la vegetación existente y característica de suelos pobres, también parecía indicar una baja riqueza en nitrógeno. Esto puede deberse a varias causas, como, por ejemplo, que los suelos de montaña se encuentren más lavados por la mayor cantidad de precipitaciones que reciben, provocando el lixiviado de los nitratos a horizontes más profundos del suelo (Garrido, 1993), o por el paso de algún ganado ovino en las zonas áridas, del cual se desconocía su existencia.

Para el caso del contenido de amonio, el comportamiento esperado tampoco se cumple de manera exacta. Los puntos con mayor riqueza en amonio se corresponden con las zonas más bajas, Monzón, San Mateo de Gállego y Marcén (31,99 a 13,42 mg/kg), seguidas de las zonas más altas (supuestamente las más ricas en NH_4^+), Cubilar de las Vacas, Salto de Roldán, Puerto de Aísa y San Juan de la Peña (9,17 a 6,90 mg/kg) y finalizando con las zonas intermedias como son Montmesa y Guasillo (5,84 y 3,90 mg/kg).

Esto seguramente también se deba a un aporte de nitrógeno provocado por el ganado que ha circulado inesperadamente por estas zonas más meridionales. No obstante, existe una gran cantidad de factores que pueden influir en esto, ya que como hemos comentado son muestreos puntuales, de manera que el muestreo se ha podido llevar a cabo en un momento en el que acababa de llover, donde se ha producido un paso de ganado recientemente, que exista variación estacional... o circunstancias totalmente contrarias.

En cuanto al pH, teniendo en cuenta que todas las localidades donde se ha llevado el muestreo se encuentran en suelos calizos, es lógico pensar que los valores de pH de todos ellos deberían ser valores por encima de la neutralidad, ya que la alcalinidad es característica en este tipo de superficies. Sin embargo, como podemos observar en el gráfico de la Figura 27, además de suelos básicos, también encontramos valores ligeramente ácidos y neutros.

Así pues, las zonas de San Mateo de Gállego, Marcén, Monzón, Montmesa, Salto de Roldán y Guasillo se corresponderían con las zonas básicas, ya que su pH está en torno a 8. Por otro lado, San Juan de la Peña y Puerto de Aísa tienen un pH más cercano a 7, osea a la neutralidad. Finalmente, la localidad de Cubilar de las Vacas es la que posee el valor más ácido, de 5,5.

Como en el caso del pH el aspecto que más influye son las precipitaciones existentes, a continuación, se expone la Figura 28. En ella se incluyen las precipitaciones (mm) correspondientes a cada zona de muestreo durante el último año previo a las fechas de muestreo, periodo comprendido entre febrero de 2016 y marzo de 2017. Recordar que la temperatura (en °C) y precipitaciones (mm) correspondiente a cada zona durante el último año 2016-2017 se encuentran en la Tabla 4.

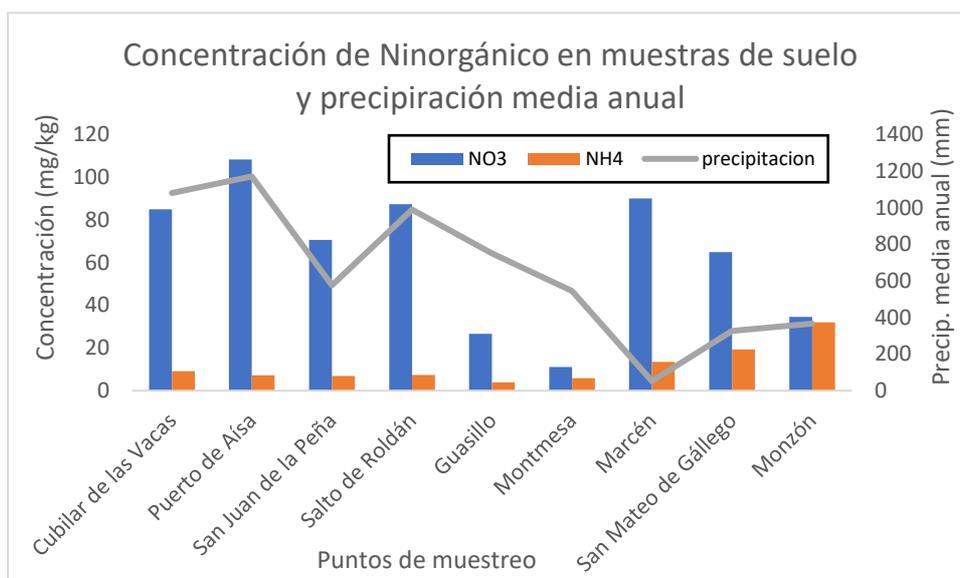


Figura 28. Variación concentración de nitratos y amonio en suelos y precipitaciones en las zonas de muestreo.

El clima influye directamente sobre el suelo mediante la humedad y la temperatura, siendo el principal agente de alteración química del suelo, así como de fragmentación mecánica de determinados tipos de sustratos (Jordán, 2005-2006). Por ello, aunque se parta de un suelo rico en bases, dependiendo del clima, el pH puede no ser tan alto como cabría esperar si existe un lavado por las altas precipitaciones.

Tal y como muestra la Figura 28, el pH experimenta un aumento conforme disminuye la altura a la que se sitúan los puntos de muestreo. Consultando los valores de pluviometría que existen en cada una de las zonas, se puede observar que este hecho coincide con que en las zonas de mayor altitud se produce una mayor cantidad de lluvias respecto a las zonas más bajas, que como ya se intuía son más áridas. De esta manera, las condiciones de alcalinidad (en torno a 8 o más) se dan preferentemente en zonas áridas o semiáridas con escasez de agua/lluvias, como es el caso de las localidades de Monzón, San Mateo de Gállego, Marcén, Montmesa y Guasillo. Los niveles de pH más neutros, en torno a 7, se encuentran en los términos medios o praderas, en los que hay mayores precipitaciones, pero no predominan excesivamente. Este es el caso de Sato de Roldán y San Juan de la Peña. Finalmente, las localidades de Cubilar de las Vacas y Puerto de Aísa son las que poseen los valores más ácidos de pH, entre 5,5 y 6,5. Estos valores son normales teniendo en cuenta que poseen una precipitación anual bastante elevada.

Cabe señalar que la mejor manera de poder obtener unos valores representativos y con los que se puedan establecer ciertas relaciones con estas variables, es llevando a cabo un análisis a lo largo de un tiempo determinado. Sin embargo, como los Trabajos de Fin de Grado suponen una limitación temporal importante, se tiene que reducir el estudio

a un análisis de la situación temporal del suelo. Para ello, se presupone una cierta constancia en la riqueza de los suelos, ya que la variación existente en los parámetros edáficos (tanto espacial como temporalmente hablando) es la regla que rige el comportamiento de los suelos.

3.2 Contenido de Nitrógeno Kjeldahl Total en planta *Merendera montana*

Dado que los alcaloides tropolónicos son compuestos nitrogenados, se ha determinado el contenido de Nitrógeno Kjeldahl Total (NKT) en hoja y bulbo de la planta *Merendera montana*. El NKT representa la cantidad total de nitrógeno orgánico (mayoritario) y amoniacal que está presente en la planta.

Como ya se ha comentado, la disponibilidad de nitrógeno en el suelo para ser tomado por la planta depende de muchos factores. Pero, a eso hay que añadirle que la absorción que lleva a cabo la raíz del nitrógeno existente en el suelo, también se encuentra condicionada por las características del medio. Así, la absorción de los nitratos por las raíces se inhibe a bajas temperaturas, y se fomenta en medios ligeramente ácidos. Por otro lado, la temperatura no parece ser un factor condicionante en la absorción del amonio, pero sí el pH alcalino, donde se absorbe mejor.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10 y se expresan como % de N en cada muestra junto con la media y la desviación obtenidas en cada una de las localidades. Además, se ha calculado el NKT total en toda la planta.

Tabla 10. Concentración de NKT en hoja y bulbo de *Merendera montana*
(valor medio en %N y desviación estándar).

Localidad	Hoja		Bulbo		Total en planta
	% NKT en muestra				\bar{X}
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	
Cubilar de las Vacas	2,67	0,09	0,93	0,19	3,60
Puerto de Aísa	2,78	0,18	1,40	0,15	4,18
San Juan de la Peña	2,38	0,42	0,64	0,26	3,02
Salto de Roldán	2,43	0,25	0,67	0,16	3,10
Guasillo	2,01	0,28	0,52	0,02	2,53
Montmesa*	1,98	0,05	0,46	0,03	2,44
Marcén*	2,28	0,00	0,70	0,02	2,98
San Mateo* de Gállego	2,54	0,07	0,70	0,02	3,24
Monzón*	2,42	0,02	0,61	0,05	3,03

* No hay réplicas de campo. Media y desviación estándar de las réplicas analíticas.

Teniendo en cuenta que el contenido en peso seco de nitrógeno en planta oscila entre el 2 y el 5%, se puede comprobar como las cantidades de NKT obtenidas en cada uno de los puntos de muestreo se encuentran dentro de este rango descrito.

Además, en la Figura 29 se representan gráficamente estos resultados, para poder observar la variabilidad que existe entre las distintas partes de la planta y entre las distintas localidades.

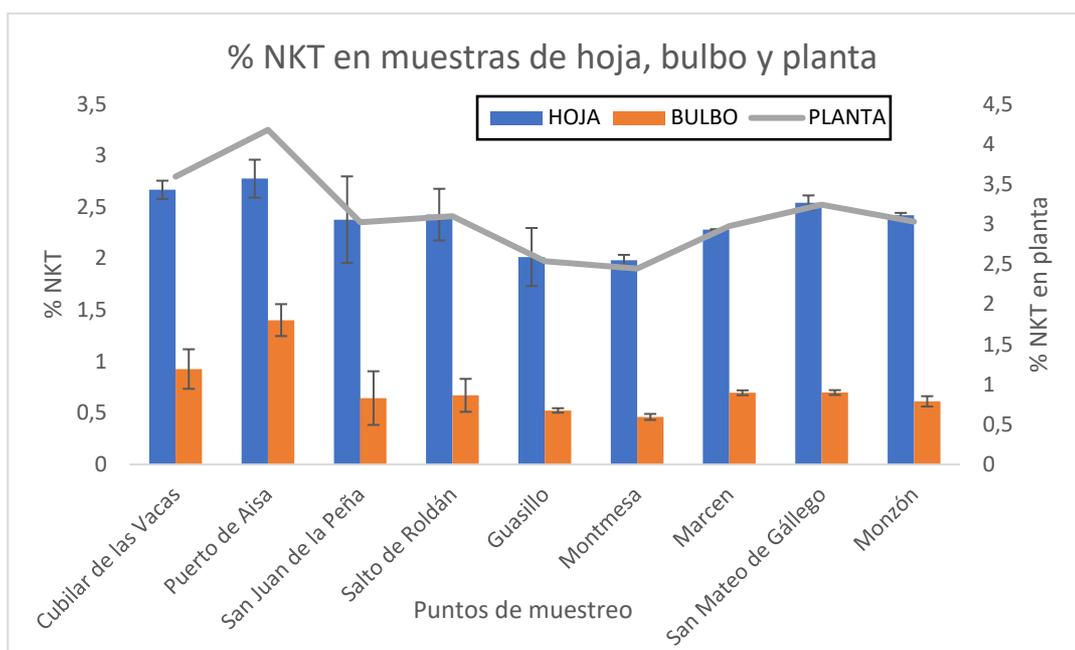


Figura 29. Porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total en hoja, bulbo y planta.

Estos datos nos indican que la cantidad de nitrógeno es mucho mayor en la hoja de la planta que en el bulbo, independientemente de la zona en la que se encuentre ésta.

Además, si tenemos en cuenta la proximidad y los ambientes en los que se sitúa cada localidad, podemos percatarnos que las zonas cercanas con características similares también poseen niveles de NKT semejantes:

- Puerto de Aísa y Cubilar de las Vacas, ambos situados en majadas de pastoreo poseen unos valores medios muy similares en hoja, aunque algo menos en bulbo.
- San Mateo de Gállego, Marcen y Monzón, todos en zonas áridas, con valores muy parecidos en hoja y prácticamente idénticos en bulbo.
- Montmesa y Guasillo, correspondientes a caminos o zonas de paso áridas, poseen casi los mismos porcentajes de NKT, tanto en hoja como en bulbo.
- Y San Juan de la Peña y Salto de Roldán, que también poseen valores análogos en hoja y bulbo.

En cuanto a la cantidad total de nitrógeno presente en la planta, se observa que no necesariamente en las zonas cuyo suelo es más fértil (dispone de mayores recursos nitrogenados) posee mayor cantidad de este recurso en sus plantas, como plantean algunos estudios (como el de Johnson et al, 1987). Esto se puede corroborar por ejemplo con Marcén, donde se observa una de las mayores concentraciones de nitrato en suelo, y, por el contrario, uno de los menores porcentajes de nitrógeno en planta.

De acuerdo con el estudio realizado por Stuart et al (1990), las plantas pueden llevar a cabo diferentes formas de acumulación y movilización de recursos a lo largo de tiempo en función de sus necesidades, tanto para crecimiento como para otras funciones. Además, existe también el fenómeno del reciclaje de recursos, el cual además de apoyar las posibles aportaciones de recursos que requiera la planta, se encarga de reducir al máximo la pérdida de éstos por descomposición.

Por otro lado, en el trabajo citado se señala que el nitrógeno se acumula normalmente bajo condiciones de alto contenido en nitrógeno en suelo y que algunas plantas productoras de alcaloides aumentan su contenido en nitrógeno en estas condiciones de superávit. Por el contrario, en condiciones de estrés de nitrógeno, algunos alcaloides se descomponen para poder favorecer al crecimiento de la planta. Si se compara el contenido de nitrógeno en planta con las reservas existentes de nitratos en suelo, se puede advertir como en general las zonas sí poseen mayor o menor porcentaje de NKT en planta en función de los nitratos presentes en el suelo. Más adelante, en el apartado de análisis estadístico se comentará en profundidad la correlación existente entre estas dos variables.

Sin embargo, el almacenamiento de reservas ha sido demostrado en solo unos pocos estudios, lo que hace muy difícil detectar cualquier patrón ecológico en el almacenamiento de reservas. No obstante, observando el ciclo vegetativo anual que experimenta esta planta, cabe pensar que en las hojas tiene que existir algún tipo de reciclado de nitrógeno, de manera que cuando éstas vayan a desaparecer, permitan el aprovechamiento de este recurso.

De acuerdo con el estudio de Stuart, durante la senescencia, sólo el 10% del peso de la hoja se pierde en material respirado o reabsorbido, y la mayor parte de esto puede explicarse por los compuestos nitrogenados reciclados. Claramente se necesitan muchos más estudios para demostrar las condiciones bajo las cuales actúa el reciclaje. Aun así, también se señala cabe la posibilidad de que este nitrógeno reciclado vaya a parar al bulbo, ya que los rizomas acumulan recursos que se reciclan de las hojas senescentes.

Adicionalmente, en este trabajo también se recalca el hecho de que el almacenamiento estacional de nutrientes se encuentra mejor desarrollado en plantas de entornos de recursos bajos.

3.3 Identificación y cuantificación de compuestos alcaloides tropolónicos en hoja y bulbo de *Merendera montana*

Identificación de alcaloides mediante HPLC-UV

A continuación, se comentan los resultados obtenidos en el análisis realizado a través del HPLC-UV.

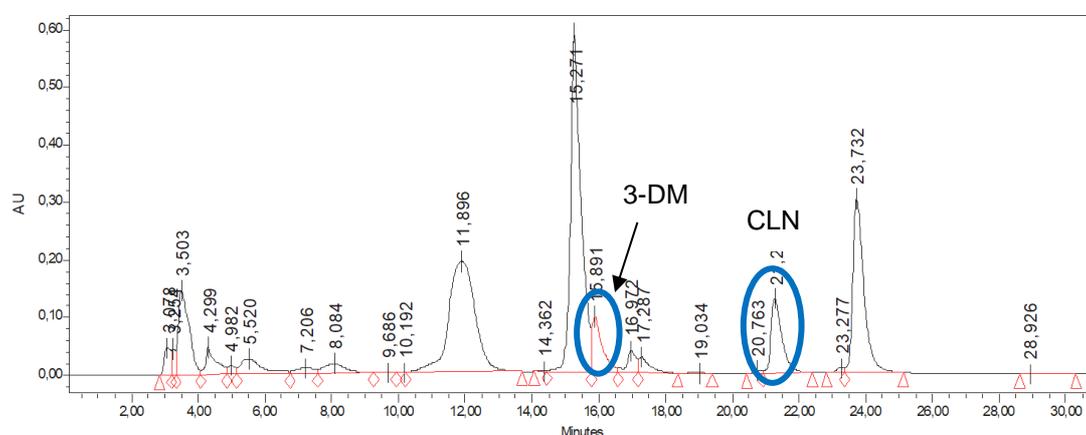


Figura 30. Cromatograma muestra hoja analizada por HPLC-UV a 245 nm.

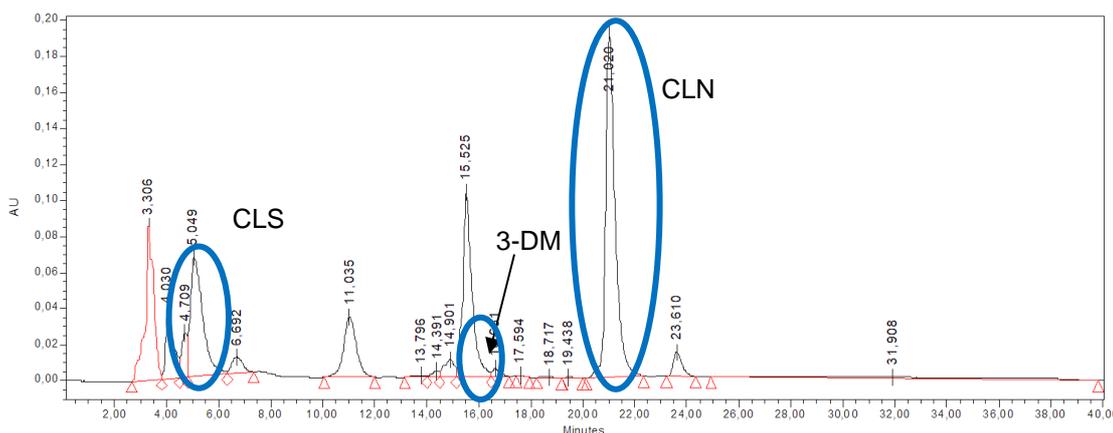


Figura 31. Cromatograma muestra bulbo analizada por HPLC-UV a 245 nm.

Las Figuras 30 y 31 muestran los cromatogramas obtenidos en las muestras de hoja y bulbo de la localidad de Aisa, respectivamente. En ellos se señalan además los picos identificados como colchicósido, 3-demetilcolchicina y colchicina, cuyos tiempos de retención se encuentran normalmente en torno a 5, 16 y 22 minutos respectivamente.

Existen dos posibilidades para llevar a cabo esta identificación de compuestos: por un lado, disponer de patrones de este compuesto, con los que obtener el tiempo de retención y espectro de absorción; o en el caso en que no se dispongan de patrones, jugar con los datos bibliográficos existentes en estudios similares donde se han detectado estos compuestos. En este caso, se dispone de patrones certificados de los tres compuestos, a partir de los cuales se ha podido determinar y obtener sus tiempos de retención y espectros de absorción. Aunque esta información también ha sido adquirida a partir de la bibliografía consultada, en informes como los de Rosso et al, 1998 o Gómez et al, 2003.

Como se puede observar en el cromatograma del bulbo, el pico correspondiente al 3-demetilcolchicina no es apreciable a simple vista, es necesario llevar a cabo una ampliación de la zona. Este pico no se ha logrado separar completamente a pesar de las modificaciones realizadas en el proceso previo de optimización, lo que dificulta su cuantificación automática y conlleva a error si se realiza la medición del área de forma manual. Por ello ha sido necesario realizar un rastreo manual a lo largo del pico para comprobar en qué momento el espectro de absorción cambiaba y adoptaba la forma del compuesto, es decir, comenzaba la aparición del alcaloide. Por otro lado, en los cromatogramas también se puede apreciar que el colchicósido es un componente que tan sólo ha sido hallado en los bulbos de la planta, y no en las hojas.

