

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA DE ANALISIS DE ALCALOIDES  
TOTALES EN EL GENERO *Erythrina* spp. POR ESPECTROSCOPIA  
ULTRAVIOLETA (UV).

POR

GERARDO RODRIGUEZ RODRIGUEZ

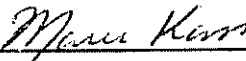
Turrialba, Costa Rica

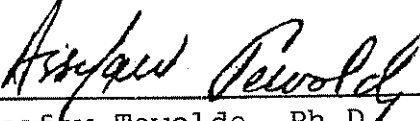
1992

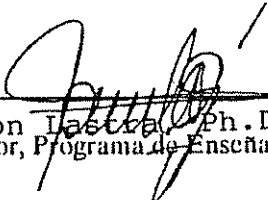
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:


*MAGISTER SCIENTIAE*

FIRMANTES:

  
\_\_\_\_\_  
María L. Kass, Ph.D.  
Profesor Consejero

  
\_\_\_\_\_  
Assefaw Tewolde, Ph.D.  
Jefe, Area de Posgrado

  
\_\_\_\_\_  
Ramón Iáctza, Ph.D.  
Director, Programa de Enseñanza

  
\_\_\_\_\_  
Gerardo Rodríguez R.  
Candidato

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA DE ANALISIS DE ALCALOIDES  
TOTALES EN EL GENERO *Erythrina* spp. POR ESPECTROSCOPIA  
ULTRAVIOLETA (UV).

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza, para optar al grado de:

*magister Scientiae*

POR

GERARDO RODRIGUEZ RODRIGUEZ

Turrialba, Costa Rica

1992

## DEDICATORIA

A mis dos grandes amores, mi esposa Cristina y nuestra hija Yeimy por su paciencia, amor y fé depositada en mí.

## AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) por la gran oportunidad brindada para realizar mis estudios de maestría.

A mi profesora consejera principal y amiga la Doctora María Kass, por su gran sensibilidad humana, la confianza depositada en mí para la realización de esta maestría y por su acertada guía y revisión del presente estudio.

Al profesor miembro del Comité Asesor Doctor Danilo Pezo, por su valiosa orientación, revisión del presente estudio y por su amistad.

A los profesores miembros del Comité Asesor Doctores Francisco Romero y Oscar Castro, por sus enseñanzas, aportes técnicos y amistad brindada.

A los profesores miembros del Area de Ganadería Tropical, los Doctores Richard Taylor, Gustavo Morales y Assefaw Tewolde que hicieron posible mi superación técnica.

A los profesores del CATIE, los Doctores Donald Kass, Pedro Ferreira, José Arze, Octavio Ramirez y Gilda Piaggio por compartir sus valiosos conocimientos.

A la Licenciada Circe Ramirez por su amistad y colaboración en los análisis de las muestras de mi tesis.

A Frank López (Raja) por su amistad y colaboración en diferentes actividades realizadas en el laboratorio durante mis estudios.

Al Licenciado Diego Delgado (Pupito) por su amistad y colaboración en investigaciones conjuntas.

Al Master Muhammad Ibrahim por su amistad y colaboración para conmigo y mi familia.

Al M.Sc. Ovidio Novoa (Kenovic) por su sincera amistad y gran compañerismo mostrado en todo momento.

A Carlos Aguirre (Charli), Carlos Castillo, Marlene Moya (Moyona), Jorge Esquivel, Lorena Pereira y Rosemary Garro por su amistad y colaboración.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron con su apoyo para la realización de esta tesis.

## CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| RESUMEN.....  | viii   |
| SUMMARY.....  | x      |
| LISTA DE CUADROS.....   | xii    |
| LISTA DE FIGURAS.....   | xiv    |
| 1. INTRODUCCION.....  | 1      |
| 2. REVISION DE LITERATURA.....                                      | 3      |
| 2.1 Distribución y usos de especies de<br><i>Erythrina</i> spp..... | 3      |
| 2.2. Alcaloides.....  | 8      |
| 2.2.1. Definición y clasificación.....                              | 8      |
| 2.2.2 Alcaloides en <i>Erythrina</i> spp.....                       | 10     |
| 2.2.3 Biosíntesis.....  | 11     |
| 2.2.4. Cuantificación.....  | 18     |
| 2.2.5. Consideraciones farmacológicas.....                          | 19     |
| 3. MATERIALES Y METODOS.....  | 21     |
| 3.1. Desarrollo metodológico.....                                   | 21     |
| 3.1.1. Extracción.....  | 21     |
| 3.1.2. Purificación.....  | 22     |
| 3.1.3. Análisis.....  | 23     |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.2.     | Evaluación de la precisión<br>y diferencias del método según el<br>tratamiento de muestra empleado.....                          | 24 |
| 3.2.1.   | Selección del material<br>experimental.....  | 24 |
| 3.2.2.   | Preparación de la muestra.....   | 25 |
| 3.2.2.a. | Secado al horno.....   | 25 |
| 3.2.2.b. | Secado por liofilización.....  | 25 |
| 3.2.2.c. | Muestra fresca.....  | 26 |
| 3.2.3.   | Diseño experimental y análisis<br>estadístico.....   | 26 |
| 4.       | RESULTADOS Y DISCUSION.....  | 30 |
| 4.1      | Extracción.....  | 30 |
| 4.2      | Purificación.....  | 35 |
| 4.3      | Análisis.....  | 36 |
| 4.4      | Metodología propuesta para la<br>cuantificación de alcaloides totales<br>presentes en hojas de poró ( <i>Erythrina</i> spp)..... | 36 |
| 4.4.1    | Equipo, cristalería y reactivos<br>empleados.....  | 36 |
|          | A. Extracción.....   | 36 |
|          | B. Purificación.....   | 39 |
|          | C. Análisis.....   | 40 |
| 4.4.2.   | Metodología de extracción<br>y análisis de alcaloides totales en<br>hojas de poró ( <i>Erythrina</i> spp).....                   | 41 |
| 4.4.2.1  | Procedimiento de extracción.....   | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 4.4.2.2. Procedimiento de purificación.....  | 41 |
| 4.4.2.3 Procedimiento de análisis.....   | 42 |
| 4.4.2.3.1 Análisis por espec-<br>troscopía ultravioleta (UV).....                                  | 42 |
| 4.4.2.3.2 Análisis por cromatografía líquida<br>de alta presión (HPLC).....                        | 42 |
| 4.5 Efecto del tratamiento de las<br>muestras previo a las determinaciones<br>del laboratorio..... | 44 |
| 5. CONCLUSIONES.....   | 55 |
| 6. RECOMENDACIONES.....  | 56 |
| 7. BIBLIOGRAFIA.....   | 57 |



## RESUMEN

RODRIGUEZ R.,G. 1992. Desarrollo de una metodología de análisis de alcaloides totales en el género *Erythrina* spp. por espectroscopía ultravioleta (UV). Tesis Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE.

**Palabras claves:** *Erythrina*, alcaloides, espectroscopía ultravioleta (UV), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), extracción, purificación, análisis.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Area de Ganadería Tropical del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), con el propósito de desarrollar una metodología de análisis de alcaloides totales en poró (*Erythrina* spp). Esta debía ser sencilla rápida y bajo costo, pero tan precisa como otros métodos convencionales, para ser utilizada en la selección de clones del género *Erythrina* spp.

La investigación consistió de dos etapas:

1. Desarrollo metodológico (extracción purificación y análisis).
2. Evaluación de la precisión y efecto de secado de la muestra (horno, liofilizado y fresco).

Para el desarrollo metodológico se empleó el clon 2652 de la especie *Erythrina berteroana* y para la segunda etapa se emplearon seis clones, los cuales correspondieron a las especies *E.berteroana*, *E.poeppigiana* y *E.costaricensis* del archivo clonal de *Erythrina* del CATIE. El desarrollo metodológico consistió en realizar pruebas de extracción, purificación y análisis de los alcaloides con el fin de lograr una metodología que estuviese acorde con el objetivo planteado. En la segunda etapa, ya con la metodología desarrollada se evaluó su precisión y el efecto de secado de la muestra (secado al horno a 60 °C por 48 horas, liofilizado por igual periodo de tiempo y la muestra en fresco, molida a 1 mm bajo nitrógeno líquido).

Todos los resultados en cuanto a concentración de alcaloides fueron expresados como absorbancia por gramo de muestra seca (A/g MS).

Para evaluar la precisión del método desarrollado se empleó un diseño completamente al azar de una vía y los cuadrados medios de los clones y el error se emplearon en el cálculo del coeficiente de correlación intraclase. Para evaluar el efecto del secado, se usó un modelo de bloques al

azar con individuos como bloques, tratamientos y su interacción.

Los resultados del desarrollo metodológico demuestran que el mejor disolvente para la extracción de los alcaloides corresponde al cloroformo alcalino (0.1 % de hidróxido de sodio) y un tiempo de calentamiento de 30 minutos. La columna desechable purificó bien los alcaloides y por espectroscopía ultravioleta pudieron ser analizados.

Después de realizar estos análisis estadísticos se logró demostrar que el secado al horno fue el mas preciso, sin embargo el secado por liofilización estuvo muy cercano y la magnitud de los valores obtenidos en el análisis de alcaloides fue mayor. Los resultados del análisis en los diferentes tratamientos de secado se correlacionaron con métodos convencionales de análisis de alcaloides resultando en un valor de correlación superior al 0.9. Después de realizar este experimento se concluyó que esta técnica de uv (ultravioleta), es adecuada para analizar alcaloides totales en hojas de poró, a bajo costo, con equipo sencillo, rápido y con una alta precisión.

## SUMMARY

RODRIGUEZ R.,G. 1992. Development of a methodology of analysis of total alkaloids in the genus *Erythrina* spp by ultraviolet-visible spectroscopy (UV). Master of Science Thesis. Turrialba, Costa Rica.

**Key words:** Erythrina, alkaloids, ultraviolet spectroscopy (UV), high pressure liquid chromatography (HPLC), extraction, purification, analysis.

This study was conducted in the Animal Nutrition laboratory in the Tropical Cattle Department at the Tropical Agricultural Research and Training Center (CATIE), to develop a method of total alkaloid analysis in poro (Erythrina spp.). This should be easy, fast and inexpensive, but as precise as other conventional methods, to be used in clone selection of the Erythrina spp. genus.

Research consisted of two stages:

1. Methodological development (extraction, purification and analysis).
2. Evaluation of precision and effect of sample drying (oven, lyophilization, and fresh).

The clone 2652 of the Erythrina berteroana species was used for the methodological development, and six clones pertaining to the species E.berteroana, E.poeppigiana and E.costaricensis of CATIE's clone bank were used in the second stage. The methodological development consisted of conducting extraction and purification tests and alkaloid analyses to achieve a methodology in accordance with the objective. In the second stage, the precision and effect of sample drying (oven drying at 60 C for 48 hours, lyophilization for the same amount of time and the fresh sample ground in 1 mm in liquid nitrogen) were evaluated.