Así, en las Figuras 32 a 34 se muestran los espectros de absorción propios de cada uno de estos tres compuestos, obtenidos a partir del análisis en HPLC-UV a una longitud de onda de 245 nm.

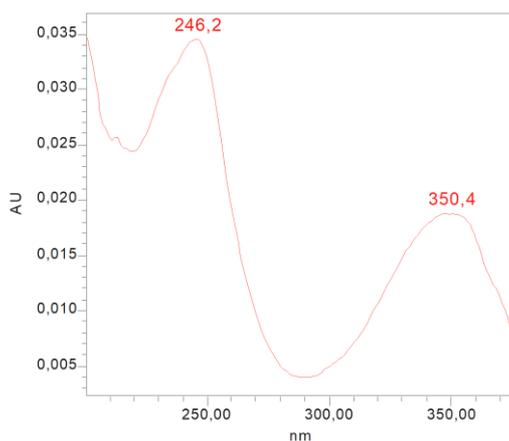


Figura 32. Espectro de absorción colchicósido.

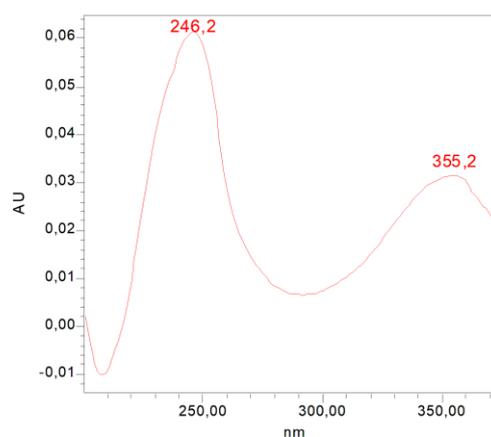


Figura 33. Espectro de absorción 3-Demetil.

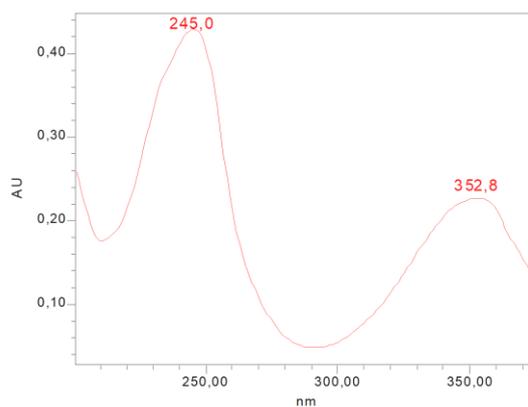


Figura 34. Espectro de absorción de la Colchicina.

Como se pueden observar en las figuras, estos tres compuestos, pertenecientes a la misma familia de alcaloides, poseen espectros de absorción y máximos de absorbancia muy similares. Así, las longitudes de onda de máxima absorción del colchicósido se sitúan en 246,2 y 350,4 nm, las del 3-demetilcolchicina son 246 y 355,2 nm, y por último las de la colchicina 245,0 y 352,8 nm.

A continuación, también se muestran los espectros de absorción del resto de picos mayoritarios presentes en los cromatogramas, en las Figuras 35 a 40.

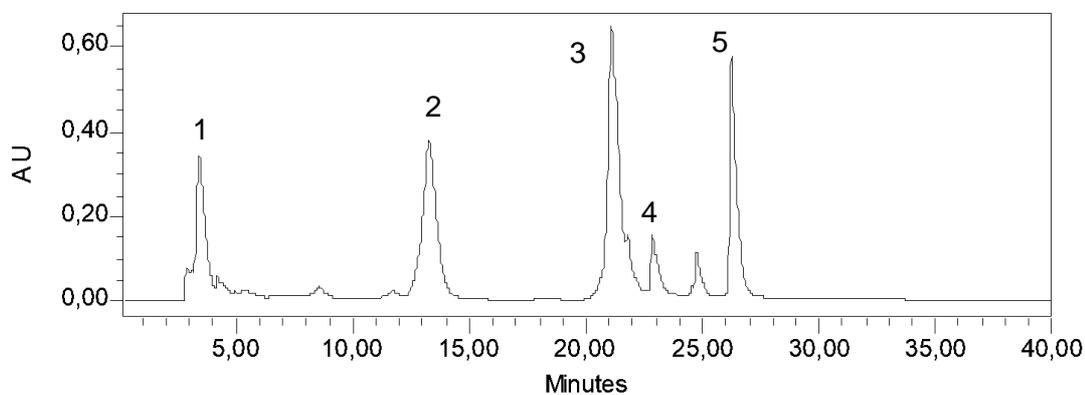


Figura 35. Cromatograma hoja analizada por HPLC-UV a 245 nm, con la representación de los picos mayoritarios no identificados.

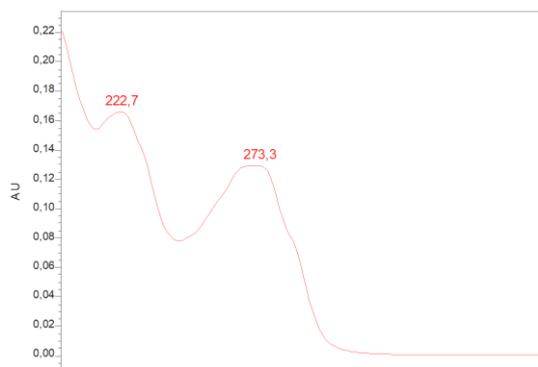


Figura 36. Espectro absorción
pico mayoritario 1.

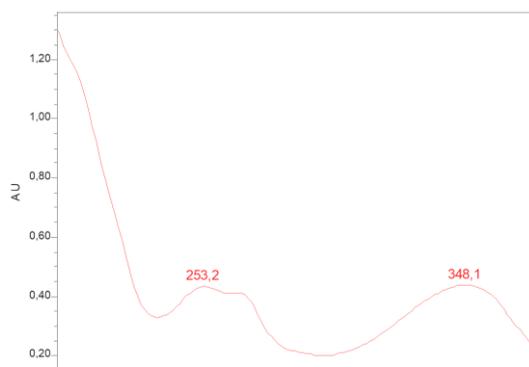


Figura 37. Espectro absorción
pico mayoritario 2.

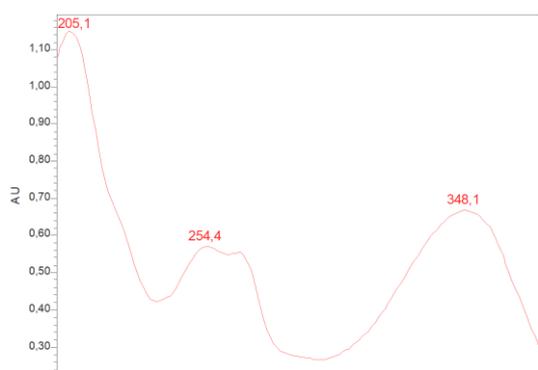


Figura 38. Espectro absorción
pico mayoritario 3.

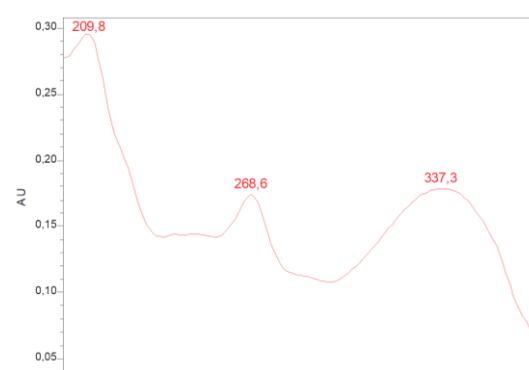


Figura 39. Espectro absorción
pico mayoritario 4.

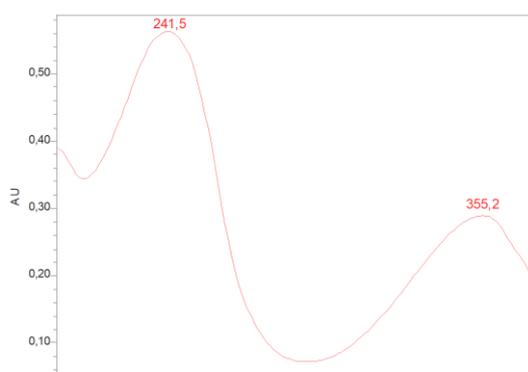


Figura 40. Espectro absorción
Pico mayoritario 5.

Ya que se disponen de diversos estudios que incluyen más congéneres de la colchicina determinados en especies similares a la *M. montana*, junto con sus tiempos de retención y espectros, se estudia la posibilidad de que estos pudieran estar presentes también en esta especie vegetal. Sin embargo, a pesar de intentar cotejar los cromatogramas, espectros y tiempos de retención de estos con distintas fuentes de información, se ha encontrado una gran dificultad para identificarlos, ya que sus espectros y máximos de absorción no coinciden con la literatura consultada.

Identificación mediante HPLC-MS:

A continuación, se muestra el cromatograma obtenido de este análisis (Figura 41), junto con sus espectros de masas en modo ESI+ y ESI- (Figura 42 y 43 respectivamente).

Como se puede comprobar en el primer cromatograma, la señal obtenida es mucho más alta (más del doble) que la obtenida con el HPLC-UV de la escuela, además los picos poseen mayor altura y están mucho mejor separados. También se observa que mientras con el HPLC-UV se necesitan entre 25 y 30 minutos para analizar una muestra, con HPLC-MS apenas se tarda 20 minutos. Por otro lado, el perfil del HPLC-MS en modo positivo y negativo, es muy similar.

Mediante la utilización de este otro método de identificación HPLC-MS, se confirma la presencia de los alcaloides ya determinados (colchicósido, 3-demetilcornigerina y colchicina) además de un cuarto compuesto, sucesivo a la colchicina. El pico en cuestión se corresponde con un compuesto perteneciente a los alcaloides tropolónicos y, por tanto, con un espectro de absorción propio de este grupo, denominado cornigerina. Además de la información obtenida de este análisis, se ha realizado una comparación con algunos estudios donde este compuesto también había sido determinado, para poder cotejar el tiempo de retención, espectros, picos de máxima absorción y masa molecular (Alali et al, 2008; Ondra et al, 1995; Husek et al, 1989; Simmek et al, 1992).

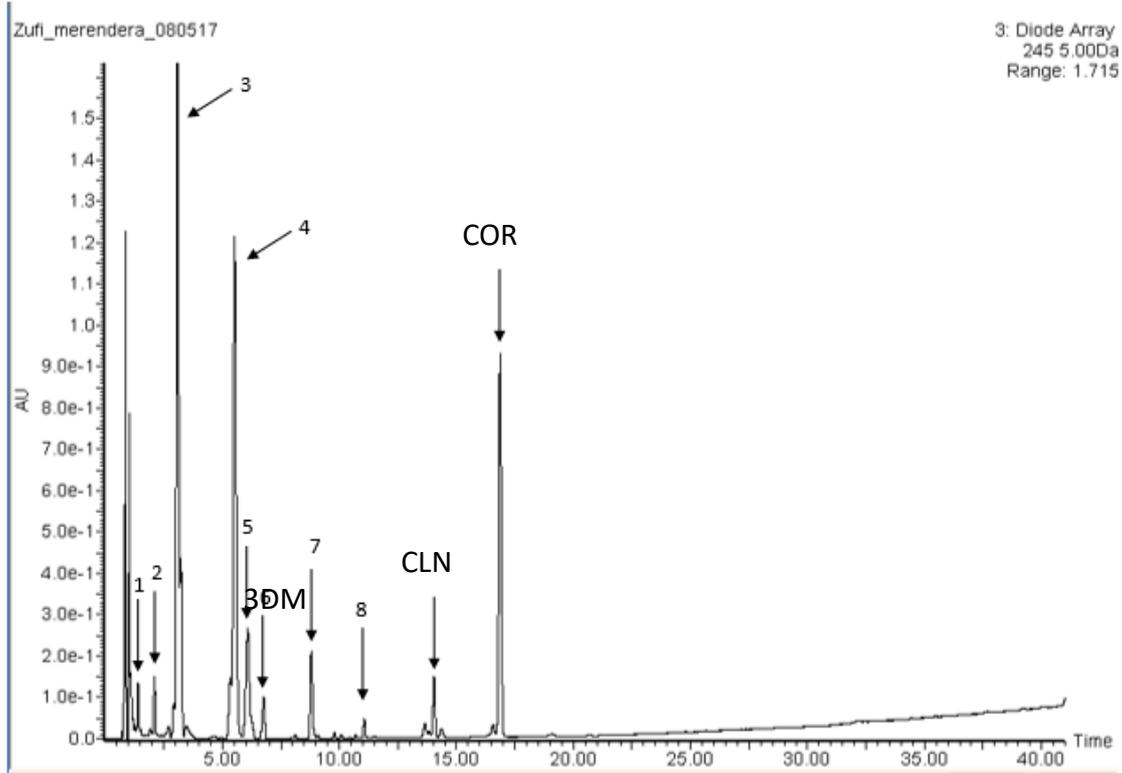


Figura 41. Cromatograma muestra AISA analizada por HPLC-UV a 245 nm (UPV).

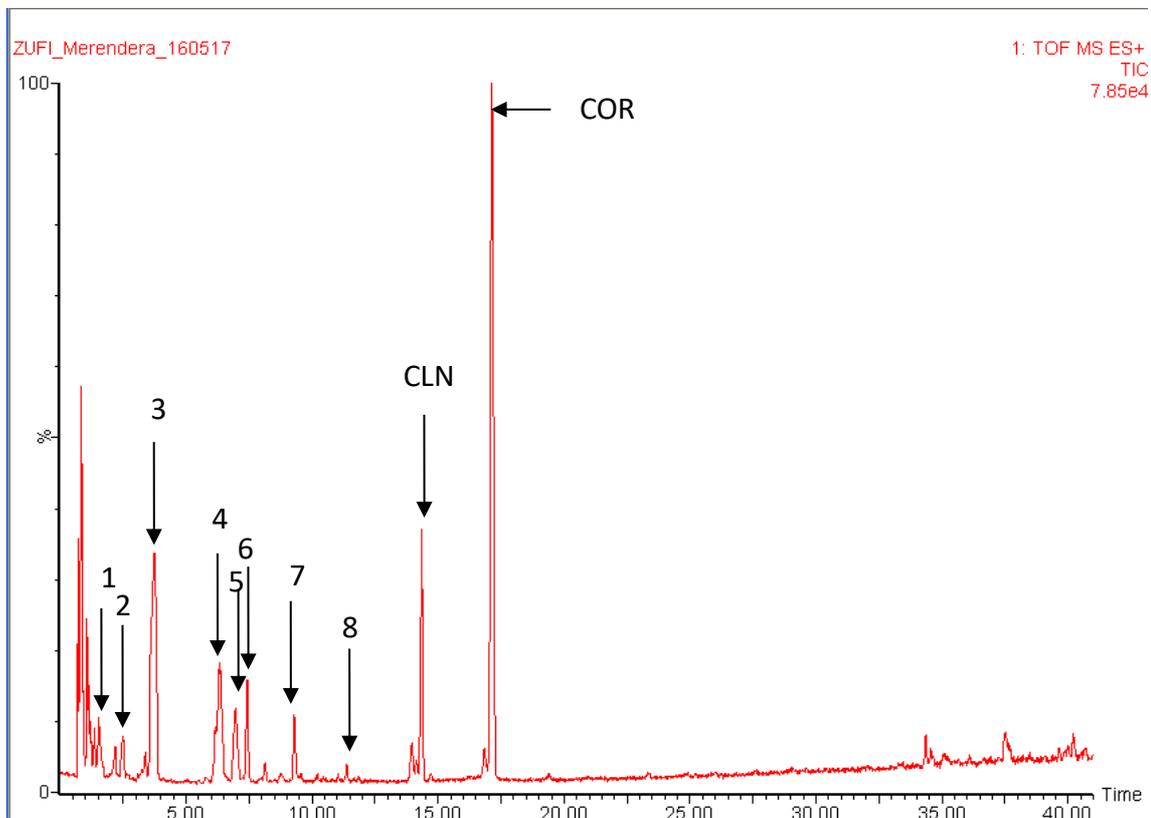


Figura 42. Cromatograma muestra hoja AISA analizada a 245 nm por HPLC-MS

en modo ESI + (UPV).

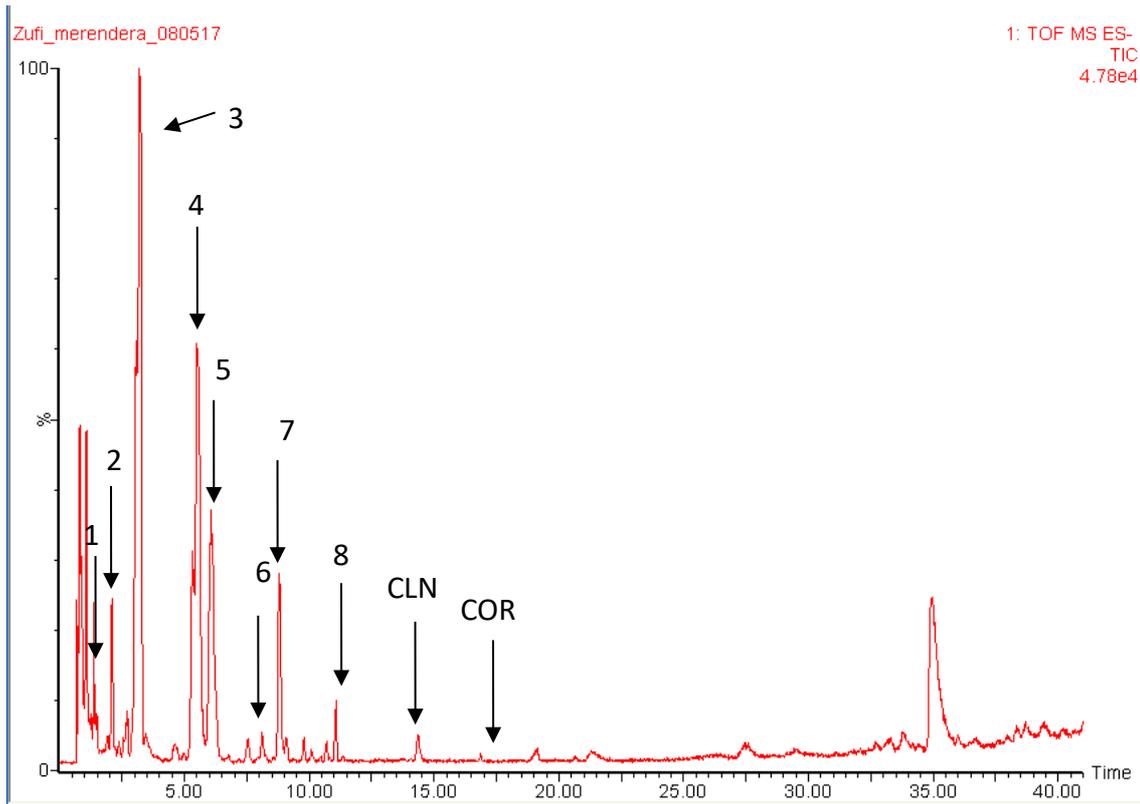


Figura 43. Cromatograma muestra hoja AISA analizada por HPLC-MS a 245 nm en modo ESI - (UPV).

En las Figura 44 y 45 se representan los espectros de absorción y de masas, obtenidos mediante este equipo compuesto por ambos detectores, UV y MS.

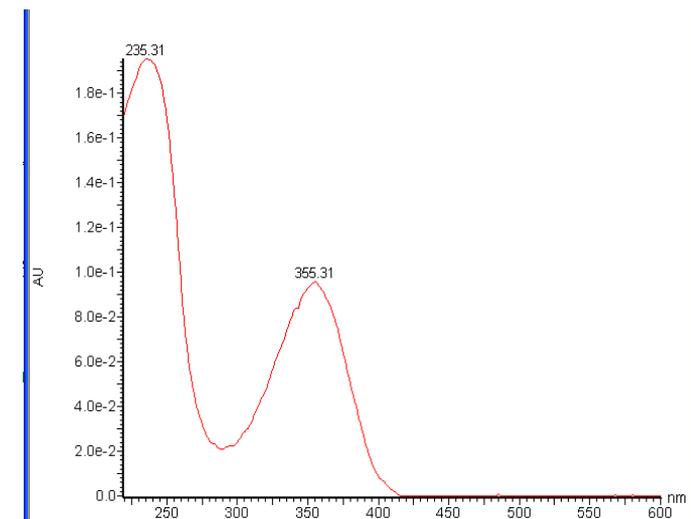


Figura 44. Espectro de absorción de la Cornigerina (UPV).

La cornigerina posee sus máximos de absorción en 235,31 y 355,31 nm, como podemos observar muy similares a los de los compuestos determinados anteriormente. Además, su tiempo de retención se encuentra en 16,85 nm.

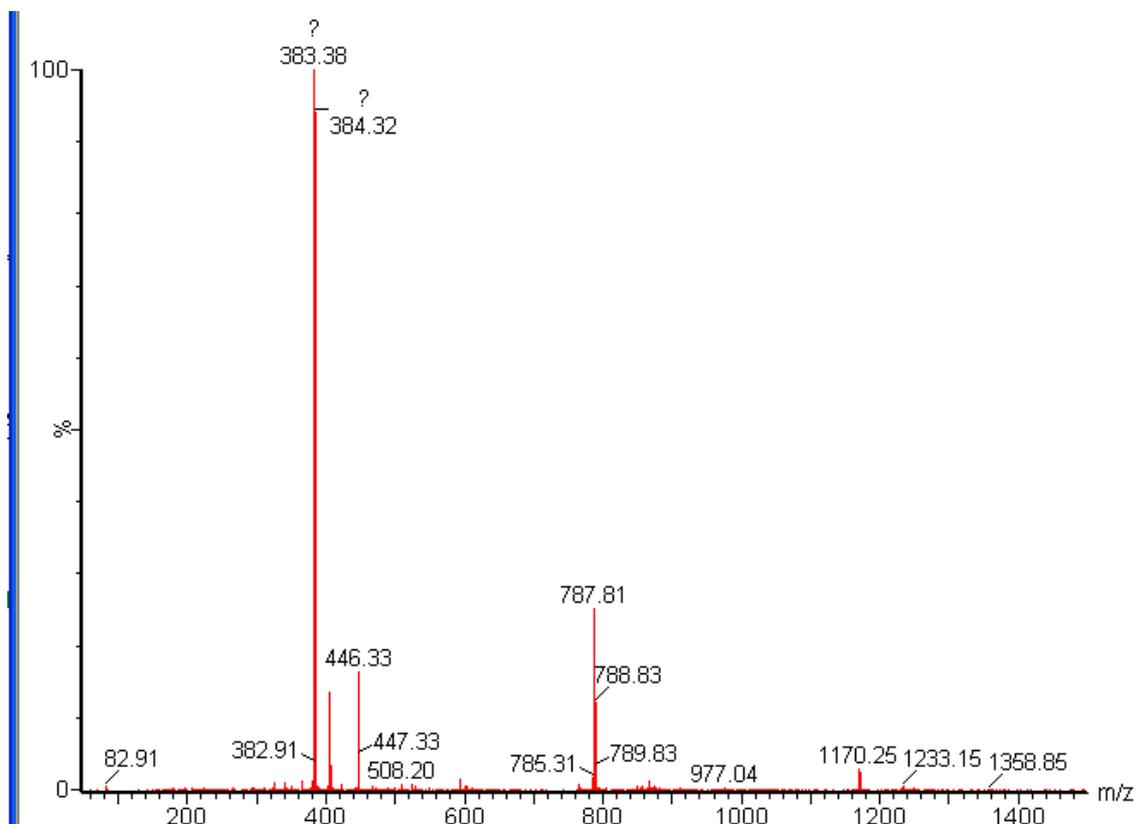


Figura 45. Espectro de masas de la Cornigerina analizado por HPLC-MS a 245 nm en modo ESI+ (UPV).

Tanto los cromatogramas y espectros masas obtenidos del HPLC-MS, como los espectros de absorción de HPLC-UV del resto de los picos presentes en la muestra, se encuentran recopilados en el Anexo 3. No obstante, seguidamente se muestra la Tabla 11, con un resumen de la información obtenida para cada uno de los diez picos detectados, además de recordar cuáles han sido los compuestos que se han podido identificar con este segundo equipo y cuáles no.

A pesar de que los espectros de absorción obtenidos por este nuevo equipo son similares a los nuestros, y que toda la información obtenida (tiempos de retención, longitudes de onda de máxima absorción, espectros de masas...) ha sido contrastada con la disponible en otros artículos como los de Alali et al, 2008 como de Rosso et al, 1998 y Sangster et al, 1964 nuevamente no ha sido posible identificar el resto de picos presentes en la muestra. Se descarta la posibilidad de que alguno de los picos encontrados se correspondan con alguno de los obtenidos por HPLC-MS o consultados.

Tabla 11. Tiempos de retención (Tr), longitudes de máxima absorción (UV_{max}) y datos espectrales de masa de los picos cromatográficos de la Figura 41.

Pico nº	Tr (min)	UV _{max} (nm)	LC-(+)-APCI fragmentos masa (m/z)		Compuesto
			m/z ESI-	m/z ESI+	
1	1,39	268,31	314,99	No	
2	2,1	268,31 337,31	447,05	No	
3	3,07	254,31 348,31	609,12	611,07	
4	5,53	254,31 348,31	447,04	449,29	
5	6,08	254,31 349,31	593,14	595,09	
6	6,77	249,31 354,31	384,11	386,46	3- Demetilcolchicina (Mm= 385,15)
7	8,81	267,31 338,31	447,06	449,34	
8	11,06	220,31 339,31	775,27	No	
9	14,05	240,31 355,31	No	400,43	Colchicina (Mm= 399,22)
10	16,85	236,31 355,31	No	383,35	Cornigerina (Mm= 383,14)

Cuantificación de alcaloides

En la Tabla 12 se muestran las medias de los resultados obtenidos, en mg/g para cada una de las especies alcaloides estudiadas (colchicósido, 3-demetilcolchicina, colchicina y cornigerina), en hoja y bulbo, en cada localidad, y el contenido total de alcaloides en la planta.

Tabla 12. Concentración (mg/g) de colchicósido, 3-demetilcolchicina, colchicina y cornigerina en hoja y bulbo y contenido total (mg/g) de alcaloides en planta.

Localidad	Material vegetal	COLCHICÓSIDO		3-DEMETILCOLCHICINA		COLCHICINA		CORNIGERINA		ALCALOIDES TOTALES EN PLANTA
		<i>mg alcaloide/g muestra</i>								
		\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	
Cubilar de las Vacas	Hoja	ND	-	0,92	0,07	1,70	0,03	3,46	0,28	6,08
	Bulbo	0,37	0,02	0,25	0,01	0,93	0,07	0,08	0,01	1,63
Puerto de Aísa	Hoja	ND	-	1,25	0,05	1,36	0,05	2,91	0,18	5,52
	Bulbo	0,65	0,02	0,49	0,16	1,20	0,06	0,05	0,01	2,39
San Juan de la Peña	Hoja	ND	-	0,92	0,10	1,57	0,93	2,98	0,33	5,47
	Bulbo	0,26	0,12	0,19	0,02	0,57	0,18	0,03	0,01	1,05
Salto de Roldán	Hoja	ND	-	0,92	0,01	0,62	0,12	2,58	0,15	4,12
	Bulbo	0,25	0,00	0,20	0,01	0,40	0,05	0,03	0,02	0,88
Guasillo	Hoja	ND	-	0,82	0,04	0,62	0,22	3,05	0,44	4,49
	Bulbo	0,16	0,03	0,18	0,02	0,41	0,04	0,03	0,01	0,78
Montmesa*	Hoja	ND	-	1,00	0,04	0,60	0,02	1,90	0,05	3,50
	Bulbo	0,24	0,03	0,19	0,01	0,26	0,03	0,03	0,01	0,72
Marcén*	Hoja	ND	-	1,04	0,02	0,94	0,03	3,60	0,07	5,58
	Bulbo	0,55	0,01	0,29	0,00	0,72	0,01	0,08	0,00	1,64
San Mateo de Gállego*	Hoja	ND	-	0,94	0,00	0,73	0,13	2,27	0,53	3,94
	Bulbo	0,30	0,03	0,24	0,03	0,04	0,03	0,04	0,00	0,62
Monzón*	Hoja	ND	-	0,98	0,01	0,70	0,00	2,76	0,07	4,44
	Bulbo	0,47	0,15	0,26	0,00	0,53	0,05	0,06	0,00	1,32

* No se dispone de réplicas de campo.

**En las muestras de hoja no se ha detectado el compuesto colchicósido (ND).

En las Figura 46 a 54, se representan gráficamente los resultados obtenidos, para ver la posible variabilidad en la cantidad de los distintos alcaloides en hoja y bulbo en cada uno de los puntos de muestreo. Además, se adjunta la Figura 55 con la representación gráfica de los alcaloides totales en hoja y bulbo, en las diferentes zonas de muestreo.

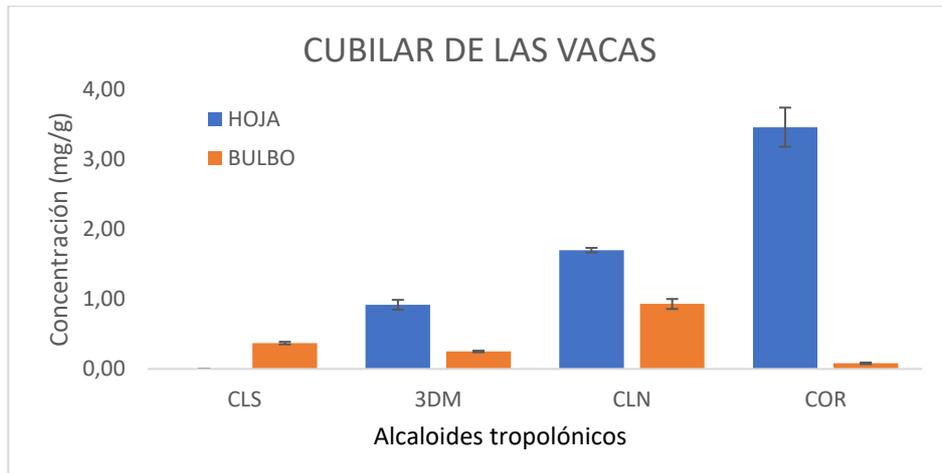


Figura 46. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Cubilar de las Vacas.

Valor medio y desviación estándar.

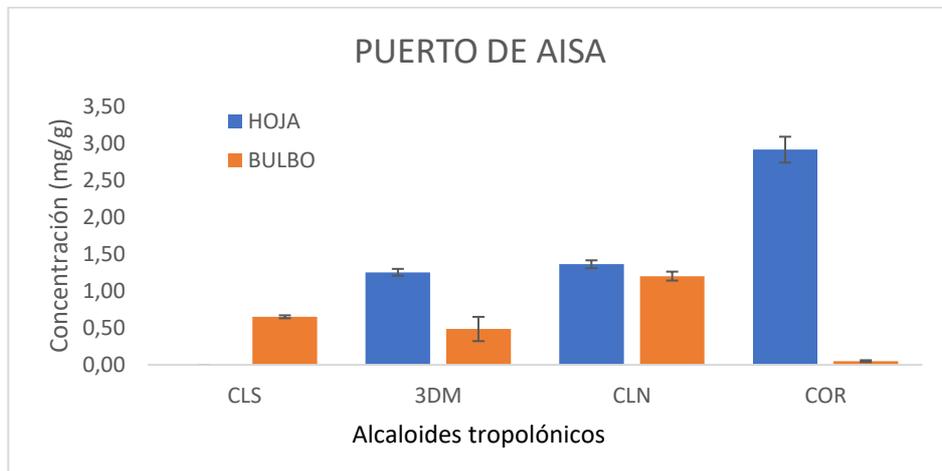


Figura 47. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Puerto de Aísa.

Valor medio y desviación estándar.

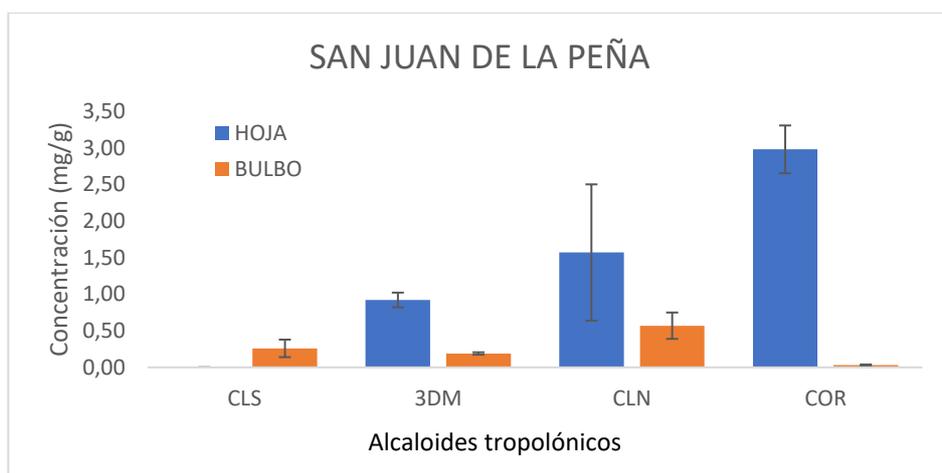


Figura 48. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de San Juan de la Peña.
Valor medio y desviación estándar.

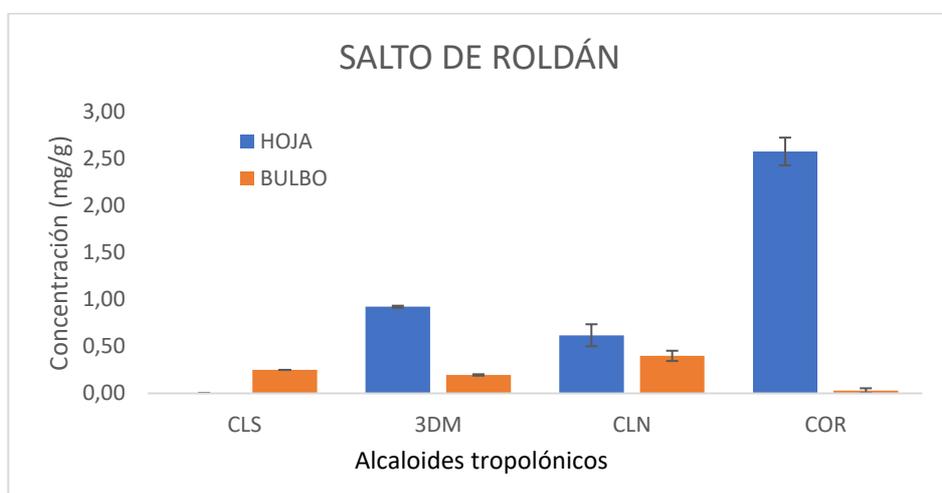


Figura 49. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Salto de Roldán.
Valor medio y desviación estándar.

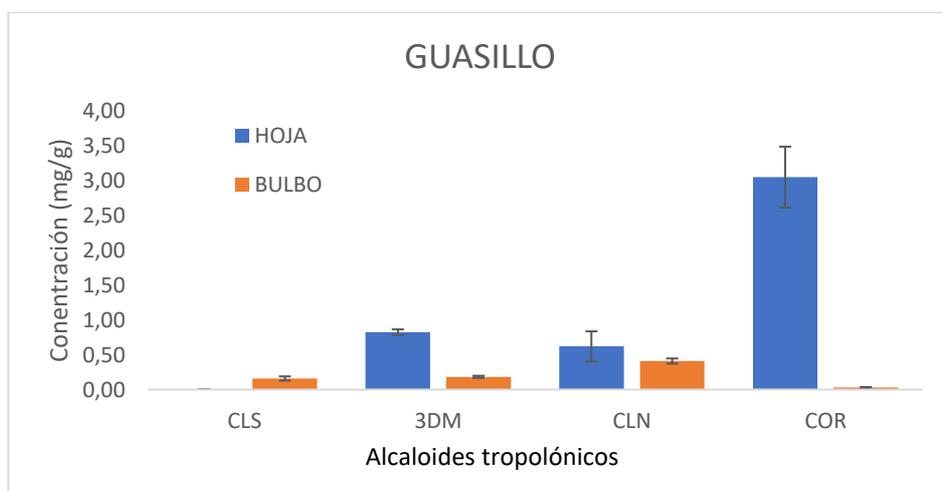


Figura 50. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Guasillo.
Valor medio y desviación estándar.

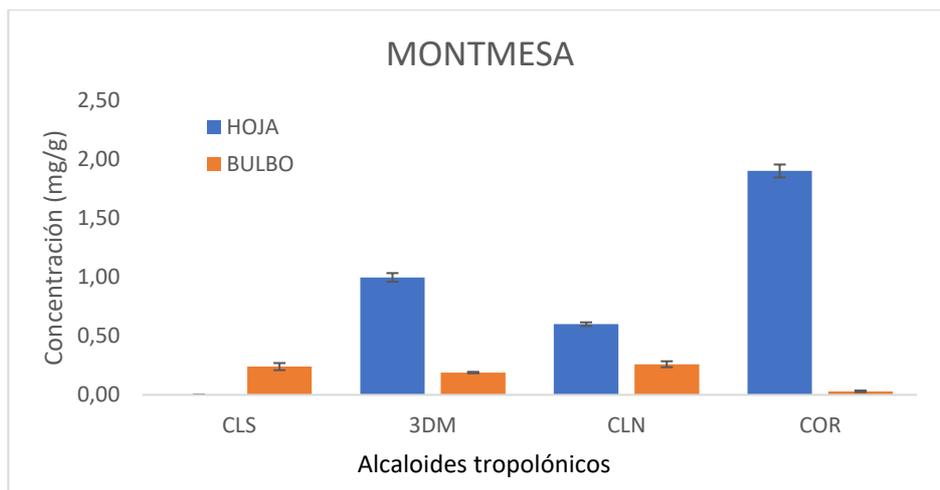


Figura 51. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Montmesa. Valor medio y desviación estándar (sin réplicas de campo).

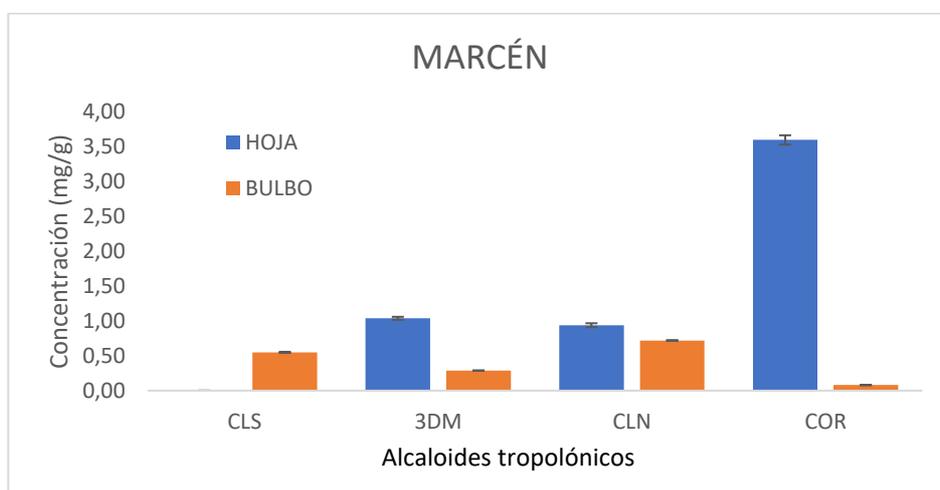


Figura 52. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de Marcén. Valor medio y desviación estándar (sin réplicas de campo).