All of the results of alkaloid concentration were expressed as absorbance per gram of dry sample (A/g DS).

A completely randomized one-way design was used to evaluate the precision of the method and the half squares of the clones and the error were used to calculate the interclass correlation coefficient. The randomized block design, with individual treatments and their interactions as blocks, was used to evaluate the effect of drying.

Results of the methodological development showed that the best solvent for alkaloid extraction was alkaline chloroform (0.1 % sodium hydroxide) with a 30 minute heating period. The column purified the alkaloids well so that they could be analyzed by ultraviolet spectroscopy.

After conducting these statistical analyses, it was shown that oven drying was the most precise; however, lyophilization drying was closest, and the magnitude of values obtained in alkaloid analysis was greater. Results of the analysis in the different drying treatments correlated with conventional methods of alkaloid analysis resulting in a correlation value above 0.9. After finishing this experiment, it was concluded that the uv (ultraviolet) technique, is adequate to analyze total alkaloids in poro leaves, quickly, precisely, and at a low cost, with simple equipment.

## LISTA DE CUADROS

Página

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Cuadro 1.  | Producción de biomasa de algunas especies de <i>Erythrina</i> .....   | 4  |
| Cuadro 2.  | Calidad de biomasa en algunas especies de <i>Erythrina</i> .....  | 5  |
| Cuadro 3.  | Alcaloides en semillas de especies americanas del género <i>Erythrina</i> , estudiadas en el laboratorio Roger Adams.....                               | 16 |
| Cuadro 4.  | Ocurrencia de alcaloides en hojas de cuatro especies de <i>Erythrina</i> , estudiadas en Cardiff.....   | 17 |
| Cuadro 5.  | Algunas de las propiedades físicas más importantes de alcaloides presentes en el género <i>Erythrina</i> .....  | 19 |
| Cuadro 6.  | Efecto farmacológico de algunos alcaloides presentes en hojas y semillas de especies del género <i>Erythrina</i> .....                                  | 20 |
| Cuadro 7.  | Especies y clones de <i>Erythrina</i> a utilizar en los ensayos de desarrollo metodológico.....   | 24 |
| Cuadro 8.  | Influencia de dos métodos de extracción e hidrólisis sobre muestras foliares de <i>Erythrina berteriana</i> en la cantidad de alcaloides extraídos..... | 31 |
| Cuadro 9.  | Concentración (A/g MS) de alcaloides totales presentes en las hojas de seis individuos del género <i>Erythrina</i> .....                                | 45 |
| Cuadro 10. | Prueba de rango múltiple de Duncan para la variable contenido de alcaloides totales en poró ( <i>Erythrina spp</i> ).....                               | 48 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Cuadro 11. | Análisis de varianza de los seis clones de poró ( <i>Erythrina</i> spp) utilizados en la cuantificación de alcaloides totales.....  | 48 |
| Cuadro 12. | Coefficiente de correlación intracase (r) para las determinaciones de alcaloides totales en muestras de poró ( <i>Erythrina</i> spp) sometidas a diversos tratamientos de secado previas a su análisis..... | 50 |
| Cuadro 13. | Prueba de correlación de los diferentes métodos evaluados en la cuantificación de alcaloides totales en poró ( <i>Erythrina</i> spp).....   | 51 |

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Estructura química y algunos ejemplos de los alcaloides tipo alquenófilo presentes en el género *Erythrina*.....12
- Figura 2.** Estructura química y algunos ejemplos de los alcaloides tipo dienófilo presentes en el género *Erythrina*.....13
- Figura 3.** Estructura química de dos tipos de alcaloides lactónicos presentes en *Erythrina*.....14
- Figura 4.** Esquema resumido de la ruta biosintética de los alcaloides presentes en el género *Erythrina*.....15
- Figura 5.** Esquema de la columna desechable de 5 ml empleada en la purificación de los alcaloides.....23
- Figura 6.** Efecto de la concentración de hidróxido de sodio sobre la cantidad de alcaloides extraídos.....32
- Figura 7.** Efecto del tiempo de calentamiento de la muestra a baño maría sobre la cantidad de alcaloides totales extraídos.....33
- Figura 8.** Cromatograma en HPLC de dos extracciones consecutivas de alcaloides totales en hojas de poró (*Erythrina* spp.).....34
- Figura 9.** Cromatograma en HPLC de los diferentes lavados en el proceso de purificación del extracto de alcaloides totales en poró (*Erythrina* spp).....37

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 10. | Espectro de absorción ultravioleta (UV) del extracto de alcaloides totales de poró ( <i>Erythrina</i> spp) en diferentes disolventes.....                         | 38 |
| Figura 11. | Diagrama de flujo para el procedimiento propuesto para el análisis de alcaloides totales en poró ( <i>Erythrina</i> spp).....                                     | 43 |
| Figura 12. | Concentración de alcaloides totales en seis clones de poró ( <i>Erythrina</i> spp) a diferentes tratamientos de secado de la muestra.....                         | 46 |
| Figura 13. | Cromatograma en HPLC del extracto de alcaloides totales presentes en hojas de poró ( <i>Erythrina</i> spp) a diferentes tratamientos de secado de la muestra..... | 47 |
| Figura 14. | Diagrama de flujo para el procedimiento ácido-base (A-B) para el análisis de alcaloides totales en poró ( <i>Erythrina</i> spp).....                              | 53 |
| Figura 15. | Diagrama de flujo para el procedimiento propuesto por PAYNE (1991), para el análisis de alcaloides en poró ( <i>Erythrina</i> spp).....                           | 54 |



## 1. INTRODUCCION

Existe una serie de compuestos químicos producto del metabolismo no esencial de las plantas (metabolitos secundarios) que se encuentran en una gran variedad de especies forrajeras. Estos metabolitos podrían estar relacionados con problemas tales como: la toxicidad potencial de algunas plantas forrajeras, deficiencias inducidas y efectos adversos sobre la respuesta animal, cuando estas especies son consumidas.

Los alcaloides corresponden a este grupo de compuestos, e incluyen una amplia variedad de sustancias con grupos de heterociclos nitrogenados que exhiben tanto acción farmacológica como actividad inhibitoria a nivel ruminal.

La presencia de alcaloides en pastos y forrajes es un gran problema para los animales que pastorean o consumen estos materiales; por ejemplo los alcaloides en *Veratrum (Phalavis arundinacea L.)* causan efectos teratogénicos en ovejas (malformaciones ciclópicas al nacimiento). En gramíneas los estudios se han concentrado en los alcaloides del pasto canario rojo (*Saccharum officinarum*) y en los alcaloides del grupo de la Perlolina presentes en *Lolium* y *Festuca sp*, por estar en estos compuestos asociados a los bajos consumos de estas especies. Los alcaloides en gramíneas han sido reportados como limitantes de la digestión por sus efectos deletéreos sobre los organismos del rumen.

El poró, una fabácea perteneciente al género *Erythrina* que esta distribuída ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales, es empleada en Costa Rica como árbol de sombra en los cafetales y cacaotales, en cercas vivas y, en

años recientes, como follaje en la alimentación tanto de caprinos como bovinos.

Todas las especies de *Erythrina* examinadas hasta el momento han mostrado la presencia de alcaloides. Los extractos de semilla con altas concentraciones de estos metabolitos, denotan un efecto de parálisis selectiva del nervio motor de músculos de animales como el ratón, conejo, etc.

Los alcaloides presentes en las especies de este género son bastante conocidos y se clasifican en "dienófilos", "alquenófilos", y "lactónicos", distinguiéndose entre este último grupo la  **$\beta$ -Eritroidina**, como uno de los más tóxicos.

Existe una gran cantidad de métodos de purificación y cuantificación de estos metabolitos en la literatura. La mayoría de los procedimientos requieren equipo costoso y sofisticado, como espectrofotómetro ultravioleta (UV), cromatógrafo de gas (GC) y cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC); además de que para su cuantificación, es necesario contar con alcaloides puros (no disponibles en el mercado), como patrones en la cuantificación.

Con esta investigación se pretende establecer una metodología de análisis de alcaloides totales que sea sencilla, rápida y de bajo costo, pero tan precisa como otros métodos convencionales, para ser utilizada en la selección de clones del género *Erythrina*.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Distribución y usos de especies de *Erythrina* spp

A nivel mundial, el género *Erythrina* presenta alrededor de cien especies, de las cuales 36 se encuentran en América Central (NEILL, 1987).

Algunas de las especies están ampliamente distribuidas, tal es el caso de *Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook., que crece desde Costa Rica hasta Bolivia; *E. fusca* Willd , originaria de Centro y Suramérica y *E. berteroana* Urban localizada desde el sur de México hasta Colombia y Venezuela.

Estas especies han sido utilizadas como postes vivos para cercas; sombra y abono para cultivos anuales y perennes; soporte para plantas trepadoras, mejoradoras de suelos en programas de conservación y como forrajes en la alimentación de animales (RUSSO, 1984).

En los Cuadros 1 y 2 se pueden observar datos obtenidos por varios autores, en relación a la producción y calidad de biomasa en algunas especies de *Erythrina* spp.

La producción de biomasa del poró es variable, dependiendo del sistema de manejo que se le dé a la plantación. RUSSO (1982) En sistemas asociados con café, en los cuales el fin primordial del poró es el proveer sombra y en donde los árboles estaban sembrados con un distanciamiento de (6 x 6) m, se obtuvo un promedio de 6.46 kg de materia seca de biomasa comestible/árbol. En un estudio complementario sobre la misma plantación se reportan rendimientos promedio de 11.7 y 13.9 kg de biomasa comestible por árbol, con una y dos podas anuales, respectivamente.