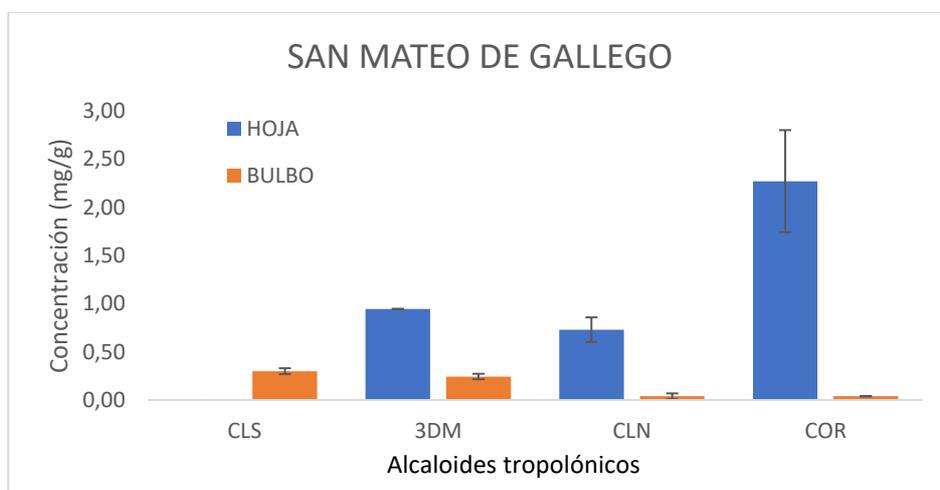


Figura 53. Concentración de alcaloides (mg/g) en las muestras de San Mateo de Gállego. Valor medio y desviación estándar (sin réplicas de campo).

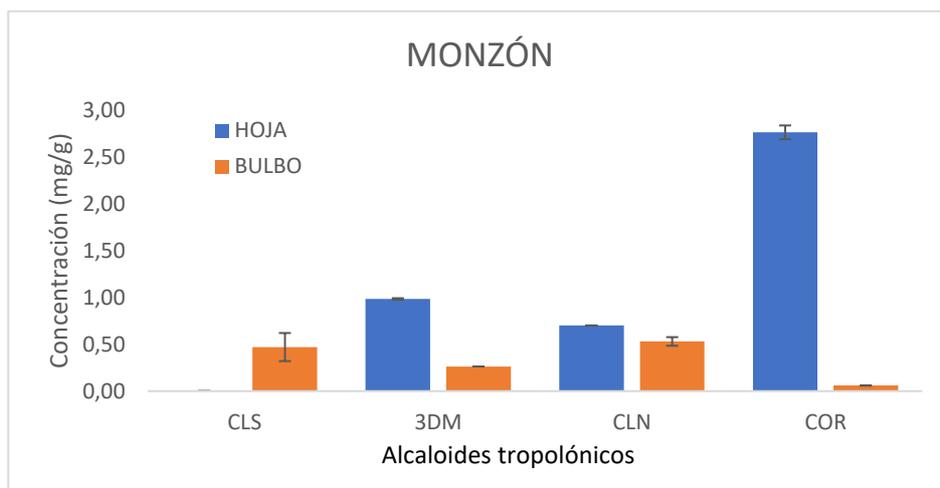


Figura 54. Concentración de alcaloides(mg/g) en las muestras de Monzón. Valor medio y desviación estándar (sin réplicas de campo).

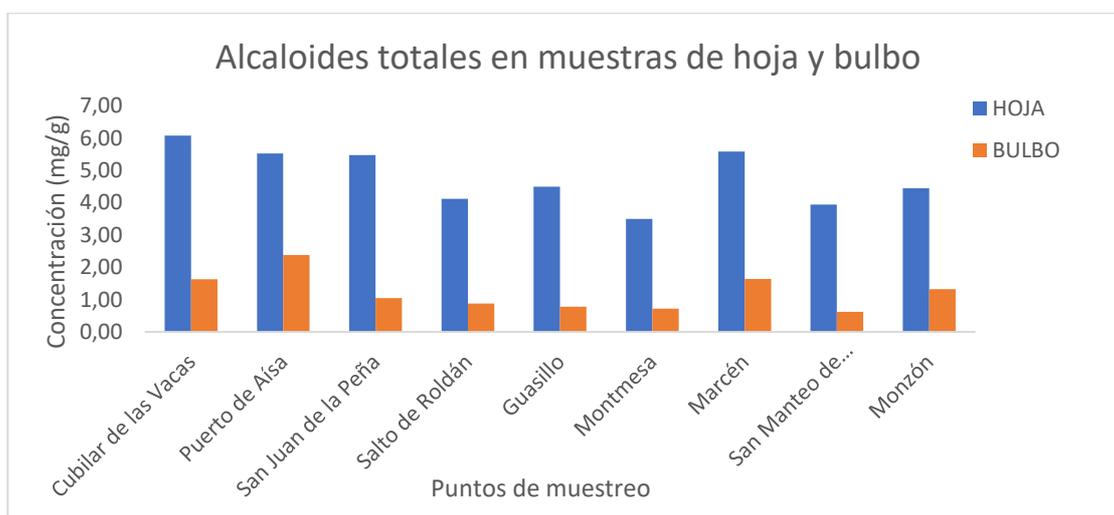


Figura 55. Comparativa concentración total de alcaloides en las muestras de hoja y bulbo de cada localidad. Valor medio (mg/g).

Como se puede observar en todos los gráficos, la cantidad de alcaloides presentes en la hoja es siempre mayor que en el bulbo, en todos los puntos de muestreo y para los cuatro compuestos determinados. De acuerdo con algunos estudios como Ondra et al 1995 esta característica también se encuentra en plantas de otros géneros como *Colchicum* o *Gloriosa*. Sin embargo, también existen otras especies de dichos géneros, que contienen mayores cantidades de estos compuestos en el cormo en vez de en la hoja (Alfayyad et al 2002; Husek et al 1989). En el caso de las hojas, se encuentra que el compuesto mayoritario es la cornigerina en todos los puntos de muestreo, seguido de la colchicina en el caso de las tres zonas más altas (Cubiliar de las Vacas, Puerto de Aísa y San Juan de la Peña) o del 3-demetilcolchicina en el resto

de localidades muestreadas. Sin embargo, en el bulbo, el compuesto mayoritario en casi todos los casos es la colchicina, seguido del colchicósido, el 3-demetilcolchicina y finalizando con la cornigerina como compuesto minoritario. Una excepción a esta tendencia es San Mateo de Gállego, donde el colchicósido aparece como compuesto mayoritario, seguido del 3-demetilcolchicina y la colchicina y cornigerina en últimos lugares.

Por un lado, el colchicósido es un alcaloide que no ha sido detectado en las muestras de hoja (o que se encuentra por debajo del límite de detección de método empleado) en ninguno de los puntos de muestreo, pero sí en bulbo. Los bulbos de Puerto de Aísa y Marcén son los que contienen mayores cantidades de este compuesto (0,65 y 0,55 mg/g), frente a Montmesa y Guasillo, que poseen las menores (0,24 y 0,16 mg/g).

En cuanto al 3-dementilcolchicina, cabe destacar que todas las localidades poseen valores muy similares de concentración de este compuesto, tanto en sus hojas (en torno a 1 mg/g) como en bulbos (en torno a 0,2 mg/g). Las muestras de Puerto de Aísa serían las únicas que se alejan significativamente de estos valores.

Las concentraciones de colchicina por otro lado son muy dispares y nada semejantes entre las distintas localidades. En este caso las muestras que presentan una mayor cantidad de colchicina en sus hojas son Cubilar de las Vacas y San Juan de la Peña, con valores de 1,70 y 1,57 mg/g, al contrario que en Salto de Roldán, Guasillo y Montmesa, los cuales poseen tan solo 0,62 y 0,6 mg/g respectivamente. En cuanto a las cantidades encontradas en los bulbos, Puerto de Aísa y Cubilar de las Vacas disponen de las mayores reservas de colchicina (1,20 y 0,93 mg/g) y Montmesa y San Mateo de Gállego las menores (0,26 y 0,04 mg/g). A pesar de que anteriormente se ha mencionado que este compuesto es el más representativo de este grupo de alcaloides, y que en la mayoría de los estudios la colchicina es el principal alcaloide tanto en hojas como en bulbos (Gómez et al 2003; Ondra et al 1995; Poutaraud et al, 2005; Gumustas et al 2015...) en este caso no es así.

Finalmente, en el caso de las muestras de hoja, la cornigerina es el principal alcaloide que se encuentra en ellas, independientemente del lugar de muestreo. Dentro de las distintas localidades, existe una gran diferencia entre la cantidad encontrada en Marcén o Cubilar de las Vacas, en torno a 3,5 mg/g y las correspondientes a San Mateo de Gállego o Montmesa, más cercanas a 2 mg/g. De forma contraria, en el bulbo este compuesto es el menos representativo, aunque con valores muy similares en todas las muestras de bulbo (de 0,08 a 0,03 mg/g).

El contenido de alcaloides de las hojas y bulbos de *M. montana*, podría relacionarse con las necesidades de defensa de la planta. Teniendo en cuenta que las hojas permanecen visibles un largo periodo de tiempo (desde el otoño hasta finales de primavera), con un color verde brillante y muy atractivo, cuando la mayor parte de la vegetación está agostada, una mayor defensa de las hojas parece razonable. Sin embargo, las bajas concentraciones de alcaloides presentes en los bulbos resultan sorprendentes si se considera que dichos órganos almacenan la principal fuente de reservas de la planta (en forma de almidón predominantemente) y son fundamentales en la persistencia de la misma. Los estudios citados de Gómez et al., sugieren y que *M. montana* podría promover (o, al menos, no trataría de evitar) el consumo de sus bulbos por micromamíferos. Los resultados de sus experimentos demuestran que las poblaciones de *M. montana* parcialmente depredadas muestran una mayor proliferación de plántulas y la expansión de bulbos jóvenes que verían aumentadas sus posibilidades de persistencia en los suelos removidos y sin la competencia de las otras especies que no soportan la remoción. La alta presencia y densidad poblacional de la planta en suelos perturbados frente a la que se encuentra en ambientes estables y con alta cobertura vegetal, avala esta hipótesis. Por último, la particular fenología de *M. montana* que permanece subterránea en la época de mayor pisoteo (e incluso del paso de vehículos en los pastos de montaña) explicaría la ventaja de la planta en la ocupación de terrenos sometidos a mayor frecuentación de ganado. La presencia exclusiva y en inmensas poblaciones de la planta en pastos muy utilizados, vías de trashumancia e incluso en rodadas de vehículos ganaderos parece responder a esta causa.

3.4 Análisis multivariante de los resultados

Con el objeto de corroborar si las diferencias que hemos ido comentando anteriormente entre los distintos componentes de alcaloides tropolónicos identificados y cuantificados y entre las zonas de estudio, así como las posibles correlaciones entre las distintas variables estudiadas (contenido de nitrógeno inorgánico y pH del suelo, contenido de nitrógeno orgánico y contenido de alcaloides en planta, temperatura, precipitaciones y altitud) se lleva a cabo un análisis multivariante de los datos, con el programa estadístico SPSS 20.0.

El primer resultado de la aplicación del análisis estadístico que se va a presentar es la matriz de correlaciones por pares de variables. Con ella se puede observar cómo se relacionan las distintas variables entre sí gracias a un coeficiente de correlación denominado de Pearson, que oscila en un rango entre -1 y +1. Este coeficiente es una medida de la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Este programa proporciona además un índice de significancia estadística (o valor p). Se considera una correlación significativa entre variables a nivel de 0,05 y 0,01.

A partir de la misma se aplica el análisis factorial (análisis de componentes principales). Se obtienen unos factores comunes que expliquen las interrelaciones entre variables y se seleccionan aquellos factores que aportan la mayor parte de la información con el objeto de observar las posibles diferencias entre las muestras de planta analizadas. Los resultados se muestran en gráficos bidimensionales.

Se realizan dos estudios. En primer lugar, se consideran los resultados obtenidos en el análisis de hoja, bulbo y suelo alcaloides en hoja y bulbo; NKT en planta; nitratos, amonio y pH en suelos. En las Tablas 13 y 14 se muestra la matriz de correlaciones reducida y la matriz de los componentes extraídos, que representa el peso específico de las variables originales en las tres nuevas componentes extraídas. Se han seleccionado las dos primeras componentes que aportan el 80% de la información. La matriz de correlaciones completa se encuentra en el Anexo 4.

Tabla 13. Matriz de correlaciones de las variables: alcaloides individuales y totales en hoja y bulbo; NKT en planta; nitratos, amonio y pH en suelos.

		CLS	DM	CLN	COR	ALCAL_TOT	NKT	NITRATOS	AMONIO	PH
Correlación	CLS	1,000	-,746	-,216	-,826	-,704	-,735	,214	,126	-,085
	DM	-,746	1,000	,574	,933	,942	,973	,147	,017	-,075
	CLN	-,216	,574	1,000	,571	,741	,647	,524	-,183	-,716
	COR	-,826	,933	,571	1,000	,970	,939	,095	-,008	-,090
	ALCAL_TOT	-,704	,942	,741	,970	1,000	,959	,241	-,030	-,252
	NKT	-,735	,973	,647	,939	,959	1,000	,233	,016	-,194
	NITRATOS	,214	,147	,524	,095	,241	,233	1,000	-,139	-,619
	AMONIO	,126	,017	-,183	-,008	-,030	,016	-,139	1,000	,436
	PH	-,085	-,075	-,716	-,090	-,252	-,194	-,619	,436	1,000

a. Esta matriz no es cierta positiva.

Tabla 14. Matriz de componentes.

	Componente		
	1	2	3
ALCAL_TOT	,987	,050	,066
NKT	,973	,117	,087
COR	,955	,240	-,018
DM	,946	,216	,056
CLN	,746	-,539	,132
CLS	-,743	-,465	,352
PH	-,319	,872	,099
NITRATOS	,282	-,761	,342
AMONIO	-,103	,452	,858

Método de extracción: análisis de componentes principales.

a. 3 componentes extraídos.

En las Figuras 56 y 57 se representan la distribución o proyección de las variables estudiadas, y de las muestras analizadas en el plano de las dos componentes extraídas, respectivamente. Mediante la comparación de ambas gráficas se podrán observar las similitudes o diferencias entre las muestras de hoja y bulbo de *M. montana* analizadas, y la distribución de cada alcaloide y parámetro estudiado.

Se puede advertir una clara separación entre las muestras de hoja y bulbo. Las muestras de bulbo se sitúan en torno al colchicósido y las de hoja en el lado apuesto, ya que en ellas no se ha detectado la presencia de este compuesto. Atendiendo a la componente 1, las muestras de hoja se agrupan y se caracterizan por presentar mayores contenidos de alcaloides (a excepción del colchicósido).

Existen varios casos de correlación entre las especies alcaloides, todas ellas positivas a excepción de las del colchicósido que son negativas. Los alcaloides que poseen las correlaciones más altas se encuentran situados más próximos en el gráfico (3-demetilcolchicina, cornigerina y colchicina). Respecto a la relación entre los alcaloides, no existen estudios que expliquen las vías metabólicas, el posible intercambio que se pueda dar entre ellos o las zonas u órganos donde se sintetizan estos compuestos.

El contenido total de alcaloides tiene correlaciones significativas con todos los alcaloides individuales. Se desconoce cuál puede ser el motivo por el que el colchicósido presente todas sus relaciones negativas, pero tal vez se deba a que como es el único

compuesto glicosilado puede actuar de manera diferente frente al resto de los alcaloides.

Todos los alcaloides presentan correlaciones significativas con el contenido en NKT. Los bulbos se agrupan y caracterizan por tener menor contenido en estos alcaloides y NKT. Los alcaloides totales también tienen una correlación muy alta con el NKT.

Tan sólo la colchicina y los nitratos se encuentran relacionados, por ello aparecen en el mismo cuadrante del gráfico de componentes. El amonio por su parte no posee ninguna relación con ninguna variable. La colchicina es el único alcaloide relacionado con el pH.

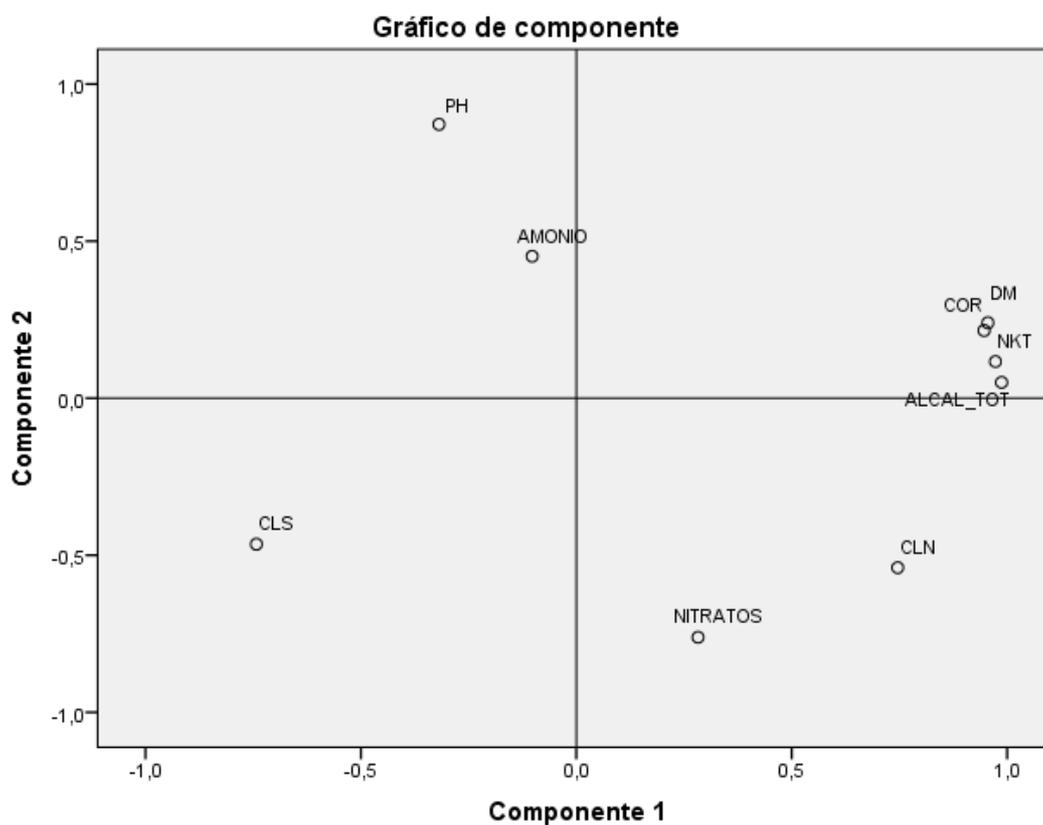


Figura 56. Distribución de las variables estudiadas.

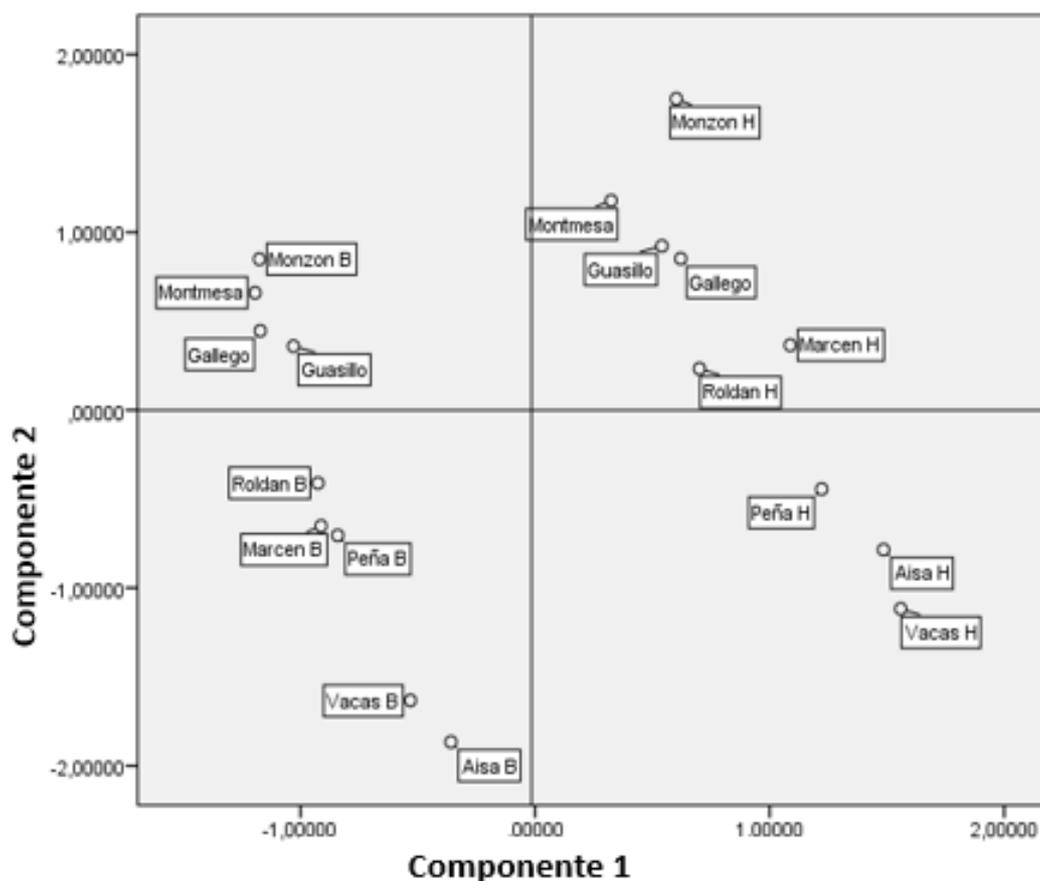


Figura 57. Distribución de las muestras analizadas.

Si se observa la componente 2, se pueden ver las diferencias entre las muestras de hojas. Las hojas de las localidades de Puerto de Aísa, Cubilar de las Vacas y San Juan de la Peña presentan mayores contenidos en colchicina, y zonas como Guasillo, San Mateo de Gállego, Montmesa y Monzón, menores, por ello se localizan de esta manera en el gráfico (de más cerca a más lejos de la colchicina). Las muestras de bulbo de las localidades con mayor altitud y nitratos en sus suelos tienen más colchicósido. Marcén sigue siendo la excepción a esta tendencia, ya que nuevamente presenta un contenido muy alto para las características que posee.

En el segundo estudio que se va a realizar, se han excluido los cuatro alcaloides individuales y se han incluido las variables climatológicas de precipitación y temperatura, además de la altitud. De esta forma, las variables a analizar van a ser: alcaloides totales, NKT, nitratos, amonio, pH, altitud, precipitaciones y temperatura. La Tabla 15 muestra esta nueva matriz de correlaciones simplificada, con nuevas relaciones entre variables. La matriz de correlaciones completa aparece en el Anexo 4.

Como se puede apreciar, en el primer caso se ha llevado a cabo un análisis de las variables por separado (hoja y bulbo) con sólo los parámetros químicos de planta y

suelo, para que el análisis sea más coherente. Sin embargo, se ha decidido hacer este segundo análisis multivariante con todas las variables de planta, pero en este caso mediante sus medias. La razón se debe a que como se desconoce cuál es el metabolismo de los alcaloides, sus vías de síntesis, cómo los asimila la planta, si existen transposiciones a otras partes de la planta... tiene más sentido usar los valores medios en toda la planta. Además, en el caso del nitrógeno inorgánico, éste también se verá favorecido por el uso de las medias.

Seguidamente, en la Tabla 16 se muestra la matriz componentes extraídos. Se han seleccionado las dos primeras componentes ya que aportan el 81% de la información original.

La cantidad de alcaloides totales y NKT en planta y los nitratos y pH en suelos se encuentran relacionadas, siendo negativas las del pH.

En cuanto al pH, muestra una correlación negativa con la altitud, la cual se relaciona también con las variables climatológicas, precipitaciones y altitud.

Por último, las Figuras 58 y 59 se representan la distribución o proyección de las once variables estudiadas, y de las muestras analizadas en el plano de las dos componentes extraídas, respectivamente.

Si se solapan los dos gráficos, podemos observar como al incluir la variable altitud, las localidades aparecen ordenadas de mayor a menor altitud, de forma que las más cercanas son Aisa y Vacas y las más lejanas San Mateo de Gállego y Monzón. Lo mismo ocurre con las precipitaciones y temperatura. Por otro lado, parece lógico que estos puntos de muestreo también se encontrarán ubicados en unas zonas u otras de la gráfica de acuerdo con su mayor o menor concentración de alcaloides y NKT. Sin embargo, como se puede comprobar esto no es así. Este hecho se debe a las concentraciones anormalmente altas de amonio obtenidas en las zonas áridas, como Monzón y Marcén, provocando que el amonio distorsione los resultados.

Tabla 15. Matriz de correlaciones de las variables: alcaloides en hoja y bulbo; NKT en planta; nitratos, amonio y pH en suelos; y la variable altitud.

Matriz de correlaciones

		ALCAL_TOT	NKT	NITRATOS	AMONIO	PH	ALTITUD	PRECIPIIT	T
Correlación	ALCAL_TOT	1,000	,711	,712	-,087	-,741	,662	,308	-,204
	NKT	,711	1,000	,810	,052	-,678	,642	,532	-,225
	NITRATOS	,712	,810	1,000	-,139	-,619	,585	,339	-,169
	AMONIO	-,087	,052	-,139	1,000	,422	-,564	-,517	,485
	PH	-,741	-,678	-,619	,422	1,000	-,915	-,673	,473
	ALTITUD	,662	,642	,585	-,564	-,915	1,000	,857	-,575
	PRECIPIIT	,308	,532	,339	-,517	-,673	,857	1,000	-,765
	T	-,204	-,225	-,169	,485	,473	-,575	-,765	1,000

Tabla 16. Matriz de componentes.

	Componente	
	1	2
ALTITUD	,959	-,144
PH	-,923	-,043
PRECIPIT	,815	-,422
NKT	,779	,503
ALCAL_TOT	,751	,478
NITRATOS	,733	,497
T	-,613	,581
AMONIO	-,474	,669

Método de extracción: análisis de componentes principales.

a. 2 componentes extraídos.

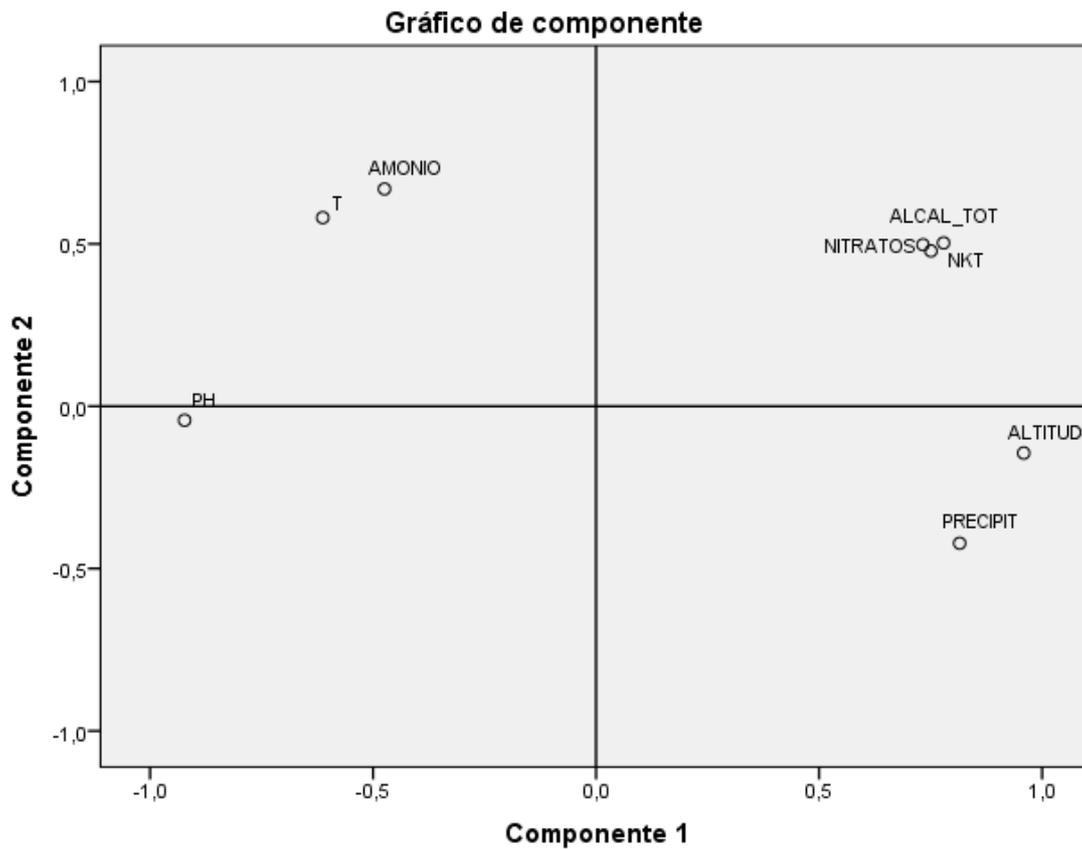


Figura 58. Distribución de las variables estudiadas.

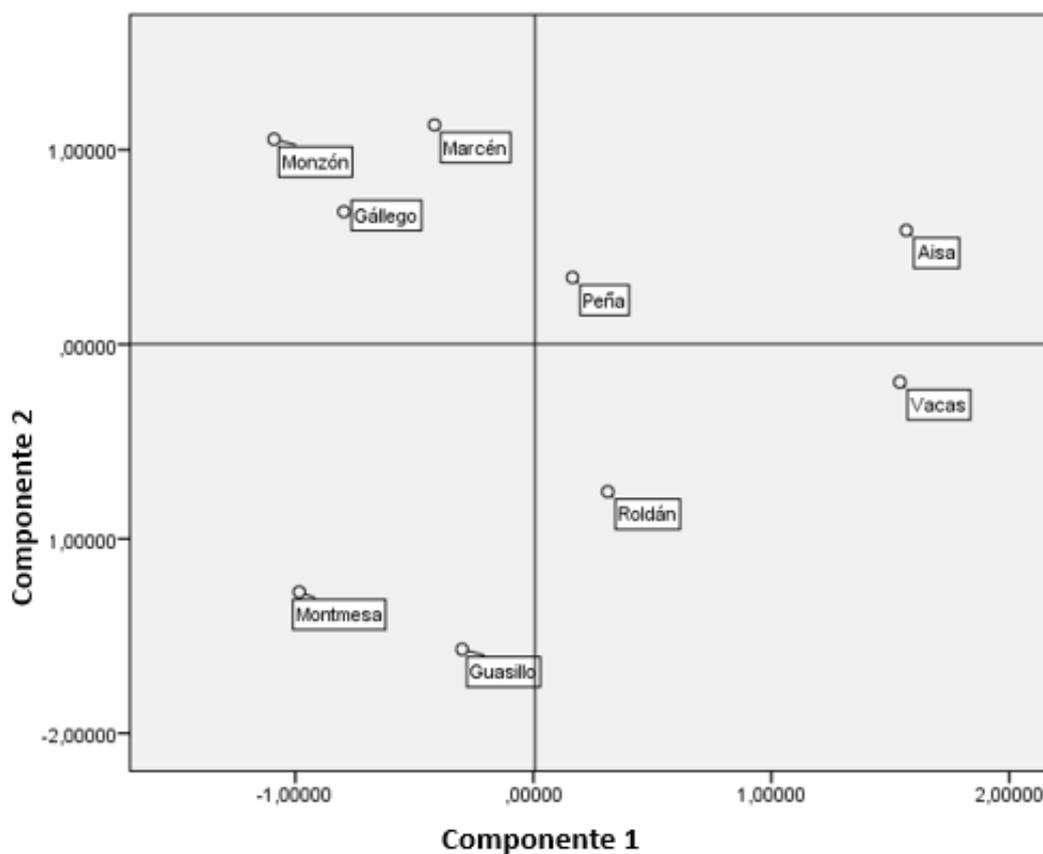


Figura 59. Distribución de las muestras analizadas.

3.5 Comparación con datos bibliográficos y con otros estudios (otras especies *Colchicum*)

En este último apartado se va a llevar a cabo una comparación de los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado con otros artículos científicos, tanto dentro del mismo género *Merendera*, como con estudios referidos a otras especies *Colchicum* o *Gloriosa*.

Así pues, la tabla 17 muestra la comparativa entre los resultados obtenidos en este estudio y los presentes en el estudio llevado a cabo por Gómez et al en 2003, acerca de las posibles variaciones estacionales y espaciales que sufren los alcaloides tropolónicos colchicósido, 3-demetilcolchicina y colchicina en la hoja de esta misma especie vegetal, *M. montana*.

Tabla 17. Comparativa cantidad de alcaloides en hoja, expresado como %.

COMPARATIVA EN HOJAS					
Localización	Resultados	Colchicósido	3-Demetil colchicina	Colchicina	Alcaloides totales
Cubilar de las Vacas	Estudio propio	ND	0,092	0,170	0,262
	Estudio Gómez	0,069	0,029	0,103	0,202
Aisa	Estudio propio	ND	0,125	0,136	0,261
	Estudio Gómez	0,047	0,150	0,047	0,277
Guasillo	Estudio propio	ND	0,082	0,062	0,144
	Estudio Gómez	0,050	0,025	0,071	0,145
Salto de Roldán	Estudio propio	ND	0,092	0,062	0,154
	Estudio Gómez	0,037	0,103	0,077	0,217
Montmesa	Estudio propio	ND	0,099	0,060	0,159
	Estudio Gómez	0,031	0,065	0,078	0,174

*En las muestras de hoja no se ha detectado el compuesto colchicósido (ND).

Se debe tener en cuenta que en el presente trabajo se ha llevado a cabo un muestreo puntual, a diferencia del realizado por Gómez et al, dónde las plantas fueron recolectadas bimensualmente de octubre de 1996 a agosto de 1997, excepto al final del periodo vegetativo, donde se realizaron muestreos mensuales. De esta manera, los datos a comparar son producto de una media elaborada a partir de los ratos recopilados en un año. Con ello se pudo comprobar que existe una variación estacional en el contenido total de alcaloides en hoja, de manera que se mantiene sin fluctuaciones importantes durante el ciclo vegetativo hasta el mes de mayo/julio donde se produce una acumulación de alcaloides. Este aumento se debe principalmente a la acumulación de 3-demetilcolchicina en hojas (excepto en Cubilar de las Vacas, donde este compuesto no fue detectado en esos meses). Además, otra variación se produce al final del periodo vegetativo de la planta, donde el contenido total de alcaloides disminuye en gran proporción, coincidiendo con la senescencia de esta especie. Como ya se ha discutido anteriormente, esto podría deberse a que en este periodo sería menos importante para la planta la defensa química y probablemente pueda estar relacionada con el reciclaje de nitrógeno.

Como se puede observar, en este estudio externo sí que se ha podido identificar el alcaloide colchicósido en las muestras de hoja, a diferencia del estudio propio. Sin embargo, no se ha llevado a cabo la identificación de la Cornigerina, también perteneciente a la familia de los alcaloides tropolónicos.

En el caso de la colchicina, existen localidades donde los resultados son bastante similares a los del IPE, como es el caso de Montmesa, Salto de Roldán y Guasillo, pero otras en las que son muy distintos, como Cubilar de las Vacas y Aisa. Por otro lado, en el estudio propio, el 3-demetilcolchicina se ha detectado en mayores cantidades en Cubilar de las Vacas, Guasillo y Montmesa, y en valores similares a los recopilados por este estudio en Aisa y Salto de Roldán.

En cuanto al porcentaje de alcaloides totales, a pesar de no haber detectado colchicósido en las muestras de hoja y a excepción de Cubilar de las Vacas y Salto de Roldán donde hay una diferencia más pronunciada, el resto de los datos son prácticamente análogos.

Seguidamente en la Tabla 18, se recoge esta misma comparativa, pero en el caso de los bulbos. Coincidiendo con los resultados producidos en este Trabajo de Fin de Grado, las hojas mostraron una mayor cantidad de alcaloides que los bulbos. Sin embargo, en el caso del estudio de Gómez, Montmesa y Salto de Roldán no presentaron este comportamiento en el mes de junio, y Cubilar de las vacas en diciembre, obteniéndose mayores concentraciones en bulbo.

Tabla 18. Comparativa de la cantidad de alcaloides en bulbo, expresado como %.

COMPARATIVA EN BULBOS					
Localización	Resultados	Colchicósido	3-Demetil colchicina	Colchicina	Alcaloides totales
Cubilar de las Vacas	Estudio propio	0,037	0,025	0,093	0,155
	Estudio Gómez	0,046	0,018	0,056	0,120
Aisa	Estudio propio	0,065	0,049	0,120	0,234
	Estudio Gómez	0,046	0,020	0,057	0,123
Guasillo	Estudio propio	0,016	0,018	0,041	0,075
	Estudio Gómez	0,044	0,021	0,030	0,094
Salto de Roldán	Estudio propio	0,025	0,020	0,040	0,085
	Estudio Gómez	0,062	0,017	0,038	0,117
Montmesa	Estudio propio	0,024	0,019	0,026	0,069
	Estudio Gómez	0,064	0,022	0,035	0,117

En cuanto a los bulbos, en este caso es el colchicósido el que presenta menores similitudes entre los resultados de ambos estudios. La cantidad de alcaloides obtenida en el estudio propio es menor en todos a la del estudio externo, salvo en Aisa, donde se encuentra algo por encima. Los valores que se aproximarían algo más son los de Cubilar de las Vacas y Aisa, pero el resto se encuentran en general muy por debajo a

los del artículo. Por otro lado, en 3-demetilcolchicina los valores son muy similares a los del estudio citado, a diferencia de Aisa donde distan un poco más. En cuanto a la determinación de la colchicina, parece que en las localidades de Cubilar de las Vacas y Puerto de Aísa ha sido mucho mayor a la del IPE (en algunas ocasiones incluso en torno al doble). El resto de lugares tienen mayor similitud entre pares de datos, aunque también son algo superiores, e inferior en Montmesa. Por último, la cantidad de alcaloides totales muestra valores cercanos en las zonas de Cubilar de las Vacas y Guasillo, y son más dispares en el resto de los puntos de muestreo.

El estudio acerca de las variaciones estacionales y espaciales de estos alcaloides tropolónicos en *M.montana* también se incluye una determinación de la cantidad de NKT presente en planta. A continuación, se adjunta la Tabla 19 con la comparación entre ambos estudios.

Tabla 19. Comparativa de la cantidad total de nitrógeno en planta, expresado como %NKT.

COMPARATIVA NKT		
Localización	Resultado	% NKT en planta
Cubilar de las Vacas	Estudio propio	3,60
	Estudio Gómez	3,47
Aisa	Estudio propio	4,18
	Estudio Gómez	3,05
Guasillo	Estudio propio	2,53
	Estudio Gómez	2,82
Salto de Roldán	Estudio propio	3,10
	Estudio Gómez	2,58
Montmesa	Estudio propio	2,44
	Estudio Gómez	3,53

Obviamente es muy complicado que el porcentaje de nitrógeno total encontrado en nuestras muestras de suelo coincida con los datos de este estudio, ya que existen una gran cantidad de variables que influyen en la disponibilidad del nitrógeno en el suelo (pH, precipitaciones, temperatura, encharcamientos, heladas, ganado, agricultura...) además del hecho de que nuevamente se trata de la comparación de una media anual frente a datos puntuales.

Es por eso que no se encuentran grandes similitudes entre los pares de datos, salvo en Cubilar de las Vacas y Guasillo, donde los datos sí son algo más próximos. Es por ello que algunos datos distan bastante, aunque las cantidades de algunas zonas como Cubilar de las Vacas y Guasillo posean pocas diferencias entre ambos estudios.