Cuadro 1. Producción de biomasa de algunas especies de *Erythrina* spp.

| Fuente                      | Biomasa <sup>1</sup><br>(Kg MS/árb) | Frec. poda<br>(meses) | Edad<br>(años) | Especie | D.s.<br>(m) | Sistema               |
|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|----------------|---------|-------------|-----------------------|
| Russo<br>(1982)             | 6.46                                | 12                    | 8              | p2      | 6x6         | sombra<br>de café     |
| Espinoza<br>(1985)          | 0.83                                | 3                     | 3              | p       | 1.25        | cerca<br>viva         |
|                             | 1.36                                | 5                     | 3              | p       | 1.25        |                       |
| Rodríguez<br>(1985)         | 1.95                                | 4                     | 2              | p       | 3x2         | pastizal              |
|                             | 0.78                                | 4                     | 2              | p       | 3x1         | pastizal              |
|                             | 0.69                                | 3                     | 2              | p       | 3x2         | pastizal              |
|                             | 0.50                                | 3                     | 2              | p       | 3x1         | pastizal              |
| Alvarez<br>(1987)           | 2.24                                | 6                     | 1              | p       | 6x4         | cultivo               |
|                             | 2.58                                | 6                     | 1              | p       | 6x3         | callejones            |
|                             | 2.07                                | 6                     | 1              | p       | 6x2         |                       |
|                             | 1.78                                | 6                     | 1              | p       | 6x1         | con maíz              |
| Sánchez<br>et al<br>(1989a) | 0.13                                | 3                     | 0.66           | b       | 0.5x0.5     | plantación            |
|                             | 0.13                                | 4                     | 0.66           | b       | 0.5x0.5     |                       |
|                             | 0.15                                | 6                     | 0.66           | b       | 0.5x0.5     |                       |
| Sánchez<br>et al<br>(1989b) | 0.84                                | 3                     | 8              | b       | 1.0         | cerca<br>viva         |
|                             | 1.33                                | 6                     | 8              | b       | 1.0         |                       |
|                             | 1.18                                | 9                     | 8              | b       | 1.0         |                       |
|                             | 1.00                                | 12                    | 8              | b       | 1,0         |                       |
|                             | 1.61                                | 3                     | 5              | b       | 0.6         |                       |
|                             | 1.78                                | 6                     | 5              | b       | 0.6         |                       |
|                             | 1.14                                | 9                     | 5              | b       | 0.6         |                       |
|                             | 0.62                                | 12                    | 5              | b       | 0.6         |                       |
| Russo, et al<br>(1989)      | 0.45                                | 8                     | 4              | b       | 0.6         | cerca<br>viva         |
| Jiménez<br>(1990)           | 2.70                                | 6                     | 4              | p       | 6x4         | cultivo               |
|                             | 2.64                                | 6                     | 4              | p       | 6x3         | callejones            |
|                             | 2.50                                | 6                     | 4              | p       | 6x2         |                       |
|                             | 1.52                                | 6                     | 4              | p       | 6x1         | con maíz              |
| Nygren<br>(1990)            | 1.01                                | 6                     | 1              | p       | 6x4         | cultivo<br>callejones |

nota:

<sup>1</sup> = Material comestible

<sup>2</sup> p = *E. poeppigiana* b: *E. berteroana*

D.s. = densidad de siembra (metros)

Fuente: PEREZ, 1990.

Cuadro 2. Calidad de biomasa en algunas especies de *Erythrina* spp.

| Fuente                | Especie <sup>1</sup> | Materia<br>seca | Proteína<br>cruda<br>(%) | Digestibilidad<br>in vitro |
|-----------------------|----------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Mc Dowell<br>(1974)   | b                    |                 | 24.90                    |                            |
| Roldán<br>(1981)      | p                    |                 | 34.40                    |                            |
| Benavides<br>(1983b)  | p                    | 23.40           | 27.80                    |                            |
|                       | b                    | 27.80           | 24.30                    |                            |
| De León<br>(1984)     | b                    |                 | 23.10                    |                            |
| Espinoza<br>(1984)    | p                    | 30.47           | 20.35                    |                            |
|                       | p                    | 19.60           | 22.40                    |                            |
|                       | p                    | 24.40           |                          |                            |
| Rodríguez<br>(1985)   | p                    | 25.87           | 26.49                    |                            |
|                       | p                    | 22.25           | 11.37                    |                            |
|                       | p                    | 29.60           | 7.18                     |                            |
| Pineda<br>(1986)      | p                    | 20.30           | 24.52                    | 48.80                      |
| Vargas<br>(1987)      | c                    | 22.10           | 21.60                    | 51.20                      |
| Tobón<br>(1988)       | p                    | 19.20           | 24.40                    | 54.70                      |
| Abarca<br>(1989)      | p                    | 22.70           | 29.30                    | 52.29                      |
| Russo<br>et al (1989) | b                    | 26.20           | 26.30                    |                            |
| Sánchez<br>(1989a)    | b                    |                 | 29.20                    |                            |
|                       | b                    |                 | 11.90                    |                            |
|                       | b                    |                 | 5.70                     |                            |
| Alargón<br>(1990)     | p                    | 20.40           | 26.40                    | 55.60                      |

nota:

<sup>1</sup> b: *E. berteroana* c: *E. cocheata* p: *E. poeppigiana*

Fuente: PEREZ, 1990

ESPINOZA (1984), al podar árboles de una cerca viva sembrados a 1.25 metros de distancia, observó valores promedios de 0.96 y 1.18 kg de materia seca de biomasa forrajera/árbol/poda para frecuencias de corte de 3 y 5 meses, respectivamente. Resultados similares obtuvo RODRIGUEZ (1985) en una evaluación de la producción de árboles intercalados con pasto "king grass" (*Pennisetum purpureum x P.typhoides*). Los mejores resultados fueron encontrados bajo una densidad de siembra de 3 x 2 m y una frecuencia de corte de cuatro meses (1.5 kg de materia seca/árbol/poda), sin observarse diferencias significativas con respecto a otras combinaciones de densidad de siembra y frecuencias de poda en este ensayo..

ESNAOLA y BENAVIDES (1983), realizaron pruebas de aceptabilidad del follaje del poró con cabras alimentadas únicamente con ese material por 30 días. El consumo fué de 1.17 kg de MS/animal/día, lo que equivale a un 3.3% del peso vivo. No se observaron problemas asociados a toxicidad o aceptabilidad.

En la alimentación animal se han obtenido buenos resultados al sustituir parte o la totalidad de la proteína cruda (PC) de la dieta del animal por PC del follaje del poró.

PINEDA (1986) evaluó el follaje del poró en terneros de lechería de 48 kg de peso inicial sustituyendo la PC de la harina de soya hasta en un 100%, sin diferencias significativas en los tratamientos y con ganancias de peso de hasta 400 g/día. El análisis económico mostró que era recomendable la sustitución del 65% de la proteína aportada por la harina de soya por su equivalente en follaje de poró.

GUTIERREZ y BENAVIDES (1986), evaluando el poró suplementado con banano como fuente energética en la producción de leche en cabras, observaron un efecto lineal positivo del consumo de MS de poró sobre la producción y calidad (grasa, proteína y sólidos totales) de la leche.

VARGAS (1987), al suplementar con forraje de poró toretes que se manejaban en pastoreo, observó un crecimiento significativo cuando el consumo de materia seca de este material fué igual o superior al 0.30% del peso vivo. El consumo de poró estuvo determinado por los niveles de oferta, observándose además que la adición de una fuente energética como banano mejoró significativamente la ganancia de peso.

ALAGON (1990), empleando follaje de poró comparado con tres fuentes nitrogenadas de diferente degradabilidad ruminal como suplemento protéico para vacas lecheras alimentadas con caña de azúcar integral (*Saccharum officinarum*), encontró que la producción de leche para los tratamientos con harina de pescado y soya fueron superiores al follaje de poró y urea (11.0 y 10.5 cont a 9.6 y 9.3 kg/vaca/día, respectivamente). Los tratamientos afectaron el contenido de proteína en la leche, siendo superior para la harina de pescado y la soya, en tanto el poró fué superior en grasa y sólidos totales.

VASQUEZ (1991), probó el follaje de poró con dos fuentes nitrogenadas, harina de pescado y urea como suplemento en novillas de lechería alimentadas con una dieta basal de caña de azúcar integral y una suplementación energética de melaza y pulidura de arroz. Las ganancias de peso exhibieron diferencias significativas siendo de 0.763 kg/novilla/día para el tratamiento con harina de pescado, superior a la obtenida con urea (0.592 kg/vaquilla/día), pero similar al tratamiento con poró (0.647 kg/vaquilla/día).

CAMERO (1991), comparó al poró y al madero negro (*Gliricidia sepium*) como suplemento protéico en lugar de la urea, en la producción y composición de la leche de vacas consumiendo heno de jaragua (*Hiparrhenia rufa*) de baja calidad. Se encontró que la producción de leche fue estadísticamente igual para los forrajes de poró y madero negro (7.3 y 7.4 kg/vaca/día). No se encontraron diferencias para la composición de la leche para ninguno de los tratamientos.

## 2.2. Alcaloides

### 2.2.1. Definición y clasificación

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases nitrogenadas, con acción fisiológica mas o menos intensa sobre los animales. Se han encontrado unos 50 alcaloides en órganos animales, doce de éstos no son de



origen vegetal y por definición se acostumbra excluírlos del grupo.

Los alcaloides aparecen en diversas familias de plantas, hongos, algas y otros vegetales inferiores (DOMINGUEZ, 1973). La mayoría de los alcaloides presentes en los vegetales se encuentran como sales de ácidos orgánicos, aunque en algunos casos puede haber un ácido especial asociado a ellos; en éstos casos pueden estar ligados en forma de glicósidos de la ramnosa, galactosa y glucosa.

Aunque con frecuencia los alcaloides son agrupados de acuerdo a su procedencia botánica, es más racional clasificarlos de acuerdo con alguno de los 254 tipos estructurales en que hasta el momento se les ha dividido.

Se ha tratado de conocer la función de los alcaloides en las plantas, y se les ha considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno. También, se les ha asociado con la protección del vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque existen alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, pero no para los insectos. Se han aportado datos que sugieren que algunos alcaloides intervienen en el crecimiento vegetal, ya sea por su capacidad de formar quelatos o por intervenir en fenómenos de óxido-reducción.

En lo que concierne a su distribución en la planta, los alcaloides pueden estar presentes en ciertos órganos o en ciertas partes de la planta; pero en algunas especies se encuentran distribuidas en toda la planta. Hay también especies en las cuales sólo aparecen en alguna etapa fenológica de la planta, o en determinadas condiciones ecológicas.

### 2.2.2 Alcaloides en *Erythrina* spp.

Una relación botánica cercana y paralela entre todos los miembros del género *Erythrina* es la presencia de alcaloides "isoquinoli-espirocíclicos", los cuales son encontrados en todas las partes de la planta.

Existen tres tipos de alcaloides en las especies de *Erythrina*: "dienófilos, alquenófilos y lactónicos" (Figuras 1, 2 y 3 respectivamente). Los dienófilos se caracterizan por tener un sistema dieno conjugado con el anillo A y B, los alquenófilos tienen un doble enlace 1-6 en el anillo A y los lactónicos como la  $\alpha$  y  $\beta$ -Erytroidina tienen un anillo lactónico en lugar de un anillo bencénico. (Figura 3).

Desde hace más de 50 años se tiene conocimiento de la actividad "curareiforme" de estos alcaloides, la cual está asociada con la configuración de espiroamina (FOLKERS and SHAREL, 1941). En contraste con los alcaloides del curare, los cuales son sales cuaternarias, los alcaloides de *Erythrina* spp son todos aminas terciarias. Entre los

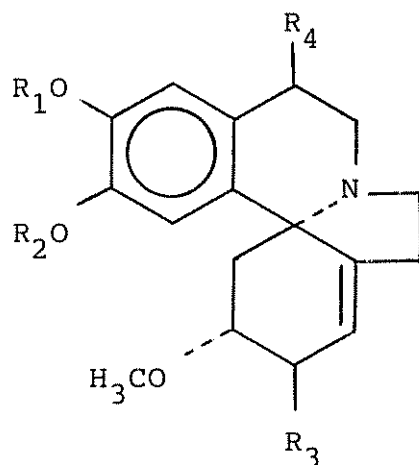
principales tipos de actividades farmacológicas se pueden citar el sedativo, hipotensivo, depresivo, laxativo y diurético (JACKSON, 1985).