Seguidamente, se va a llevar a cabo una comparación entre los resultados obtenidos del Trabajo de Fin de Grado realizado sobre la *Merendera montana* y otro estudios acerca de otras especies pertenecientes a este mismo género *Merendera*. Husek et al determinaron el 1989 los compuestos alcaloides presentes en tres especies de este género: *M. kurdica*, *M. manissadjianii* y *M. sobolifera*. Los alcaloides trpolónicos encontrados y determinados en este estudio fueron colchicina, 3-demetilcolchicina y cornigerina, al igual que en el presente trabajo, y además los conocidos como 2-demetilcolchicina, N-Formyl-N-deacetilcolchicina y demecolcina. El material vegetal sobre el que se determinan es hojas, bulbos y flores. En la Tabla 20 se resume el contenido de alcaloides encontrado en las muestras de hoja (aunque tan sólo se documenta para una de las especies) y como de estas tres especies *Merendera*.

Tabla 20. Comparativa cantidad alcaloides en hoja y bulbo, expresado como mg/g.

Fuente: Husek et al (1989).

Alcaloides	Parte planta	<i>M.kurdica</i>	<i>M.manissadjuanii</i>	<i>M.sobolifera</i>
		mg/g (peso seco)		
Colchicina	Hoja	0,29	-	-
	Bulbo	0,42	0,76	2,14
3-Demetil colchicina	Hoja	0,29	-	-
	Bulbo	0,08	0,11	0,53
Cornigerina	Hoja	N. D*	-	-
	Bulbo	0,002	N.D*	0,22

* En el caso de la cornigerina no ha podido ser detectada en *M.manissadjuanii* por ser cantidades por debajo del límite de detección.

Como se puede observar, la cantidad de colchicina determinada en las hojas de *M.kurdica* se encuentra se encuentra muy por debajo de los valores obtenidos para *M.montana* (se sitúa entre 1,70 y 0,60 en las muestras con menor cantidad). Sin embargo la determinación de colchicina en los bulbos de estas tres especies sí posee valores similares a los de *M.montana*.

En el caso del 3-demetilcolchicina ocurre lo mismo, las flores de *M.kurdica* poseen valores mucho menores a los de las hojas de *M.montana*. Por contra, los bulbos de estas tres especies contienen cantidades similares a los de *M.montana* e incluso *M.sobolifera* se encuentra algo por encima. Finalmente la cornigerina sólo ha podido ser detectada en dos de las especies: *M.kurdica*, con una cantidad mínima pero cercana a la encontrada en *M.montana*, y *M.sobolifera* con una concentración muy elevada teniendo en cuenta que en *M.montana* este valor no sobrepasa los 0,08 en ninguna de las zonas de muestreo.

Así pues, mientras en *M.montana* el alcaloide mayoritario en hojas es la cornigerina, en estas tres especies pertenecientes a su mismo género, son tan bajas que en algunos casos ni siquiera puede llegar a ser detectada. Por ello es la colchicina es el principal alcaloide en estas especies.

Por otro lado, se ha podido comprobar como existe un mayor número de estudios centrados en la determinación de alcaloides tropolónicos en el género *Colchicum*, frente a los que analizan las especies del género *Merendera*. Por ello, ulteriormente se van a comentar algunos ejemplos de la gran variedad encontrada.

Una de las especies donde se han llevado a cabo mayor número de estudios acerca de la presencia de este tipo de compuestos a lo largo de la historia, es *Colchicum autumnale*. Existe una gran variedad de estudios, como por ejemplo: el de Ellington et al (2003) y Poutaraud et al (2005) donde se determina el contenido de colchicósido, 3-demetilcolchicina y colchicina en semillas; el de Lu et al (2006), que estudia la separación y detección de absorbancia en colchicina y sus derivados tio (tiocolchicósido y tiocolchicina); o el de Malichová et al de 1979, en el que se estudian los alcaloides presentes en las hojas y flores de esta especie. En este último estudio se muestran las concentraciones obtenidas en el caso de la colchicina, 2-demetilcolchicina y 2-demetildemecolcina. De esta manera, los valores obtenidos en la cuantificación de la colchicina en esta especie rondan los 0,20-0,30 mg/g en hojas, valores mucho más bajos a los presentes en *M.montana*.

Seguidamente, en la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación del colchicósido, 3-demetilcolchicina y colchicina llevada a cabo por Ondra et al en 1994, en diversas especies del género *Colchicum*. En este caso no se compararán las hojas y bulbos, sino las cantidades totales presentes en planta.

Tabla 21. Cuantificación de alcaloides en cormos de distintas especies, expresado en mg/g.
Fuente: Ondra, 1994.

Especie del género <i>Colchicum</i>	3-Demetilcolchicina	Colchicina	Cornigerina
<i>Alcaloides (mg de alcaloide / g muestra)</i>			
<i>C.macrophyllum</i>	2,276	2,223	No determinado
<i>C.turcicum</i>	0,056	0,323	0,007
<i>C.cilicium</i>	No determinado	0,300	No determinado
<i>C.kotschyi</i>	0,289	1,058	No determinado
<i>C.bornmuelleri</i>	0,844	3,063	0,0005
<i>C.speciosum</i>	0,010	4,245	0,187
<i>C.triphyllum</i>	0,088	0,958	0,075

Teniendo en cuenta que la concentración del compuesto 3-demetilcolchicina en *Merendera montana* se encuentra entre 0,18 en la zona de menor concentración y 0,49 en la de mayor, algunas de estas especies poseen valores algo superiores a lo que estamos acostumbrados a ver, como *C.bornmuelleri*, o muy superiores, como *C.macrophyllum*. En el caso de la Colchicina, siendo el rango habitual de *M.montana* 0,04-1,2 mg/g, *C.macrophyllum*, *C.bornmuelleri*, *C. speciosum*, son especies que poseen cantidades mucho mayores a los de dicha especie. Por último, esta vez el compuesto no determinado es el colchicósido y el que sí aparece es la cornigerina. Aunque en tres de estas especies no se ha determinado, en *C. turcicum* y *C. triphyllum* se sigue la dinámica encontrada en *M.montana*, con valores que apenas llegan a una décima. En cambio, *C.speciosum* posee mucho mayor cantidad de este compuesto y *C.bornmuelleri* una cantidad ínfima.

Existen muchas más especies del género *Colchicum* donde se ha llevado a cabo la determinación de compuestos alcaloides tropolónicos. Algunas de ellas son: *C. crocifolium* (Alali et al, 2008), *C.hausknechtii* (Khodadoust et al, 2015), *C.steveni* y *C. hierosalymitanum* (Alali et al, 2004), *C.tunicatum* (Al-Fayyad et al, 2010), *C.ritchii* y *C.luteum* (Fell et al, 1966).

Por último, cabe señalar los estudios que se han llevado a cabo sobre el género *Gloriosa*, otro de los conocidos como contenedores de este tipo de compuestos. Así pues, la especie *Gloriosa superba* se constituye como una de las más estudiadas, pudiendo encontrar estudios como los de Dvorácková et al de 1983, donde se determinan un gran número de compuestos alcaloides tropolónicos presentes en el cormo de esta especie (colchicina, N-formil-N-deacetilcolchicina, 3-demetilcolchicina, β -lumicolchicina, γ -lumicolchicina, 3-demetil-N-formil-N-deacetilcolchicina...); o el llevado a cabo por Bharathi et al (2006), donde se estima la cantidad de colchicina presente en seis especies diferentes del género *Superba* (*Gloriosa superba*, *Gloriosa rothchildiana*, *Gloriosa planti*, *Gloriosa lutea*, *Gloriosa casuariana* y *Gloriosa vuchuria*). De estas seis, *Gloriosa planti* exhibió el nivel más alto de colchicinas, seguido de *Gloriosa lutea*, *Gloriosa casuariana* y *Gloriosa superba*. Por ello, cabe pensar que éstas podrían utilizarse como medio de abastecimiento del alcaloide colchicina, pudiendo llegar a sustituir a las del género *Colchicum*.

4. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos en los diversos análisis expuestos en los apartados anteriores, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1) Se ha propuesto un método de análisis de material vegetal de *M. montana* mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución junto con Espectrofotometría de Absorción Molecular (HPLC-UV) que permite separar, identificar y cuantificar los compuestos alcaloides tropolónicos.

2) Se ha optimizado el tratamiento químico de la muestra para extraer los alcaloides de la planta. La extracción se lleva a cabo con metanol en baño ultrasonidos, sin necesidad de una etapa previa de limpieza con hexano y sin aplicar tratamiento previo de maceración.

3) Se ha puesto a punto las condiciones cromatográficas para conseguir una buena separación de los compuestos presentes en los extractos de planta de *Merendera montana*.

4) Se han identificado y cuantificado los siguientes alcaloides tropolónicos: colchicósido, 3-demetilcolchicina, colchicina y cornigirina en hoja y bulbo de *Merendera montana* tomadas en las nueve localidades de Aragón objeto de estudio (Cubilar de las Vacas, Puerto de Aísa, San Juan de la Peña, Salto de Roldán, Guasillo, Montmesa, Marcén, San Mateo de Gállego y Monzón).

5) De los 4 compuestos señalados, la presencia de cornigirina en *M. montana* representa un hallazgo del presente estudio ya que no había sido previamente citado entre los alcaloides de este género y en el conjunto de las plantas incluidas en la subfamilia COLCHICACEAE.

6) Se han encontrado diferencias en la distribución y contenido de alcaloides entre hoja y bulbo y entre las distintas zonas estudiadas.

- Las concentraciones de cada una de las especies alcaloides varían en función de la muestra analizada, y de la zona donde se haya muestreado.
- El colchicósido sólo ha sido detectado en bulbos.
- Las hojas se caracterizan por presentar mayores concentraciones en alcaloides totales que en bulbos.

– La cornigerina es el compuesto mayoritario en muestras de hoja de todos los puntos de muestreo. La colchicina cumple la misma tendencia en bulbo, a excepción de las muestras de San Mateo de Gállego, donde es superada por la concentración de colchicósido.

7) Se ha determinado el contenido de Nitrógeno Kjeldahl Total en muestras de hoja y bulbo presentando una correlación positiva con el contenido de alcaloides totales en planta.

8) Se han analizado muestras de suelo de cada una de las zonas de muestreo, determinando su contenido en nitrógeno inorgánico (nitratos y amonio) y el pH.

– La concentración de amonio es muy variable entre las zonas muestreadas.

– A mayor altitud, los suelos presentan menores valores de pH (suelos menos alcalinos y zonas con mayores precipitaciones) y una tendencia a aumentar la concentración de nitratos. La excepción son las muestras de Marcén y San Mateo de Gállego que presentan contenidos relativamente altos en nitratos.

9) Se constata una correlación positiva entre la cantidad de nitratos presente en el suelo y el contenido total de alcaloides en planta.

5. BIBLIOGRAFÍA

Alali, F., Tawaha, K., & Qasaymeh, R. M. (2004). Determination of colchicine in *Colchicum steveni* and *C. hierosolymitanum* (Colchicaceae): Comparison between two analytical methods. *Phytochemical Analysis*, 15(1), 27-29.

Al-Fayyad, M; Alali, F; Alkofahi, A & Tell, A. (2002). Determination of colchicine content in *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum* under cultivation. *Natural Product Letters*, 16, 395-400.

Azorín, J & Gómez, D. (2008). Estrategias de las plantas frente al consumo de los herbívoros. En *Pastos del Pirineo* (189-203). Madrid: CSIC.

Bharathi, P., Philomina, D., & Chakkaravarthi, S. (2006). Estimation of colchicine in six different species of *Gloriosa* grown in vivo. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 68(6), 806.

Boyé, O., & Brossi, A. (1992). Tropolonic *Colchicum* alkaloids and allo congeners. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 41, 125-176.

Brossi, A (1990). Bioactive Alkaloids. 4. Results of Recent Investigations with Colchicine and Physostigminet. *J. Journal of Medicinal Chemistry*, 33, 2311-2319.

Castroviejo, S. (coord. gen.). 1986-2012. *Flora iberica* 1-8, 10-15, 17-18, 21. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

Capraro, H. G., & Brossi, A. (1984). Tropolonic *Colchicum* alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 23, 1-70.

Chaping, S; Schulze, E & Mooney, H. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 423-447.

Cseke, L; Kirakosyan, A; Kaufman, P; Warber, S; Duke, J & Briemann, H. (2006). *Natural Products from Plants*. Boca Ratón: Taylor & Francis Group.

Cook, J. W., & Loudon, J. D. (1952). Chapter X Colchicine. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*, 2, 261-329.

Dvoráčková, S., Sedmera, P., Potěšilová, H., Šantavý, F., & Šimánek, V. (1984). Alkaloids of *Gloriosa superba* L. *Collection of Czechoslovak chemical communications*, 49(6), 1536-1542.

Ellington, E., Bastida, J., Viladomat, F., & Codina, C. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of colchicine and related alkaloids from seeds of *Colchicum autumnale* L. *Phytochemical Analysis*, 14(3), 164-169.

Gómez-García, D; Azorín, J & Aguirre, J. (2009). Effects of small-scale disturbances and elevation on the morphology, phenology and reproduction of a successful geophyte. *Journal of Plant Ecology*, 2, 13-20.

Gómez-García, D; Azorín, J; Bastida, J; Viladomat, F & Codina, C. (2003). Seasonal and spatial variations of alkaloids in *Merendera montana* in relation to chemical defense and phenology. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 1117-1126.

Gómez-García, D; Azorín, J; Giannoni, S & Borghi, E. (2004). How does *Merendera montana* (L.) Lange (LILIACEAE) benefit from being consumed by moles? *Plant Ecology*, 17, 173-181.

Gumustas, M., Polat, D. Ç., Kilic, C. S., Akalin, K., Ozkan, S. A., & Coşkun, M. (2016). Comparison of Seeds of *Colchicum speciosum* and *Gloriosa superba* in respect to Colchicine and Colchicoside Contents by RP-LC. *Natural product communications*, 11(3), 397-400.

Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66.

Fahim, M; Singh, M; Kamal, YT; Mukhtar, H & Ahmad, S. (2015). A high performance thin layer chromatographic method for the estimation of colchicine in different formulations. *Symposium-Herbal drugs and botanicals*, 7, 260-263.

Fell, K. R., & Ramsden, D. (1966). Phytochemical investigations of some species of *Colchicum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 18(S1).

Hayashi, T., Yoshida, K., & Sano, K. (1988). Formation of alkaloids in suspension-cultured *Colchicum autumnale*. *Phytochemistry*, 27(5), 1371-1374.

Husek, A., Sütllüpinar, N., Potěšilová, H., Dvořáčková, S., Hanuš, V., Sedmera, P., & Šimánek, V. (1989). Alkaloids and phenolics of three *Merendera* species. *Phytochemistry*, 28(11), 3217-3219.

Kaneko, S; Inagaki, M & Morishita, T. (2010). A simple method for the determination of nitrate in potassium chloride extracts from forest soil. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World.

Kempers, A.J & Zweers, A. (1986). Ammonium Determination in soil Extracts by the Salicylate Method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 17, 715-723.

Knoepp, J. D., & Swank, W. T. (1998). Rates of nitrogen mineralization across an elevation and vegetation gradient in the southern Appalachians. *Plant and Soil*, 204(2), 235-241.

Lounasmaa, M., & Tamminen, T. (1993). The tropane alkaloids. *The alkaloids: chemistry and pharmacology*, 44, 1-114.

N.D Johnson, B.Liu, B.L Bentley. (1987). The effects of nitrogen fixation, soil nitrate, and defoliation on the growth, alkaloids, and nitrogen levels of *Lupinus succulentus* (FABACEAE). *Oecologia*, 74, 425-431.

Poutaraud and P. Girardin, A. (2006). Agronomical and chemical variability of *Colchicum autumnale* accessions. *Canadian journal of plant science*, 86(2), 547-555.

Rosso, A., & Zuccaro, S. (1998). Determination of alkaloids from the colchicine family by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 825(1), 96-101.

Sangster, A & Stuart, K. (1964). Ultraviolet spectra of alkaloids. *University of the West Indies*, 65, 90-130.

Simánek, V., Husek, A., Válka, I., & Sütlüpinar, N. (1990, September). Phytochemical studies of Turkish *Colchicum* and *Merendera* species. In *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, XXIII IHC 306* (pp. 122-128).

Stevenson, F. J. (1965). Origin and distribution of nitrogen in soil. *Soil nitrogen*, (soilnitrogen), 1-42.

Sutherland, F. C. W., Smit, M. J., Herbst, L., Els, J., Hundt, H. K. L., Swart, K. J., & Hundt, A. F. (2002). Highly specific and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 3-desmethylthiocolchicine in human plasma as analyte for the assessment of bioequivalence after oral administration of thiocolchicoside. *Journal of Chromatography A*, 949(1), 71-77.

Yusupov, M. K., & Sadykov, A. S. (1978). Tropolone alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds*, 14(1), 1-19.

ANEXOS

Anexo 1: Localización de las zonas muestreadas



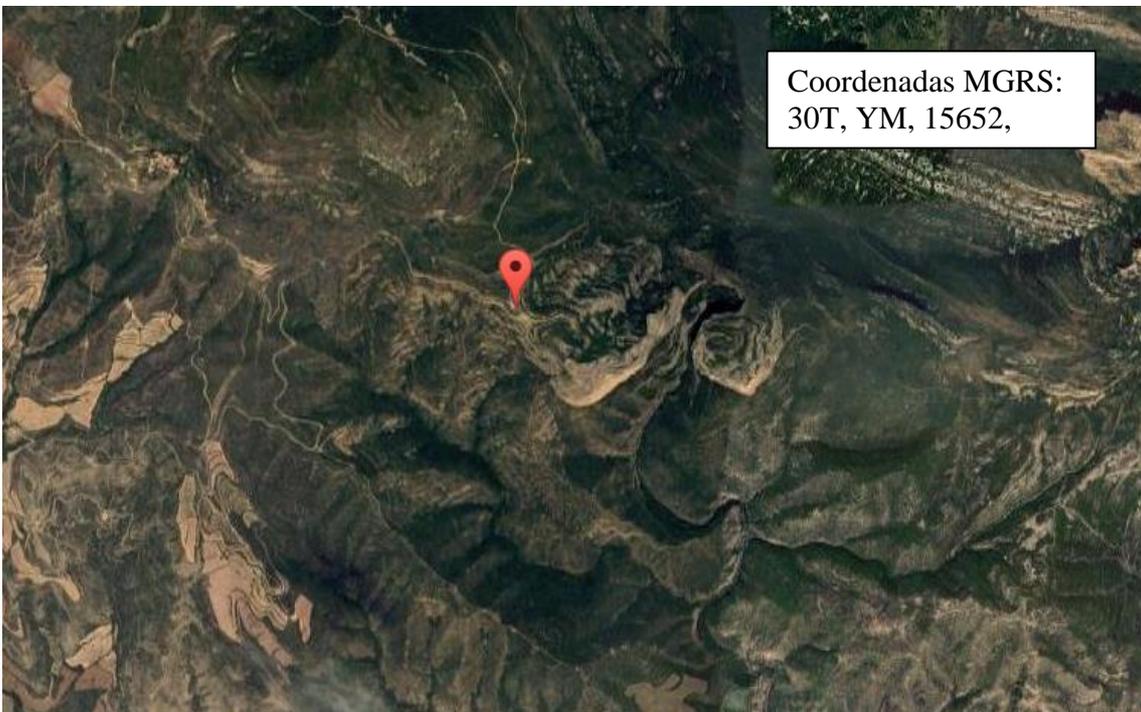
Localización Cubilar de las Vacas (Sallent de Gállego). Fuente: Iberpix (IGN).



Localización Puerto de Aísa (Jaca). Fuente: Iberpix (IGN).



Localización San Juan de la Peña (Botaya). Fuente: Iberpix (IGN).



Localización Salto de Roldán (Nuevo). Fuente: Iberpix (IGN).