Para la identificación de los alcaloides es importante clasificarlos en: alcaloides "libres" llamados con el prefijo "eritr-"; alcaloides "combinados" los cuales son ésteres del ácido sulfoacético, y en su denominación se utiliza la raíz "erisotio-" y alcaloides liberados, que son producidos de la hidrólisis de los alcaloides combinados y cuyos nombres empiezan con "eriso-".

Parte de la distribución de los alcaloides presentes en el género *Erythrina* se muestran en los Cuadros 3 y 4. Las cantidades de alcaloides "liberados" obtenidos de semillas son predominantes sobre los otros tipos y excede grandemente a la fracción de alcaloides "libres" (MARION, 1952).

### 2.2.3 Biosíntesis

Se ha especulado mucho sobre la posible ruta biosintética que conlleva a la formación de los alcaloides de *Erythrina* spp (Figura 4). Según BARTON, et al (1974), dos moles de Tirosina se condensan para formar la "Base de Shiffs", la cual por medio de un acoplamiento oxidativo fenólico para-para, y de la apertura del anillo, forma imina, la cual sufre reducción y se convierte en dibenzazonina, (BARTON, et al., 1974).



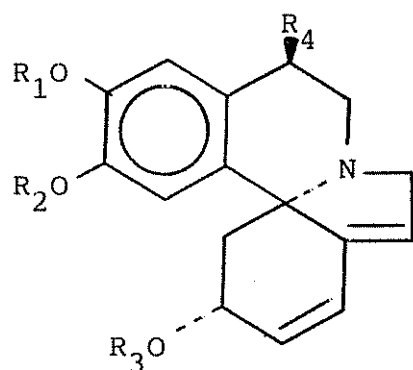
| Alcaloide         | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| a) Eritramina     | Me             | Me             | H              | H              |
| b) Eritratidina   | Me             | Me             | OH             | H              |
| c) Erisotina      | H              | Me             | OH             | H              |
| d) Erisosalvina   | ME             | H              | OH             | H              |
| e) Erisopitina    | H              | H              | OH             | H              |
| f) Eritratinona   |                | -Me-           | =O             | H              |
| g) Erisotinona    | H              | Me             | =O             | H              |
| h) Erisoflorinona | H              | H              | =O             | H              |

nota:

H = Hidrógeno (Me) = CH<sub>3</sub>- (OH) = Hidróxilo  
 (=O) = Carbonilo

Fuente: HARGREAVES and JOHNSON, 1974.

Figura 1. Estructura química y algunos ejemplos de los alcaloides tipo alquenófilo presentes en el género *Erythrina*.



| Alcaloide     | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| a) Erisodina  | H              | Me             | Me             | H              |
| b) Erisovina  | Me             | H              | Me             | H              |
| c) Erisopina  | H              | H              | Me             | H              |
| d) Eritralina | -Me-           |                | Me             | H              |
| e) Eritravina | Me             | Me             | H              | H              |
| f) Erisotrina | Me             | Me             | Me             | H              |
| g) Erisonina  | H              | Me             | H              | H              |
| h) Erisolina  | Me             | H              | H              | H              |
| i) Eritrinina | -Me-           |                | Me             | OH             |

nota:

H = Hidrógeno (Me) = CH<sub>3</sub>- (OH) = Hidróxilo

(=O) = Carbonilo

Fuente: HARGREAVES and JOHNSON, 1974.

Figura 2. Estructura química y algunos ejemplos de los alcaloides tipo dienófilo presentes en el género *Erythrina*.

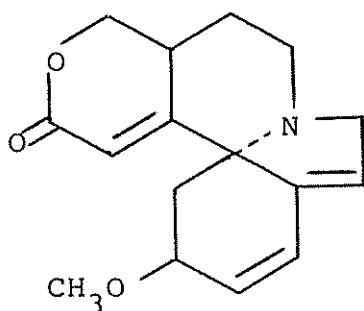
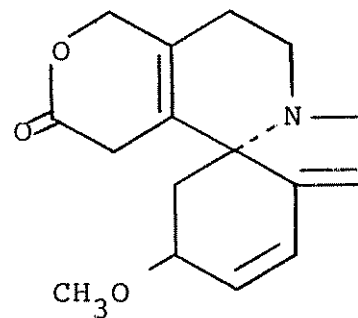
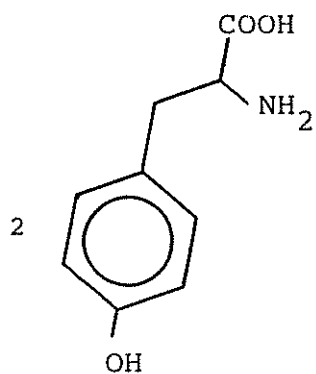
 $\beta$ -Eritroidina $\alpha$ -Eritroidina

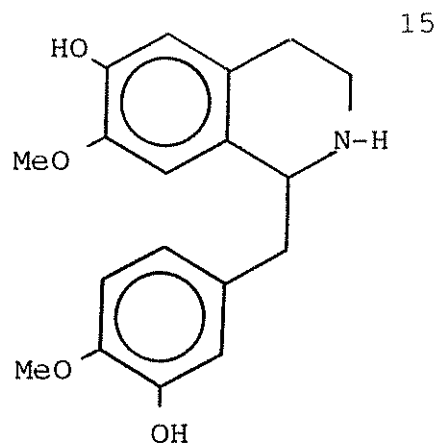
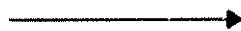
Figura 3. Estructura química de dos tipos de alcaloides lactónicos presentes en el género *Erythrina*.

Un subsecuente ataque largo del par de electrones del nitrógeno sobre el doble enlace conjugado de la diquinona, produce la erysodienona. Esta es convertida a erysoenona para que, por reducción, se convierta en erysotrina. Por pérdida de agua este alcaloide es convertido en erysodina (dieno).

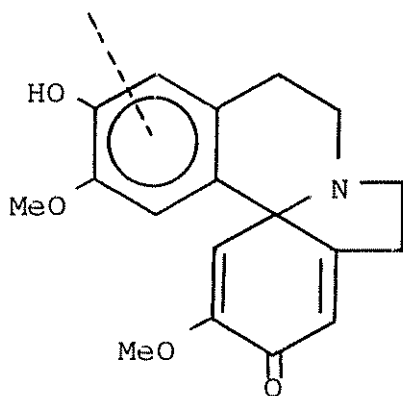
Los alcaloides lactónicos presentes en el género *Erythrina* como  $\alpha$  y  $\beta$ -Eritroidina son formados a partir de la erysopina, ya sea por un rompimiento intradiol o por uno extradiol. La forma del rompimiento no es clara, sin embargo en cualquier caso la ciclación origina  $\alpha$ -Eritroidina y por isomerización la  $\beta$ -Eritroidina (DAYNE, 1983).



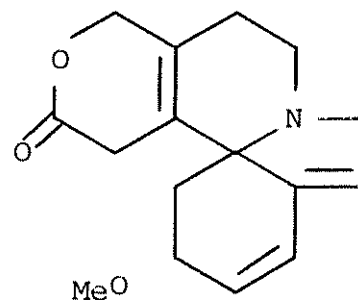
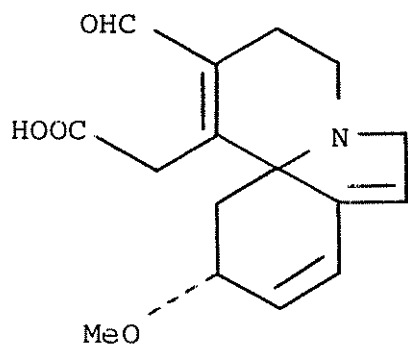
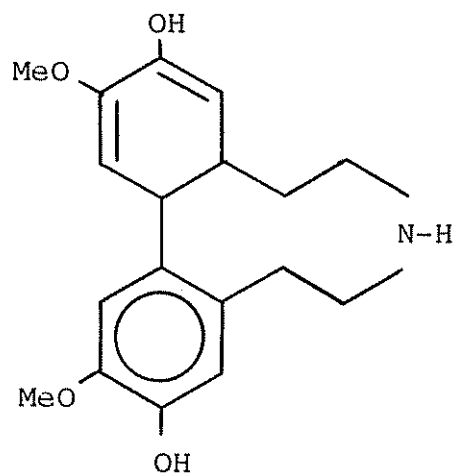
Tirosina



N-Norprotosinomenina



Erisodienona



$\alpha$ -Eritroidina

Figura 4. Esquema resumido de la ruta biosintética de los alcaloides presentes en el género *Erythrina*.

Cuadro 3. Alcaloides en semillas de especies americanas del género *Erythrina*, estudiadas en el laboratorio Roger Adams.

| Especie | dienófilos | alquenófilos | lactón. |
|---------|------------|--------------|---------|
| fusca   | + + + + +  |              |         |
| poeppi  | + + + + +  | +            | + +     |
| macrop  | + + + + +  | +            |         |
| guatem  | + + + + +  |              | + +     |
| berter  | + + + + +  |              | + +     |
| salvii  | + + + + +  | + + + + +    | + +     |

nota:

lactón. = lactónicos

poeppi. = *poeppigiana*

macrop. = *macrophylla*

guatem. = *guatemalensis*

berter. = *berteroana*

salvii. = *salviiflora*

Fuente: ABDULLAH and BARAKAT, 1979.



Cuadro 4. Ocurrencia de alcaloides en hojas de cuatro especies de *Erythrina* spp, estudiadas en Cardiff.

| Especie            | dienófilos | alquenófilos | lactón. |
|--------------------|------------|--------------|---------|
| <i>poeppigiana</i> |            | +            | +       |
| "libres"           | + +        | +            | + +     |
| "liberados"        | + +        | +            | + +     |
| <i>macrophylla</i> | +          |              |         |
| "libres"           | + +        |              |         |
|                    | +          |              |         |
| <i>berteroana</i>  |            |              | +       |
| "libres"           |            |              | + +     |
|                    |            |              | +       |
| <i>salviiflora</i> |            |              | + +     |
| "libres"           |            |              | + +     |
|                    |            |              | + +     |

Fuente: JACKSON, et al, 1982.

Cuadro 4. Ocurrencia de alcaloides en hojas de cuatro especies de *Erythrina* spp, estudiadas en Cardiff.

| Espece             | dienófilos | alquenófilos | lactón. |
|--------------------|------------|--------------|---------|
| <i>poëppigiana</i> |            | +            | +       |
| "libres"           | + +        | +            | + +     |
| "liberados"        |            | +            | + +     |
| <i>macrophylla</i> | +          |              |         |
| "libres"           | + +        |              |         |
|                    | +          |              |         |
| <i>berteroana</i>  |            |              | +       |
| "libres"           |            |              | + +     |
|                    |            |              | +       |
| <i>salviiflora</i> |            |              | + +     |
| "libres"           |            |              | + +     |
|                    |            |              | + +     |

Fuente: JACKSON, et al, 1982.

#### 2.2.4. Cuantificación

El contenido de alcaloides en el género *Erythrina* spp varía dependiendo de la parte de la planta entre (0.5-1.0)% en base seca, pero en algunas especies es mucho menor del 0.1%. Para la cuantificación es necesario extraer entre 5 a 10 g de semillas con metanol, lo cual permite la separación de los alcaloides "libres" o fracción de alcaloides glucosídicos. Luego, con la hidrólisis ácida en caliente, se obtiene los alcaloides "liberados". En trabajos mas recientes, las semillas son desengrasadas con hexano antes de proceder a extraer los alcaloides; sin embargo, algunos de éstos pueden ser extraídos con este disolvente.

Los extractos crudos (fracción en hexano, "libre" y "liberados") con N-O-bis(trimetil)sililacetamida son calentados para derivar los grupos hidroxilos libres, luego los alcaloides son separados, identificados y cuantificados por cromatografía de gases, empleando un detector de masas y una columna empacada con OV-17 (ABDULLAH and BARAKAT, 1979; JACKSON and CHAWLA, 1982; CHAWLA, et al, 1985; PAYNE, 1991).

En el Cuadro 5 se puede apreciar algunas propiedades físicas de los alcaloides presentes en el género *Erythrina*.

### 2.2.5. Consideraciones farmacológicas

Los extractos de semillas de plantas de especies del género *Erythrina*, han sido conocidos desde los años cuarenta por evidenciar una acción paralizante sobre los animales. Estos alcaloides actúan bloqueando la transmisión de impulsos nerviosos al músculo, impidiendo su movimiento y provocando paro respiratorio, seguido de la muerte del animal (CRAIG, 1955).

**Cuadro 5.** Algunas de las propiedades físicas más importantes de alcaloides presentes en el género *Erythrina*.

| Alcaloide             | Pf. (°C)  | $\alpha$ D | Máximo (s) (nm) * |
|-----------------------|-----------|------------|-------------------|
| $\beta$ -Eritroidina  | 99.5-100  | 88.8       | 238               |
| $\alpha$ -Eritroidina | 99.5-100  |            | 224               |
| Erisodina             | 204-205   | 248.0      | 285; 235          |
| Erisosovina           | 178-179.5 | 252.0      | 285; 239          |
| Erisopina             | 241-242   | 265.2      | 292; 240          |
| Eritralina            | 106-107   | 211.8      | 292; 238          |

nota:

Pf.= Punto de fusión.

\* = Longitud de onda.

Fuente: BOEKELHEIDE, 1990.

Por ejemplo, los extractos alcohólicos de *E. americana* presentan un efecto en el sistema nervioso periférico y son efectivos para reducir convulsiones en algunos animales. A

este respecto, los alcaloides mas importantes han sido la  $\beta$ -eritroidina y el dihidro- $\beta$ -eritroidina, los cuales se han estudiado intensamente.

Los alcaloides presentes en especies de este género son las únicas bases terciarias con una actividad farmacológica relativamente alta, siendo la dihidro- $\beta$ -Eritroidina, cinco veces mas efectiva que la  $\beta$ -Eritroidina como se puede observar en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Efecto farmacológico de algunos alcaloides presentes en hojas y semillas de especies del género *Erythrina*.

| Alcaloide                             | Ratón     |                | Rata     |                | Otros    |                |
|---------------------------------------|-----------|----------------|----------|----------------|----------|----------------|
|                                       | For       | Dos<br>(mg/Kg) | For      | Dos<br>(mg/kg) | For      | Dos<br>(mg/Kg) |
| <i><math>\beta</math>-Eritroidina</i> |           |                |          |                |          |                |
|                                       | HCl SC50  | 45             | HCl SC50 | 1260           | HCl IV50 | 8.6            |
|                                       | HCl SC100 | 50             | HCl OS50 | 510            |          | (conejo)       |
|                                       | HCl OS50  | 120            | HCl OS50 | 510            | HCl IV50 | 8.8            |
|                                       | HCl OS100 | 140            |          |                |          | (perro)        |
| Dihidro                               | HCl SC50  | 9.3            |          |                |          |                |
|                                       | HCl OS50  | 7.5            |          |                |          |                |
| Tetrahidro                            | HBr SC50  | 9.5            |          |                |          |                |
| Eritralina                            | HBr SC50  | 72.0           |          |                |          |                |
| Erisodina                             | HCl SC50  | 100.0          |          |                |          |                |
|                                       | HCl OS50  | 155.0          |          |                |          |                |

nota:

For = fórmula

Dos = dosis

SC = Subcutáneo

OS = Oral

IV = Intravenoso

Fuente: CRAIG, 1955.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Desarrollo metodológico

La metodología de extracción de alcaloides desarrollada por ROTTINGHAUS, *et al*, (1991) sirvió de base para iniciar el estudio planteado en este trabajo. Se midieron variables como el tiempo de calentamiento en baño maría a 50 °C, el número de extracciones con cloroformo alcalino, la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo de agitación de la muestra. Todas las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), con material del clón 2652 que pertenece a la especie *Erythrina berteroana*, la cual se recolectó a una edad de rebrote de nueve meses. La muestra fue secada al horno a 60 °C por 48 horas y molida a 1 mm, la elección de este clon se basó en el alto contenido del alcaloide  $\beta$ -Eritroidina reportado por PAYNE (1991).

##### 3.1.1. Extracción

Las pruebas consistieron en pesar 0.25 g de muestra y realizar extracciones con cloroformo con y sin hidróxido de sodio al 0.1%, homogenizando el tejido vegetal muestra a muestra (homogenizador eléctrico) por 5 y 10 minutos y calentando en baño maría por 30 minutos a 50 °C. Con los resultados de estas pruebas se procedió a la elaboración de una cinética de extracción de 0 a 5 horas, empleando la

misma cantidad de muestra, 15 ml de cloroformo y 0.75 ml de hidróxido de sodio al 0.1% (0.75ml). Para establecer la concentración óptima de NaOH en el proceso de hidrólisis-extracción, se probaron concentraciones de 0 hasta 1.0%.

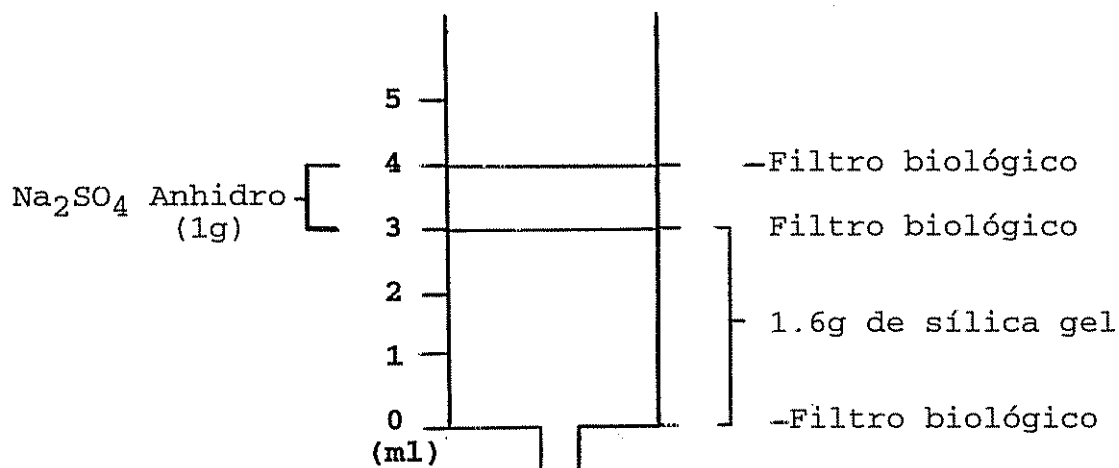
### 3.1.2. Purificación

En esta etapa se eliminaron todos los contaminantes del extracto anterior con el fin de poder cuantificar fácilmente los alcaloides. Se probó una columna desechable rellena de sílica gel, ésta fue preparada empleando cartuchos de jeringas a las cuales se les insertó un disco o filtro de papel de 0.5 pulgadas de diámetro en la parte inferior y superior de 1.6g de sílica gel que forman la columna. Se puede adicionar 0.5g de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), el cual puede mejorar la eficiencia de la misma. Es importante compactar la columna hasta un volumen de 3 ml (Figura 5.).

Esta columna retuvo cuantitativamente los alcaloides, se eliminaron los contaminantes empleando mezclas de disolventes orgánicos y finalmente los alcaloides fueron eluidos en forma pura. Para verificar la composición de cada uno de los lavados de la columna se empleó la ayuda de la técnica de cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

### 3.1.3. Análisis

Para el análisis se empleó la técnica de espectroscopía ultravioleta (UV), sin embargo, para comprobar la eficiencia de la columna, fue de gran ayuda el uso de la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para el análisis fue necesario correr un espectro ultravioleta (UV) desde 200 hasta 400 nm de longitud de onda de los alcaloides totales puros en diferentes disolventes con el propósito de elegir los máximos de absorbancia y determinar la longitud de onda a la cual se haría el análisis. Los resultados de esta determinación fueron reportados como absorbancia por gramo de muestra seca (A/g MS).



**Figura 5.** Esquema de la columna desechable de 5 ml empleada en la purificación de los alcaloides.



### 3.2. Evaluación de la precisión y diferencias del método según el tratamiento de muestra empleado

#### 3.2.1. Selección del material experimental

El material de *Erythrina* a utilizar para evaluar la precisión, proviene del archivo clonal del CATIE, establecido por el Proyecto Arboles Fijadores de Nitrógeno en 1987. El sitio se localiza a 602 m.s.n.m., y presenta una temperatura promedio anual de 21.5 °C y una precipitación media anual de 2634 mn, con una humedad relativa del 87%. Seis clones del género *Erythrina* fueron seleccionados según su contenido de  $\beta$ -Eritroidina (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Especies y clones de *Erythrina* a utilizar en los ensayos de desarrollo metodológico.

| # clon<br>(BLSF) | especie              | $\beta$ -Eritroidina<br>( g/g MS <sup>*</sup> ) | Procedencia         |
|------------------|----------------------|---|---------------------|
| 2652             | <i>berteroana</i>    | 3548  | Naranjo, Osa.       |
| 2689             | <i>berteroana</i>    | 1456  | S.María de Dota     |
| 2667             | <i>berteroana</i>    | 1039  | La Suiza, Turrialba |
| 2708             | <i>poepigiana</i>    | 969   | Naranjo, Alajuela   |
| 2674             | <i>berteroana</i>    | 266   | Sarapiquí, Heredia  |
| 2750             | <i>costaricensis</i> | 8   | Paso Canoas         |

nota:

\* = Materia seca.

BLSF = Banco Latinoamericano de Semillas Forestales, CATIE.

Fuente: PAYNE, 1991.