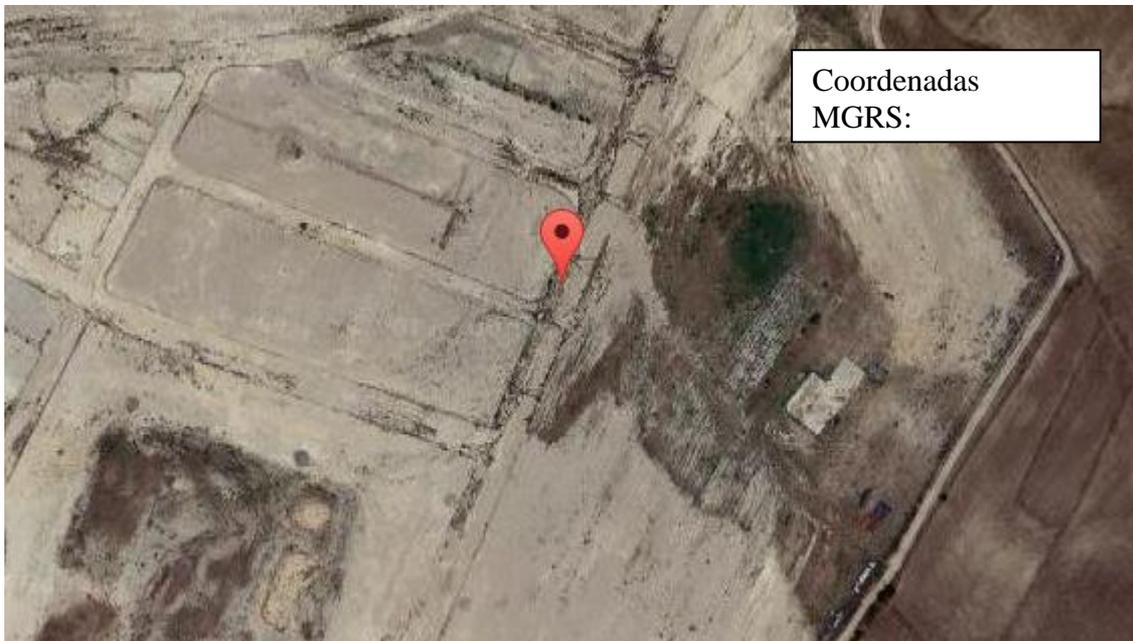
Localización Guasillo (Jaca). Fuente: Iberpix (IGN).



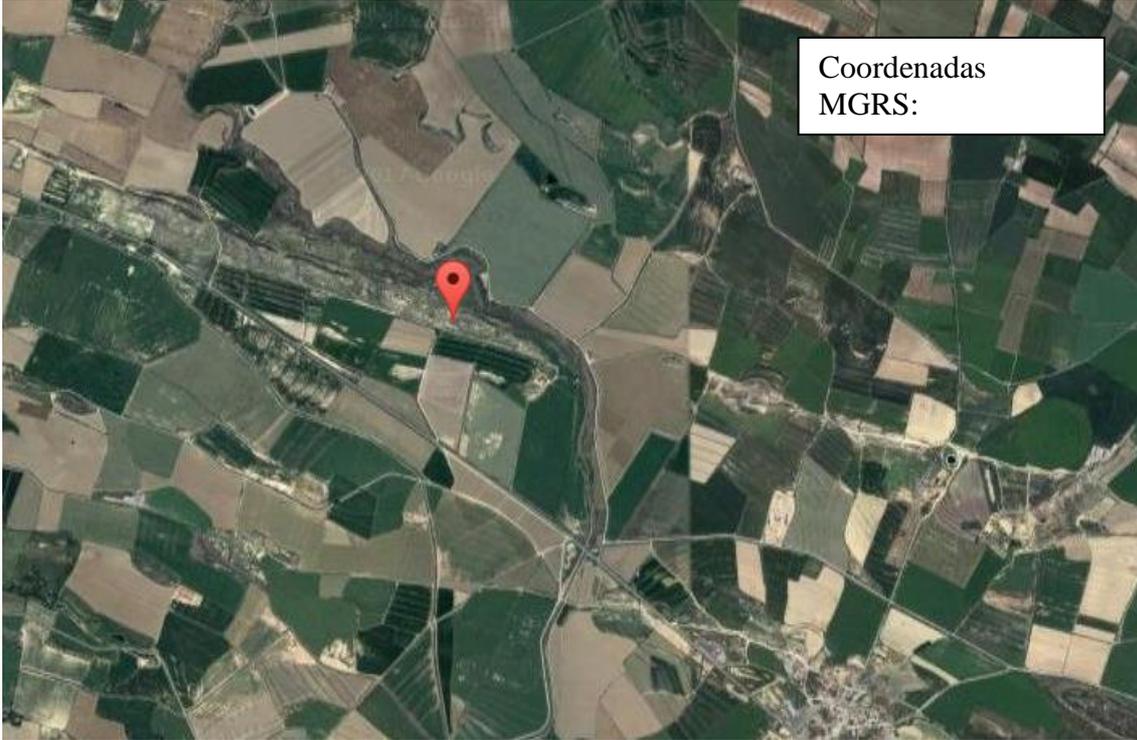
Localización Montmesa (Lupiñén-Ortilla). Fuente: Iberpix (IGN).



Localización Marcén (Lalueza). Fuente: Iberpix (IGN).



Localización San Mateo de Gállego (Zaragoza). Fuente: Iberpix (IGN).



Localización Monzón (Huesca). Fuente: Iberpix (IGN).

Anexo 2: Resultados de las diferentes réplicas analíticas llevadas a cabo en el análisis de suelos

Concentración de nitratos (mg/kg) en suelos.

Muestra suelo	Réplicas de campo	Nitratos (mg NO ₃ /kg suelo)		Media (B)	Desviación (σ)
		Réplica 1	Réplica 2		
CUBILAR DE LAS VACAS	Vacas1	87,23	86,85	85,00	13,75
	Vacas2	74,65	66,02		
	Vacas3	97,43	97,79		
PUERTO DE AISA	Aisa1	85,14	76,57	108,29	23,84
	Aisa2	123,33	124,58		
	Aisa3	124,84	115,26		
SAN JUAN DE LA PEÑA	Peña1	47,88	48,17	70,69	19,91
	Peña2	89,69	81,06		
	Peña3	77,18	80,14		
SALTO DE ROLDÁN	Roldan1	49,70	47,21	87,38	33,94
	Roldan2	102,48	103,38		
	Roldan3	115,31	106,2		
GUASILLO	Guasillo1	25,82	25,79	26,72	6,62
	Guasillo2	23,91	17,31		
	Guasillo3	34,42	33,08		
MONTMESA*	Montmesa	13,32	9,00	11,16	3,05
MARCÉN*	Marcén	90,03	90,22	90,13	0,13
SAN MATEO DE GÁLLEGO*	Mateo	68,54	61,44	64,99	5,02
MONZÓN*	Monzón	34,34	34,93	34,64	0,42

* No hay réplicas de campo. Media y desviación estándar de las réplicas analíticas.

Concentración de amonio (mg/kg) en suelos.

Muestra suelo	Réplicas de campo	Amonio (mg NH ₄ ⁺ /kg suelo)		Media (B)	Desviación (σ)
		Réplica 1	Réplica 2		
CUBILAR DE LAS VACAS	Vacas1	8,06	8,42	9,17	0,83
	Vacas2	9,19	10,44		
	Vacas3	9,83	9,08		
PUERTO DE AISA	Aisa1	7,67	8,11	7,23	0,61
	Aisa2	6,57	6,82		
	Aisa3	7,06	7,11		
SAN JUAN DE LA PEÑA	Peña1	6,06	6,36	33,94	46,85
	Peña2	7,34	7,82		
	Peña3	84,91	91,17		
SALTO DE ROLDÁN	Roldan1	3,41	3,69	7,31	3,68
	Roldan2	10,58	11,24		
	Roldan3	7,28	7,67		
GUASILLO	Guasillo1	3,36	3,87	3,90	1,18
	Guasillo2	5,01	5,37		
	Guasillo3	2,7	3,06		
MONTMESA*	Montmesa	5,25	6,42	5,84	0,83
MARCÉN*	Marcén	13,1	13,73	13,42	0,45
SAN MATEO DE GÁLLEGO*	Mateo	19,2	19,47	19,34	0,19
MONZÓN*	Monzón	31,62	32,36	31,99	0,52

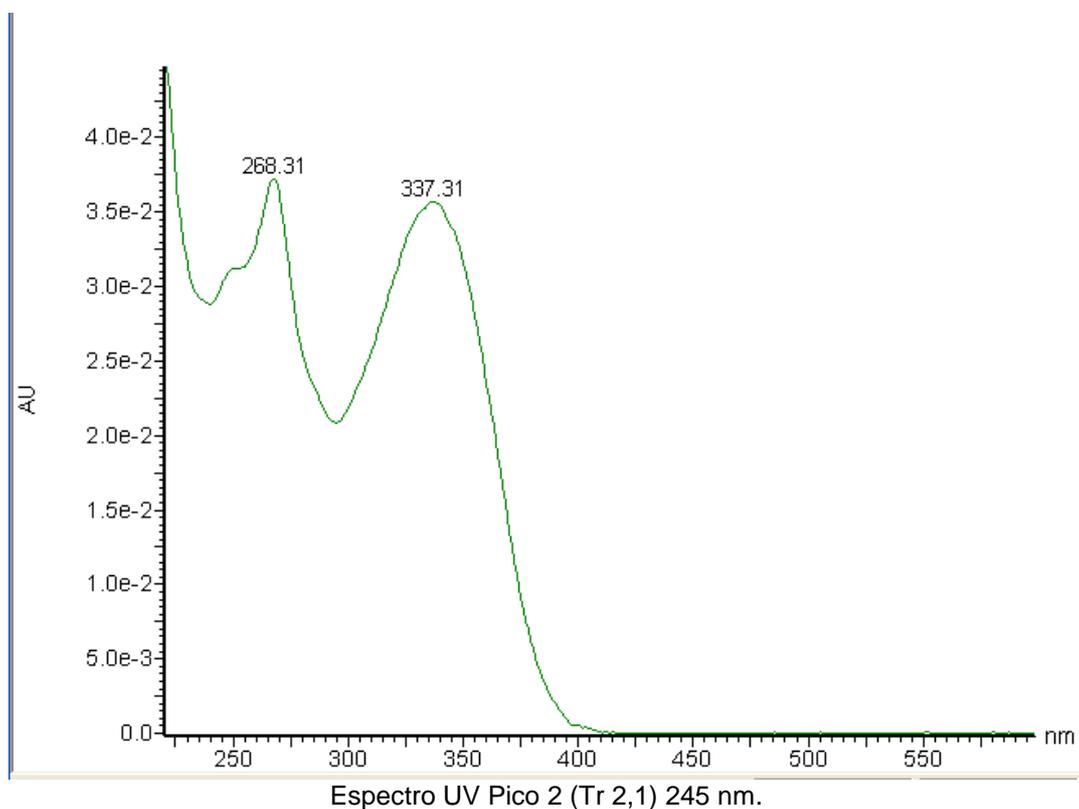
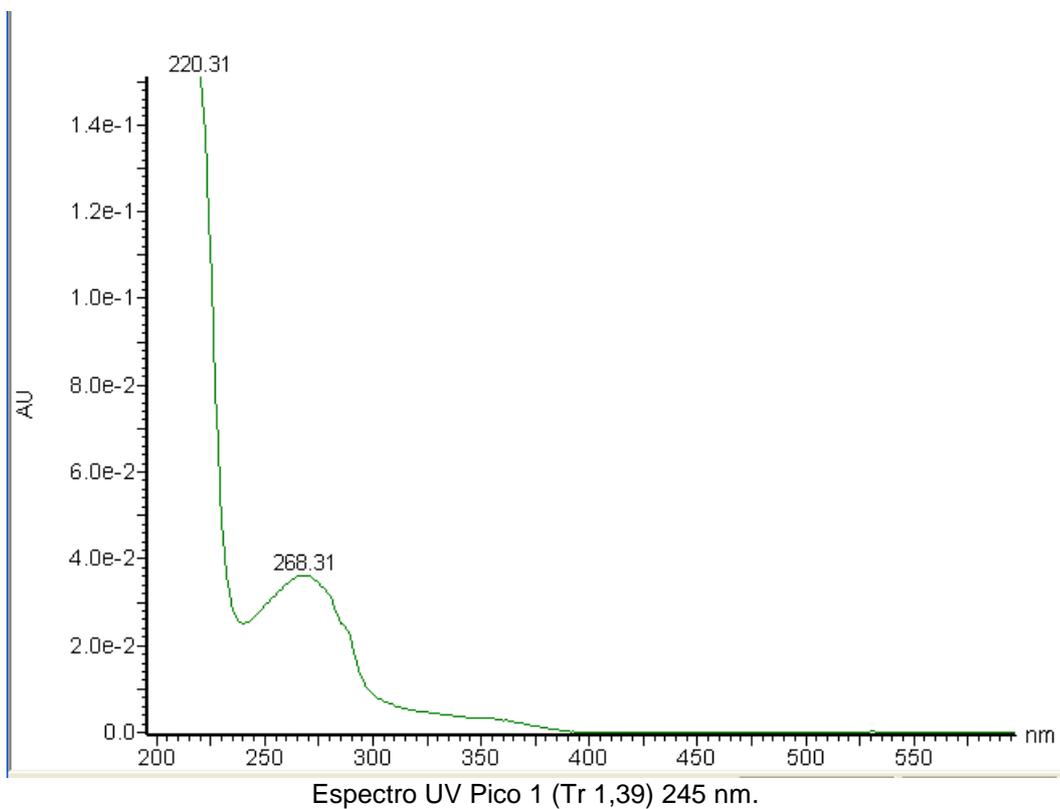
* No hay réplicas de campo. Media y desviación estándar de las réplicas analíticas.

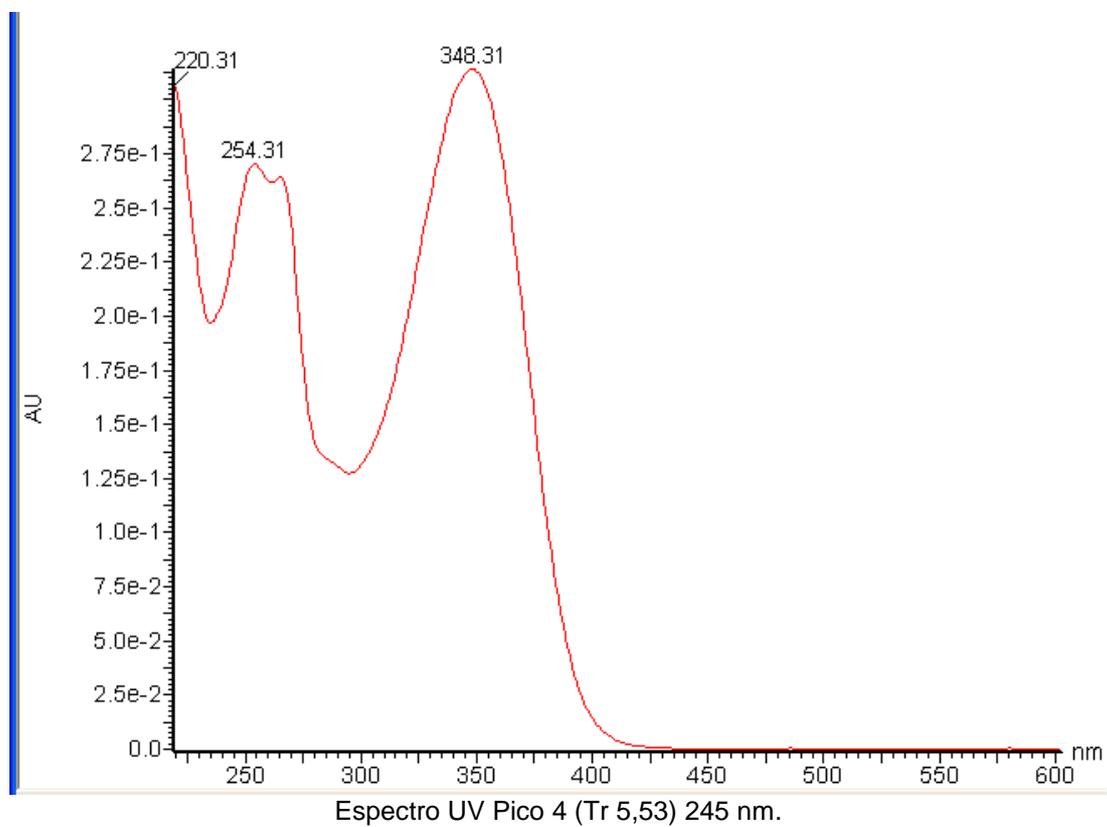
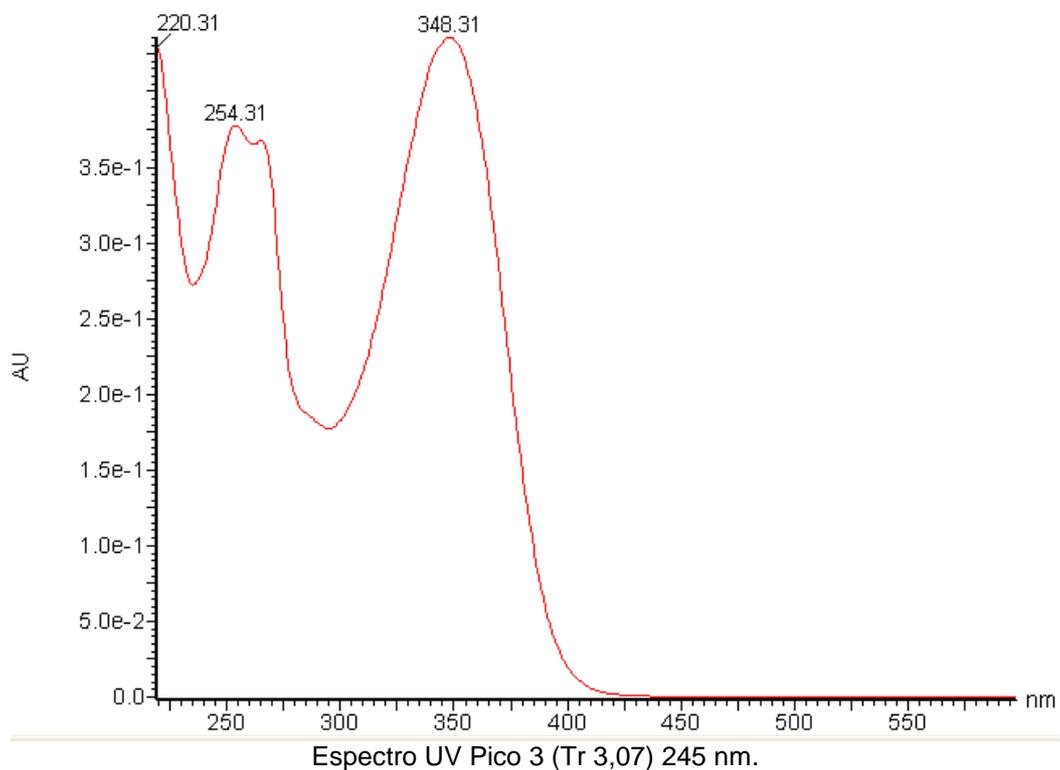
pH en suelos.