El estudio de precisión y el efecto de los tratamientos de secado sobre la cantidad de alcaloides cuantificados se realizó en tres etapas: preparación de la muestra, extracción, purificación y cuantificación de los alcaloides.

### **3.2.2. Preparación de la muestra**

En esta primer etapa las muestras colectadas (hojas) fueron picadas en trozos de aproximadamente una pulgada y trasladadas al laboratorio en hieleras para conservar su estado fresco natural y evitar posibles pérdidas de metabolitos volátiles. Posteriormente, cada muestra fue dividida en tres submuestras de aproximadamente 250 g, las cuales fueron sometidas a las diferentes formas de secado o tratamientos preliminares al proceso de extracción:

#### **3.2.2.a. Secado al horno**

Las submuestra fueron colocadas en bolsas de papel perforadas y secadas en una estufa de circulación de aire forzado a una temperatura de 60 °C hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 48 horas).

#### **3.2.2.b. Secado por liofilización**

Las submuestras fueron secadas por sublimación de la humedad a muy baja temperatura y vacío hasta peso constante (aproximadamente 48 horas).

En ambos casos, la submuestra seca fue molida a 1 mm en un molino Willey, previo al proceso de extracción.

### 3.2.2.c. Muestra fresca

Las submuestras (250g) fueron congeladas con nitrógeno líquido e inmediatamente molidas en un molino Willey. en presencia de N<sub>2</sub> líquido para que las muestras no se descongelaran. luego, la muestra se almacenó en bolsas plásticas selladas y fueron mantenidas en congelación a 20 °C, hasta la extracción.

### 3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se llevó acabo bajo un diseño completamente al azar aplicado independientemente a cada tratamiento y luego se evaluó la confiabilidad de los mismos mediante el cálculo del coeficiente de correlación intraclase (SNEDECOR y COCHRAN, 1981).

Para el análisis estadístico se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \alpha + \xi_i + \eta_{ij}$$

donde:

$Y_{ij}$  = Concentración de alcaloides totales para el  $i$ -ésimo clon y empleando el tratamiento de la muestra  $t$ .

$\alpha$  = media general.

$\delta_i$  = efecto debido al  $i$ -ésimo clon.

$\epsilon_{ij}$  = error.

El esquema de ANDEVA utilizado fue el siguiente:

| Fuente de variación         | G1        | CM     |
|-----------------------------|-----------|--------|
| Entre clones                | 5         | $se^2$ |
| dentro de clones<br>(error) | 42        | $sd^2$ |
| <b>Total</b>                | <b>47</b> |        |

El cálculo del coeficiente de correlación intra clase ( $r_i$ ) (SNEDECOR y COCHRAN, 1981) se realizó de la siguiente forma:

$$r_i = \frac{se^2 - sd^2}{se^2 + (n-1)sd^2}$$

donde:

$n$  = Número de repeticiones dentro de árboles.

$se^2$  = Varianza debida a clones.

$sd^2$  = Varianza debida a repeticiones.

Se estableció en ocho el número de repeticiones dentro de los árboles ( $n$ ) ya que a partir de este número no se observa ganancias apreciables en precisión, cualquiera que

este cálculo por tratamiento, se elige como el método más confiable al que presente el mayor valor para este coeficiente.

Para verificar si hubo diferencia entre los métodos de preparación de muestras, se utilizó un diseño de bloques al azar en donde los individuos fueron los bloques y los tratamientos, los diferentes métodos de secado.

Para el análisis estadístico se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \alpha + \epsilon_i + \beta_j + (\epsilon\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

$Y_{ijk}$  = Concentración de alcaloides totales para el i-ésimo clon y el j-ésimo tratamiento.

$\alpha$  = media general.

$\epsilon_i$  = efecto debido al i-ésimo clon.

$\beta_j$  = efecto debido al j-ésimo tratamiento.

$(\epsilon\beta)_{ij}$  = error experimental.

$\epsilon_{ijk}$  = error muestral.

El esquema de ANDEVA utilizado fue el siguiente:

| <b>Fuente de variación</b>     | <b>G1</b>  |
|--------------------------------|------------|
| Bloques (individuos)           | 5          |
| Tratamientos (secados)         | 2          |
| Bloques X tratamiento (E.Exp.) | 10         |
| Error muestral                 | 126        |
| <b>Total</b>                   | <b>143</b> |

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Extracción

Los resultados obtenidos en las pruebas de extracción (Cuadro 8) muestran que es necesario realizar una buena homogenización del tejido o un calentamiento en baño maría para mejorar la extracción de los alcaloides. Se puede observar en el Cuadro 8 que no hay una diferencia entre homogenizar el tejido o realizar un calentamiento suave por treinta minutos. Se decidió continuar las pruebas empleando el calentamiento ya que en este caso se puede trabajar con grupos de muestras y no con muestras individuales como sucede con el homogenizador de tejido.

En la Figura 6 se puede observar que para el clon 2652 (*berteroana*), la cantidad de alcaloides extraídos al emplear hidróxido de sodio es más del doble de la cantidad extraída al no utilizar la base, lo cual indica que la cantidad de alcaloides ligados es superior a la de los libres, esto también ha sido observado por otros investigadores (CHAWLA, et al, 1985; JACKSON and CHAWLA, 1982; PAYNE, 1991).

En las Figuras 6 y 7 se aprecia la cantidad de alcaloides extraídos al variar la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo de calentamiento. Con la concentración de 0.1% de NaOH se obtuvo la máxima extracción de alcaloides totales, concentraciones superiores a éste no resultarán en incrementos en el nivel de extracción.

**Cuadro 8.** Influencia de dos métodos de extracción e hidrólisis sobre muestras foliares de *Erythrina berteroana* en la cantidad de alcaloides extraídos.

| Tratamiento                 | (A/g MS) |      |
|-----------------------------|----------|------|
| Normal                      | 6.73     | 0.25 |
| Homogenizado (5 minutos)    | 7.60     | 0.15 |
| Homogenizado (10 minutos)   | 7.55     | 0.13 |
| Calentamiento (30' a 50 °C) | 7.52     | 0.20 |

En el tejido vegetal los alcaloides se encuentran en dos formas, libres y formando ésteres o glucósidos, por lo que es necesaria la liberación de estos compuestos para poder hacer una medición total de ellos. El hidróxido de sodio y el calentamiento se encargan de realizar el proceso de hidrólisis.

En cuanto al tiempo de calentamiento, en la Figura 7 se puede ver que hasta después de una hora, se logra estabilizar la cantidad de alcaloides extraídos, por lo que se recomienda al menos una hora de calentamiento para lograr el mayor porcentaje de extracción.

En lo referente al número de extracciones de la muestra las pruebas revelaron que con una extracción, se obtenía el 90% del rendimiento máximo (Figura 8).



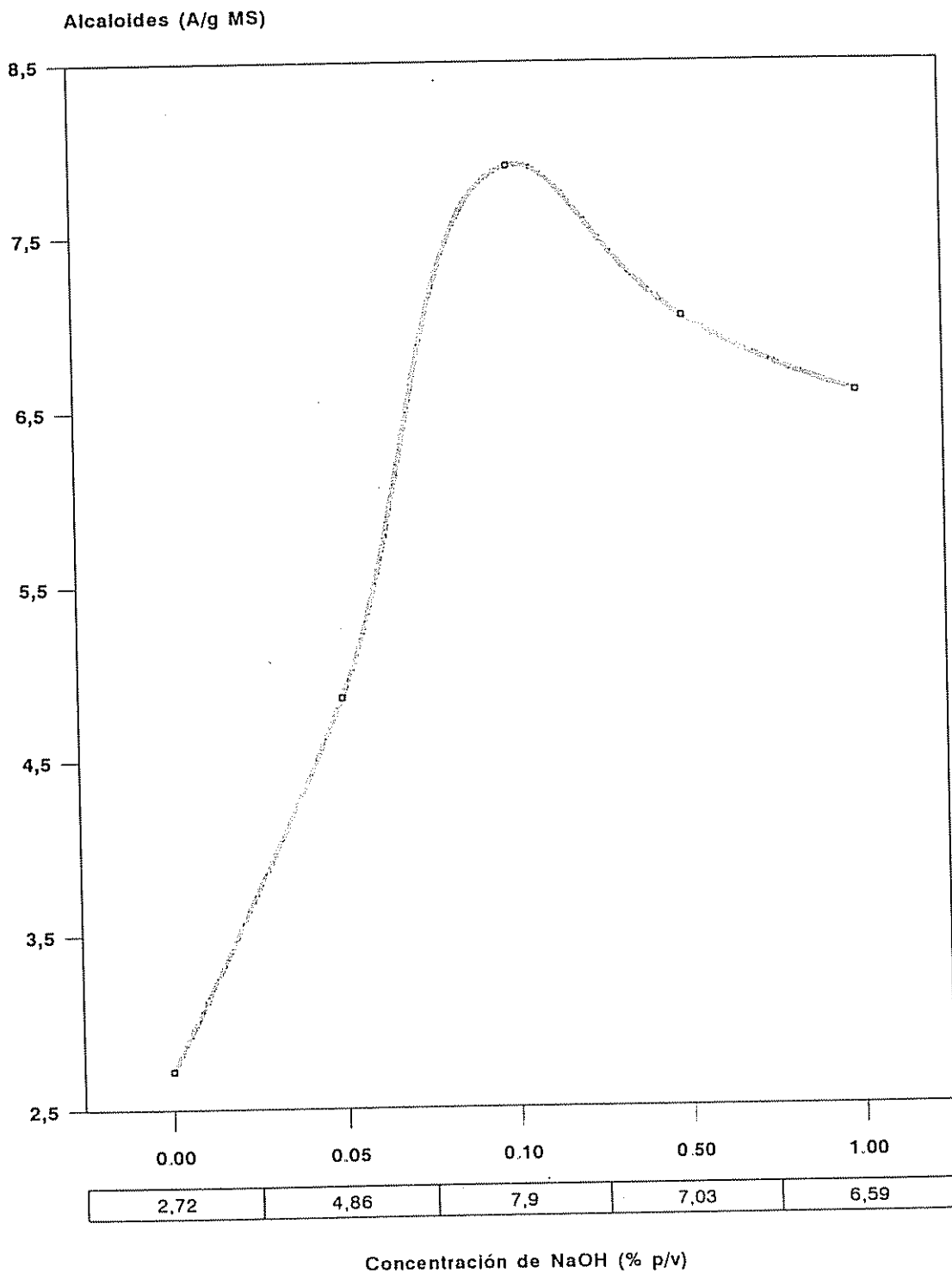


Figura 6. Efecto de la concentración de hidróxido de sodio sobre la cantidad de alcaloides extraídos.

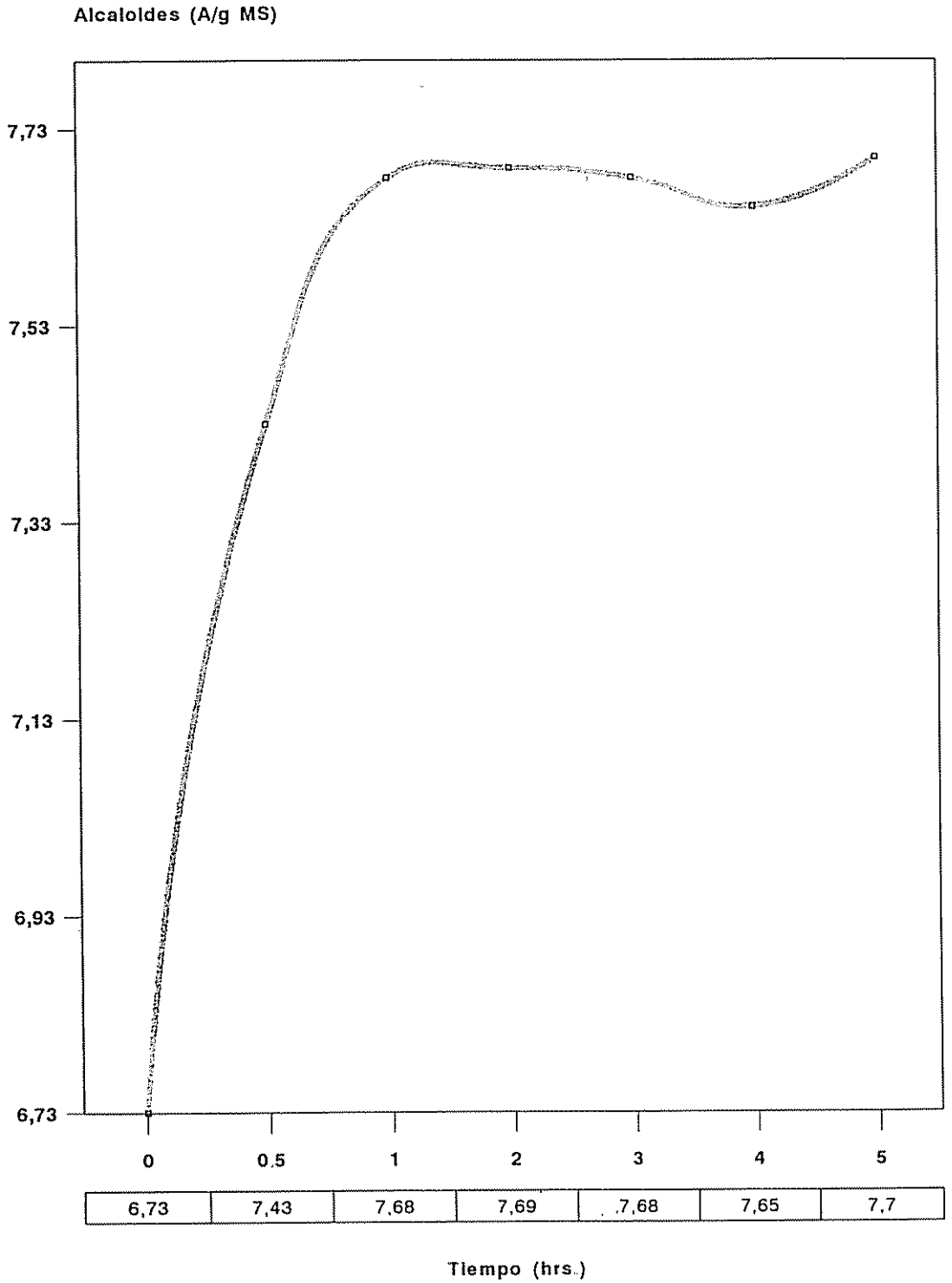


Figura 7. Efecto del tiempo de calentamiento de la muestra a baño maría sobre la cantidad de alcaloides totales extraídos.

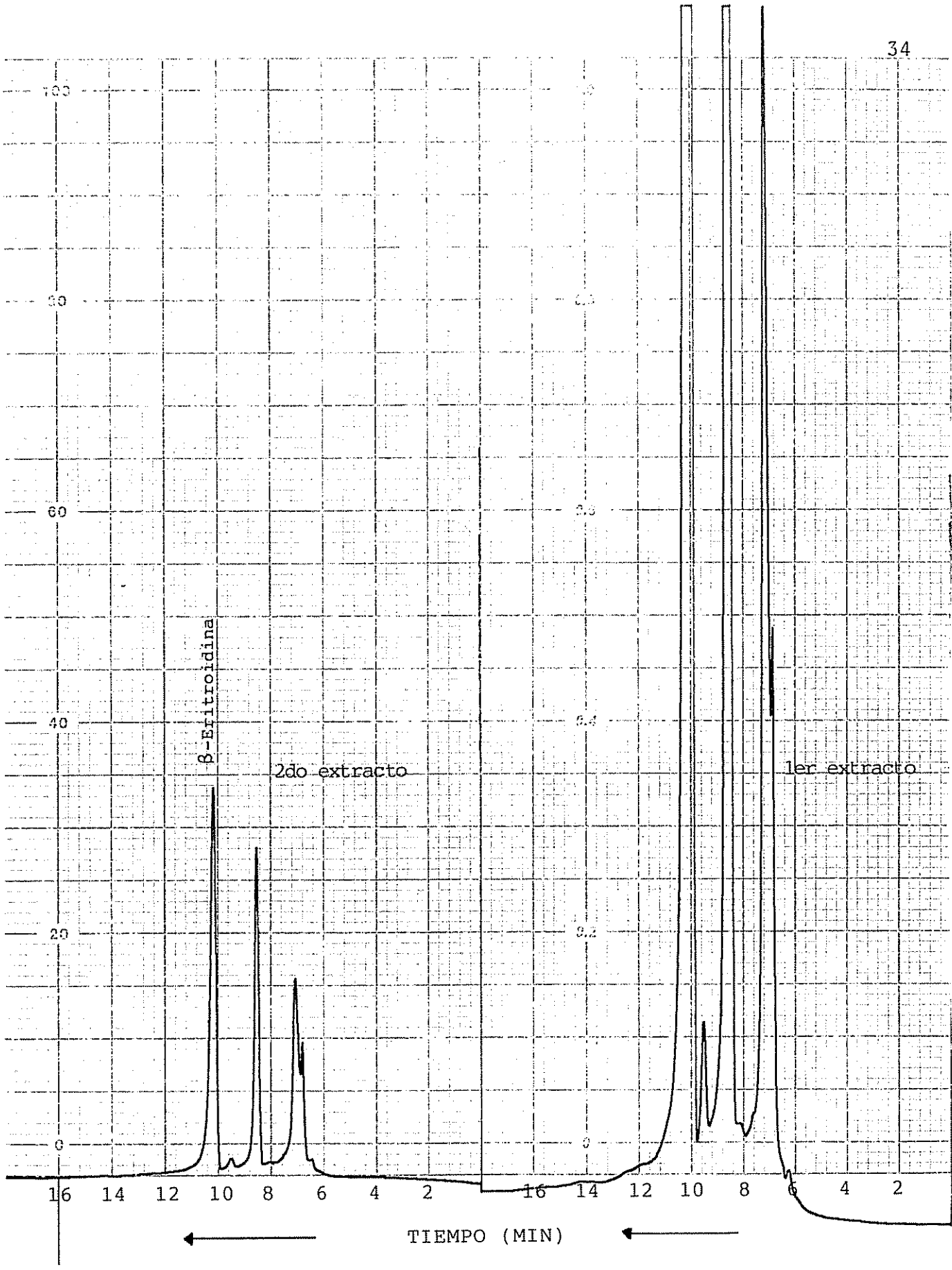


Figura 8. Cromatograma en HPLC de dos extracciones consecutivas de alcaloides

## 4.2 Purificación

Con el fin de eliminar la humedad que pudiese reducir la eficiencia de separación de la columna, después de la extracción-hidrólisis de los alcaloides, la mezcla fué filtrada en papel de separación de fase (este tipo de papel sólo permite el paso de disolventes orgánicos). Seguidamente, fué necesario adicionar un volumen equivalente de hexano (baja la polaridad de la mezcla) fué necesario adicionar ya que de lo contrario, al pasar el filtrado a través de la columna, parte de los alcaloides pasarían también con el disolvente. Una vez los alcaloides fueron atrapados en la columna, algunos pigmentos no polares fueron eliminados empleando 5 ml de éter etílico, y otros más polares con 5ml de una mezcla éter etílico:acetona (75:25). Finalmente, los alcaloides prácticamente puros fueron eluidos con 10 ml de una mezcla de acetona:metanol (95:5).

Para comprobar la pureza de cada una de los extractos, se corrieron cromatogramas en capa fina empleando placas de sílica gel y cloroformo:metanol (95:5) como medio de arrastre y cromatografía en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) empleando una columna de sílica gel, (Figura 9). El rendimiento de la columna desechable en cuanto al porcentaje de recuperación fue del 85% y se pudo ilustrar empleando como en el caso anterior la técnica de HPLC.

### 4.3 Análisis

La elección de la longitud de onda (245 nm) en la cuantificación de alcaloides por el método de espectroscopía ultravioleta (UV) y cromatografía HPLC, fueron determinadas corriendo un espectro UV de 200 a 300 nm de los alcaloides totales puros en diferentes disolventes. Los máximos de absorbancia en cloroformo y una mezcla de diclorometano:etanol (70:30) corresponden a 245 y 236 nm respectivamente, estas a su vez, son las empleadas en el método UV y el HPLC (Figura 10).