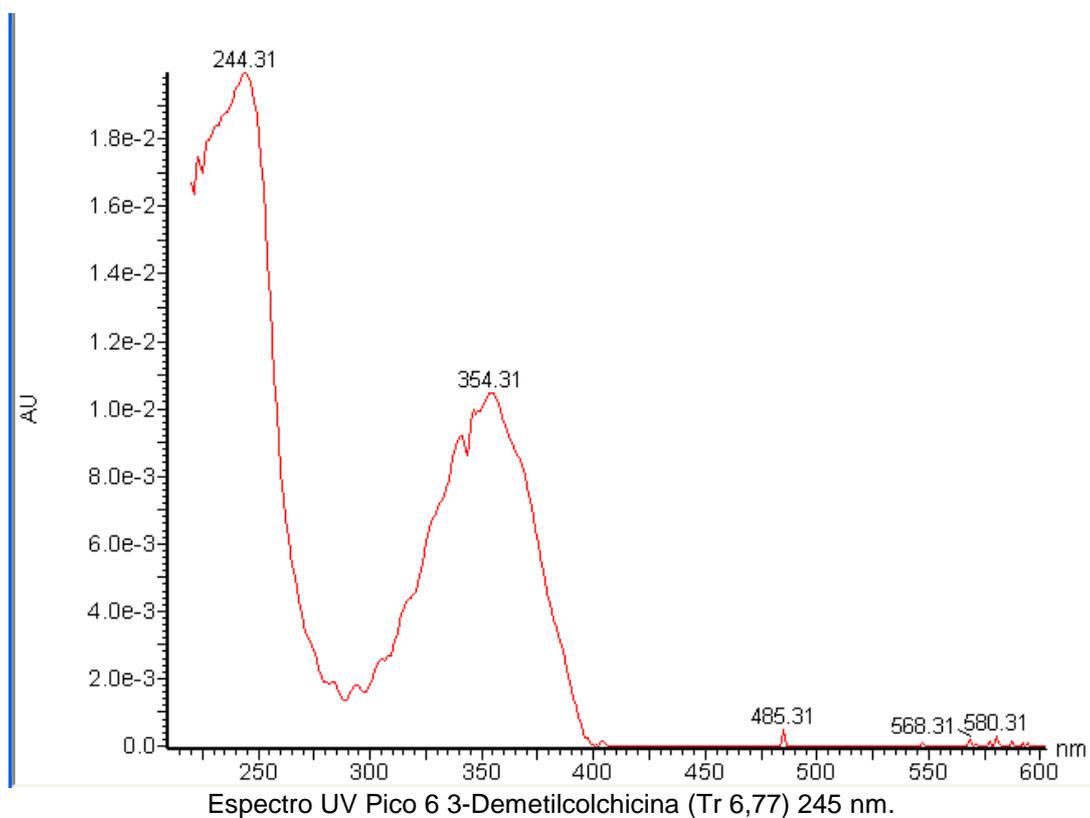
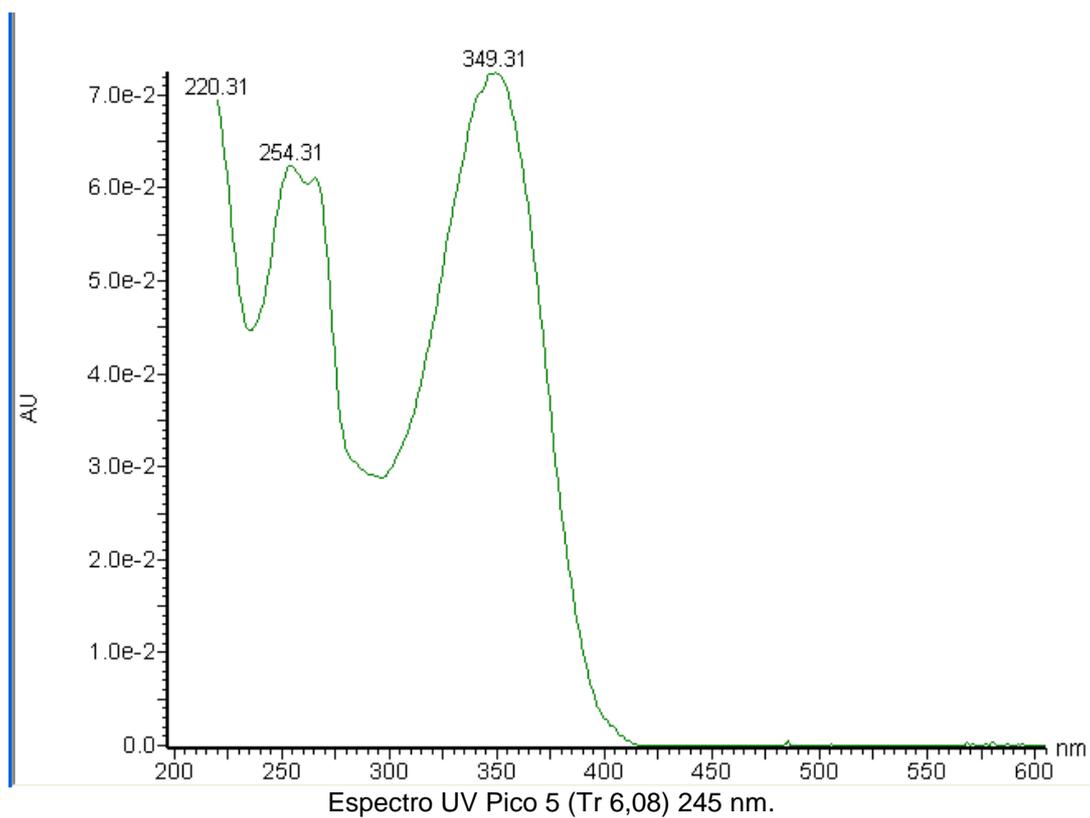
Muestra suelo	Réplicas de campo	pH		Media (B)	Desviación (σ)
		Réplica 1	Réplica 2		
CUBILAR DE LAS VACAS	Vacas1	5,39	5,44	5,48	0,06
	Vacas2	5,47	5,50		
	Vacas3	5,53	5,53		
PUERTO DE AISA	Aisa1	6,58	6,58	6,53	0,11
	Aisa2	6,41	6,40		
	Aisa3	6,60	6,61		
SAN JUAN DE LA PEÑA	Peña1	7,69	7,75	6,91	0,78
	Peña2	6,88	6,84		
	Peña3	6,15	6,17		
SALTO DE ROLDÁN	Roldan1	7,98	7,96	7,82	0,13
	Roldan2	7,80	7,75		
	Roldan3	7,72	7,71		
GUASILLO	Guasillo1	8,13	8,06	8,12	0,14
	Guasillo2	7,99	7,98		
	Guasillo3	8,23	8,28		
MONTMESA*	Montmesa	8,30	8,35	8,33	0,04
MARCÉN*	Marcén	8,02	8,01	8,02	0,01
SAN MATEO DE GÁLLEGO*	Mateo	8,13	8,18	8,16	0,04
MONZÓN	Monzón	8,71	8,67	8,69	0,03

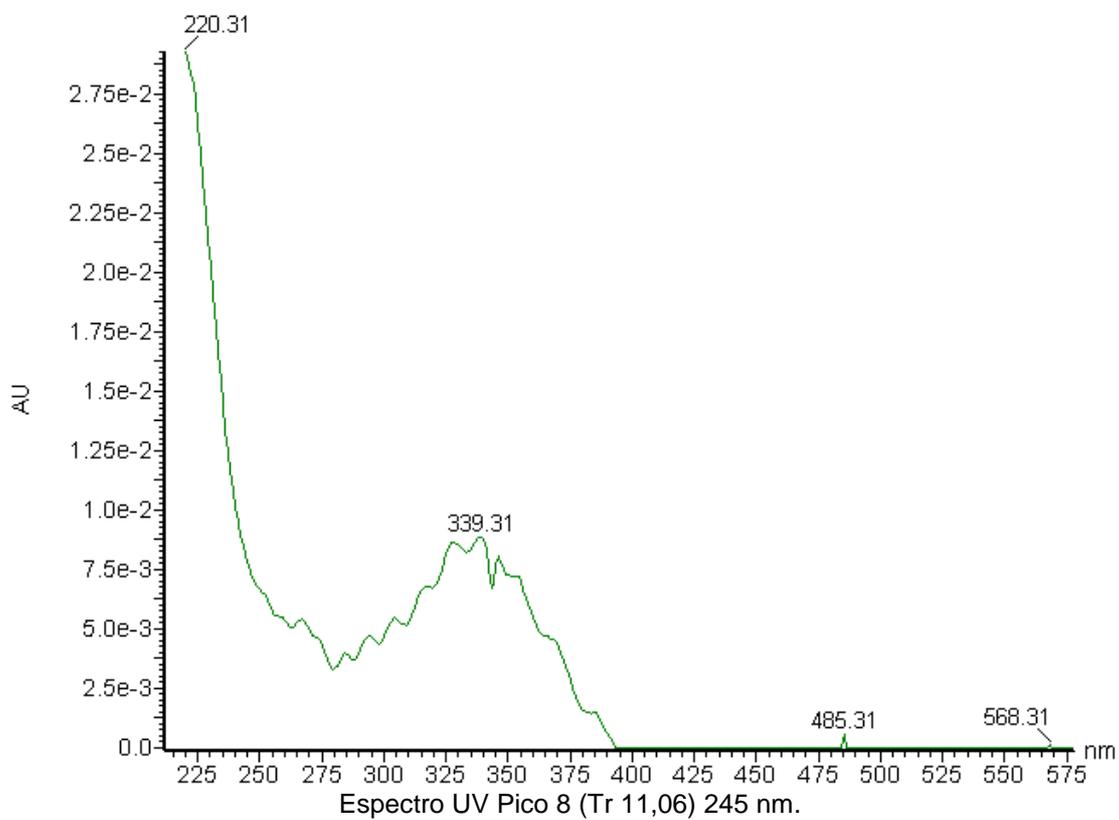
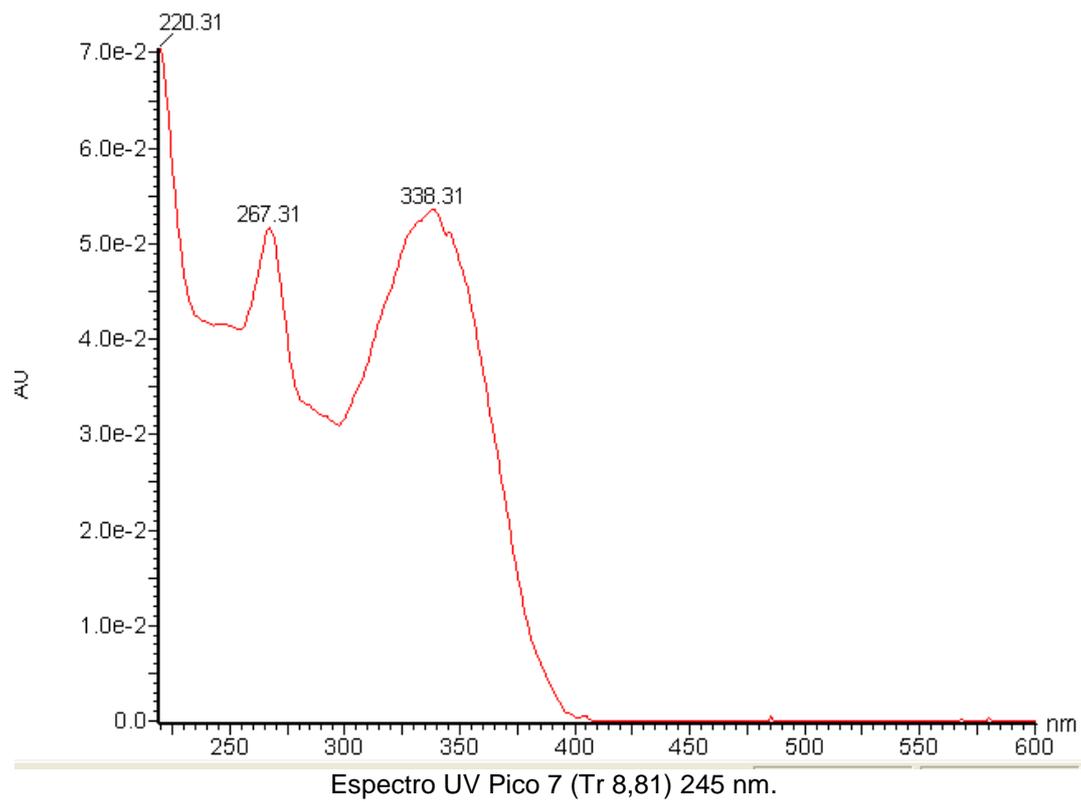
* No hay réplicas de campo. Media y desviación estándar de las réplicas analíticas.

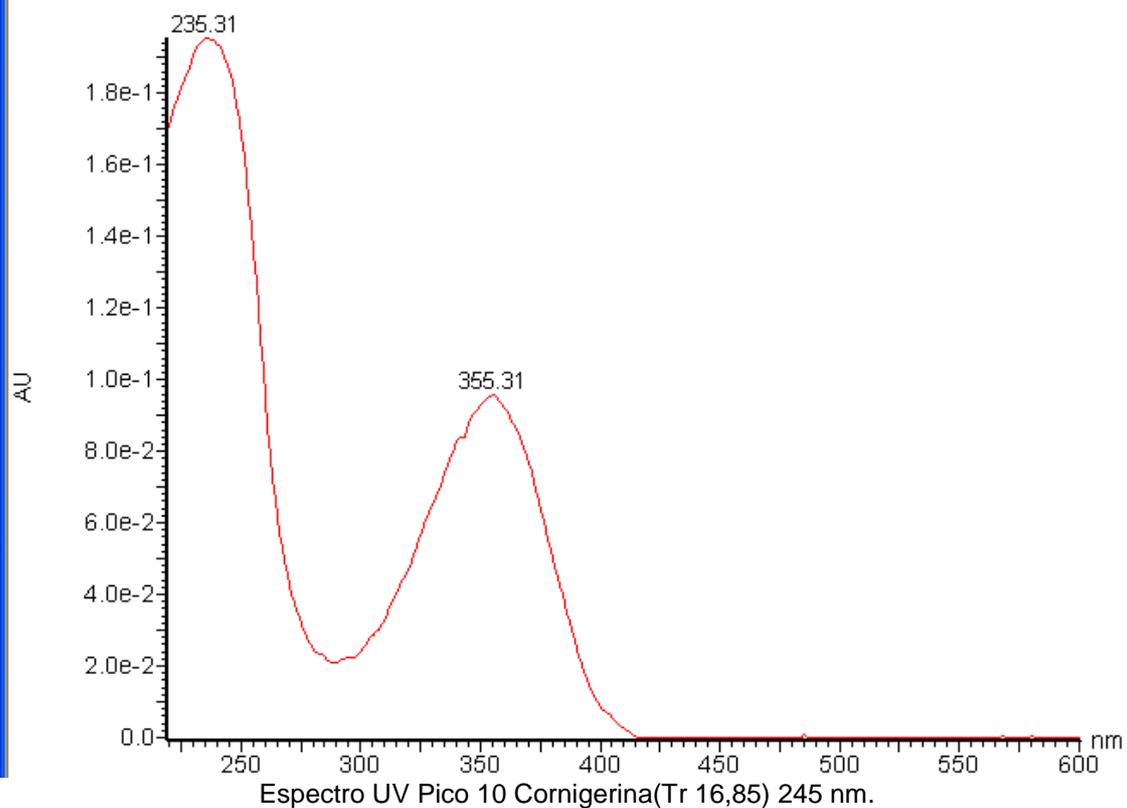
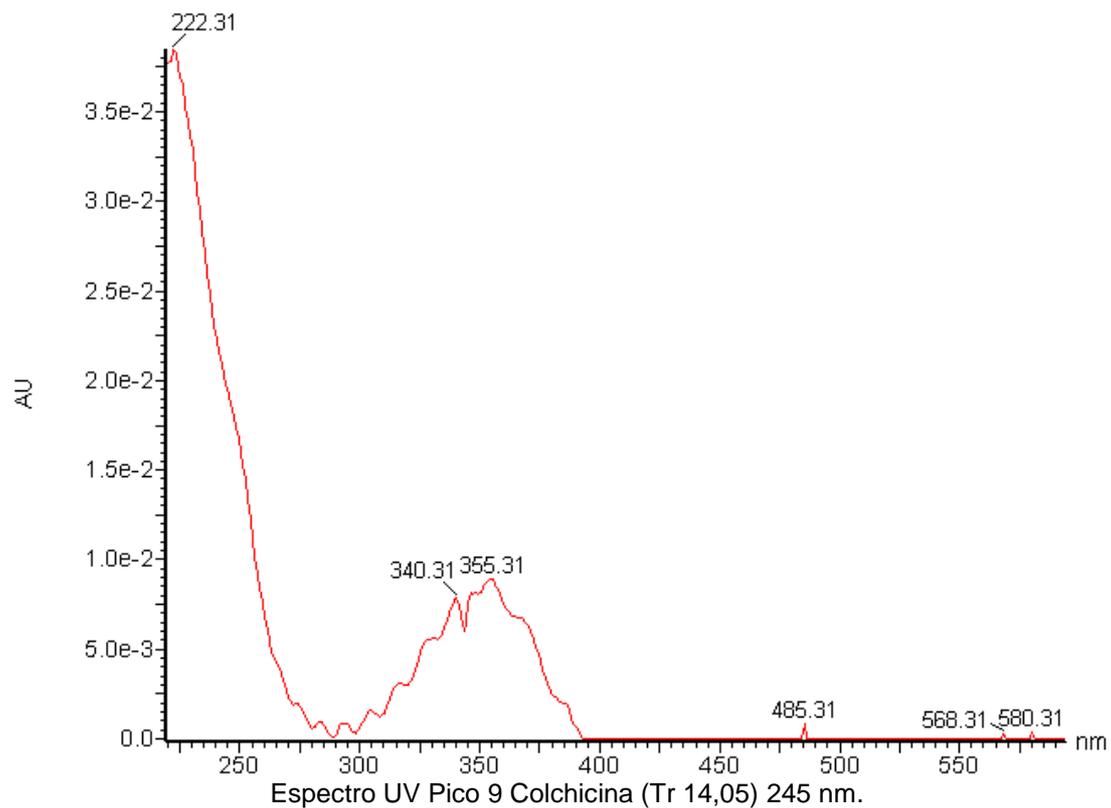
Anexo 3: Espectros de absorción uv-vis obtenidos con el análisis del hplc-ms











Anexo 4: Matrices de correlación análisis SPSS

Matriz de correlaciones de las variables: alcaloides individuales y totales en hoja y bulbo; NKT en planta; nitratos, amonio y pH en suelos.

		CLS	DM	CLN	COR	ALCAL_TOT	NKT	NITRATOS	AMONIO	PH
CLS	Correlación de Pearson	1	-,746**	-,216	-,826**	-,704**	-,735**	,214	,126	-,085
	Sig. (bilateral)		,000	,390	,000	,001	,001	,394	,620	,738
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
DM	Correlación de Pearson	-,746**	1	,574*	,933**	,942**	,973**	,147	,017	-,075
	Sig. (bilateral)	,000		,013	,000	,000	,000	,561	,947	,768
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
CLN	Correlación de Pearson	-,216	,574*	1	,571*	,741**	,647**	,524*	-,183	-,716**
	Sig. (bilateral)	,390	,013		,013	,000	,004	,026	,468	,001
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
COR	Correlación de Pearson	-,826**	,933**	,571*	1	,970**	,939**	,095	-,008	-,090
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,013		,000	,000	,707	,976	,723
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
ALCAL_TOT	Correlación de Pearson	-,704**	,942**	,741**	,970**	1	,959**	,241	-,030	-,252
	Sig. (bilateral)	,001	,000	,000	,000		,000	,335	,907	,314
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
NKT	Correlación de Pearson	-,735**	,973**	,647**	,939**	,959**	1	,233	,016	-,194
	Sig. (bilateral)	,001	,000	,004	,000	,000		,352	,951	,440
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
NITRATOS	Correlación de Pearson	,214	,147	,524*	,095	,241	,233	1	-,139	-,619**
	Sig. (bilateral)	,394	,561	,026	,707	,335	,352		,581	,006
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
AMONIO	Correlación de Pearson	,126	,017	-,183	-,008	-,030	,016	-,139	1	,436

	Sig. (bilateral)	,620	,947	,468	,976	,907	,951	,581		,070
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
PH	Correlación de Pearson	-,085	-,075	-,716**	-,090	-,252	-,194	-,619**	,436	1
	Sig. (bilateral)	,738	,768	,001	,723	,314	,440	,006	,070	
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18

T	Correlación de Pearson	-,204	-,225	-,169	,485	,473	-,575	-,765*	1
	Sig. (bilateral)	,599	,561	,663	,185	,199	,105	,016	
	N	9	9	9	9	9	9	9	9

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas).

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).