### 4.4 Metodología propuesta para la cuantificación de alcaloides totales presentes en hojas de poró (*Erythrina* spp)

Con base en los resultados obtenidos, se llegó a establecer una metodología de extracción (hidrólisis) y cuantificación de alcaloides totales en hojas de poró que a continuación se detalla:

#### 4.4.1 Equipo, cristalería y reactivos empleados

##### A. Extracción

##### Equipo

- Balanza analítica
- Baño maría
- Dispensadores de 15 y 0.75 ml
- Soporte para filtración

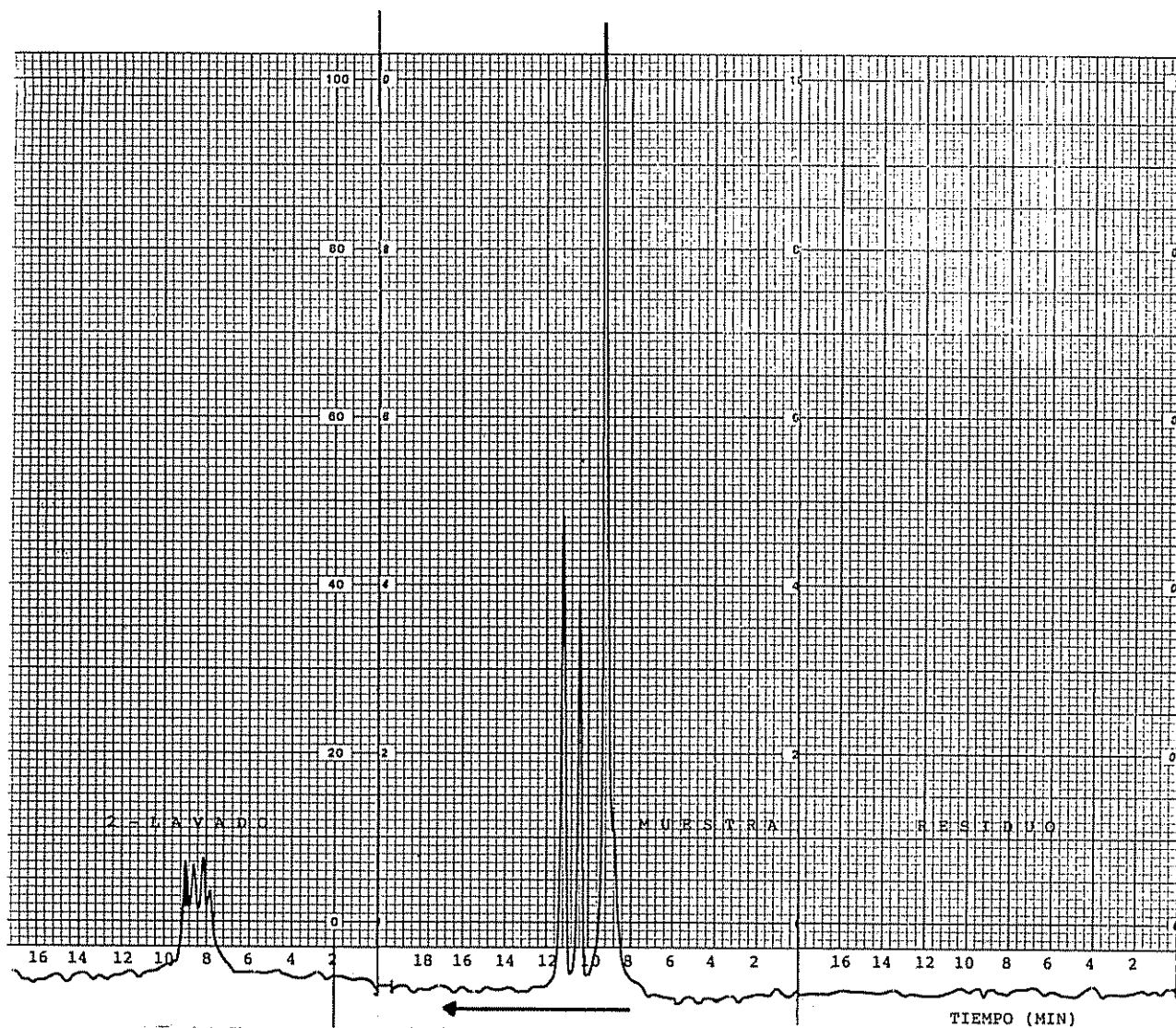


Figura 9. Cromatograma en HPLC de los diferentes lavados en el proceso de purificación del extracto de alcaloides totales en poró.

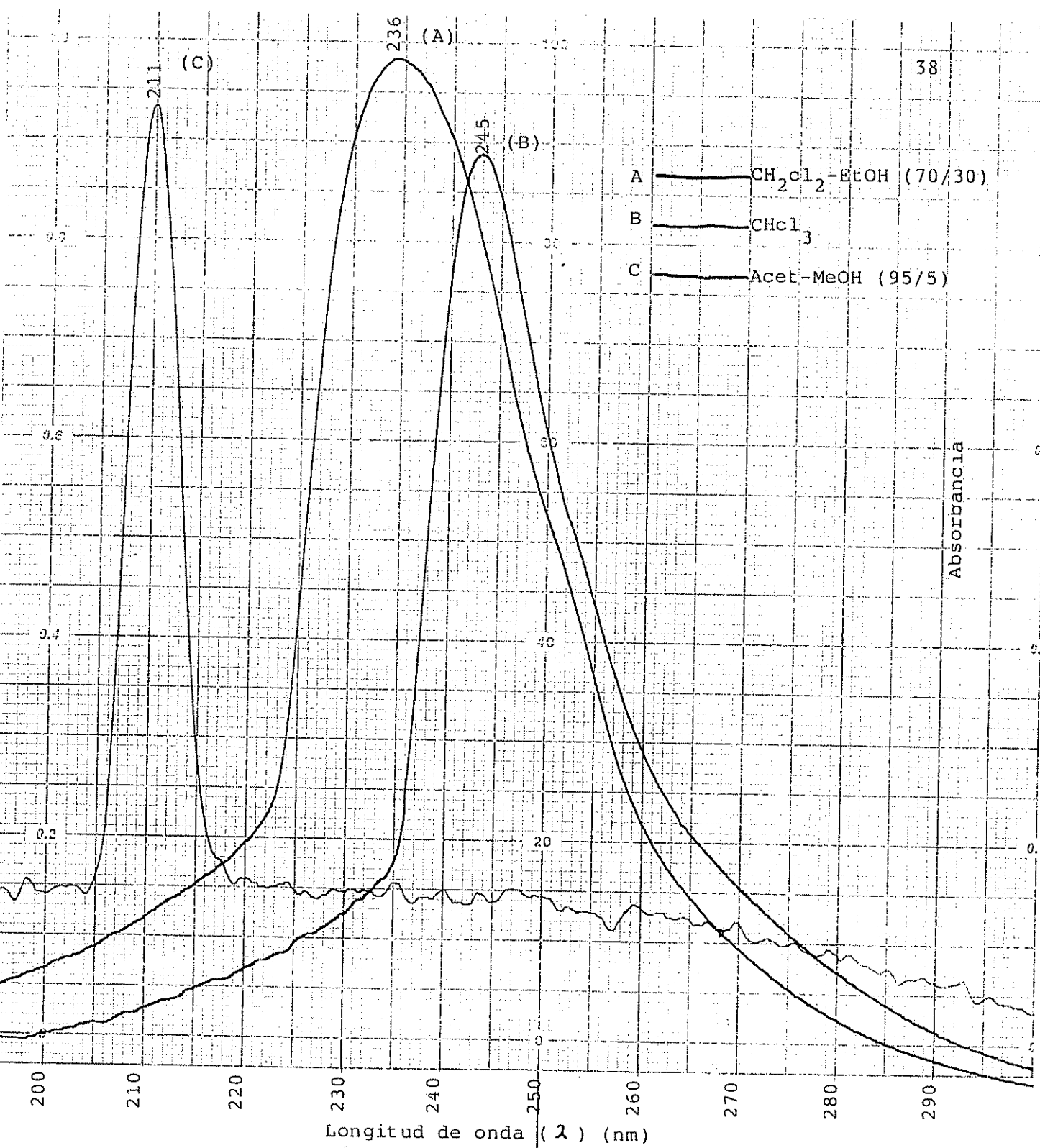


Figura 10. Espectro de absorción ultravioleta (UV) del extracto de alcaloides totales de poró en diferentes disolventes.

**Cristalería**

- Tubos de centrífuga de 50 ml con tapa
- Embudos de espiga corta
- Viales de 40 ml

**Reactivos**

- Cloroformo
- Hidróxido de sodio al 0.1% (p/v)

**Otros**

- Papel de separación de fases

**B. Purificación****Equipo**

- Sistema de filtración
- Bomba de vacío
- Baño maría o baño seco a 50° C
- Evaporador de aire

**Cristalería**

- Tubos de ensayo
- Cartuchos de jeringas desechables de 5 ml
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de 5 ml

**Reactivos**

- Hexano
- Eter etílico
- Eter etílico/acetona (75:25)
- Acetona/metanol (95:5)



**Otros**

- Filtros de 0.5 pulg.diám. (S&S)
- Gomas de hule
- Silica gel (Sigma, S-9258)

**C. Análisis****Equipo**

-Espectrofotómetro UV con graficador La longitud de onda empleada se determinó realizando un espectro UV de los alcaloides totales en diferentes disolventes de 200 a 300 nm.

-Cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) con programador de gradiente e integrador y un detector de longitud de onda variable UV/Vis.

-Columna de 250 x 4.6 mm I.D., rellena de sílica gel, con partículas de 5 mm de diámetro y su correspondiente precolumna.

**Cristalería**

-Pipeta de 10 ml

**Reactivos**

-Diclorometano grado HPLC

-Etanol grado HPLC

#### 4.4.2. Metodología de extracción y análisis de alcaloides totales en hojas de poró (*Erythrina* spp)

##### 4.4.2.1 Procedimiento de extracción

La muestra de 0.25 g de hoja seca (al horno o liofilizada), o 1.25 g de muestra fresca, molidas a 1mm, es colocada en tubos de centrifuga de 50 ml con tapa. Se le adiciona 15 ml de cloroformo y 0.75 de hidróxido de sodio al 0.1% y se calienta por 30 minutos en baño maría a 50 °C. Una vez transcurrido el tiempo, la mezcla es filtrada a través de papel de separación de fase.

El filtrado fue recogido en un vial de 40 ml y se adicionaron 15 ml de hexano. Luego de mezclados, son pasados a través de una columna de sílica gel.

##### 4.4.2.2. Procedimiento de purificación

La columna es colocada en un sistema de filtración al vacío en serie y con la ayuda de una pipeta Pasteur se pasa la mezcla de cloroformo-hexano a través de la columna. El filtrado se desecha ya que los alcaloides permanecen en la columna junto con algunos pigmentos. Después de pasar toda la muestra a través de la columna, se realizan tres lavados; el primero, efectuado con 5 ml de éter etílico, se descarta; el segundo lavado, con 5 ml de éter etílico-acetona (75:25) se descarta también, y finalmente la columna es lavada con 10 ml de acetona-metanol (95:5). En este último lavado, los

alcaloides son eluidos fuera de la columna para luego ser evaporados hasta sequedad en baño maría a 50 °C.

#### **4.4.2.3 Procedimiento de análisis**

##### **4.4.2.3.1 Análisis por espectroscopía ultravioleta (UV)**

La muestra evaporada en el paso anterior fué luego disuelta en cloroformo (10 ml) y se hizo la lectura a 254 nm. los resultados del análisis fueron reportados en unidades de absorbancia por gramo de muestra seca (A/g MS).

##### **4.4.2.3.2 Análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

Para los análisis de cromatografía líquida de alta presión la muestra purificada y seca fue disuelta en 2 ml de una mezcla de diclorometano-etanol. De estos se tomaron 30  $\mu$ l para ser inyectados al cromatógrafo con una jeringa de 100  $\mu$ l, a través de un "loop" de 20  $\mu$ l. La separación se lleva a cabo por medio de una elución a un flujo constante de 1.5 ml/minuto de una mezcla de disolventes compuesta por diclorometano-etanol (70:30). La longitud de onda utilizada por el detector para la identificación y análisis de estos compuestos fué de 236 nm. Para el análisis empleando esta técnica, es necesario usar patrones de cada uno de los alcaloides que se desea cuantificar.

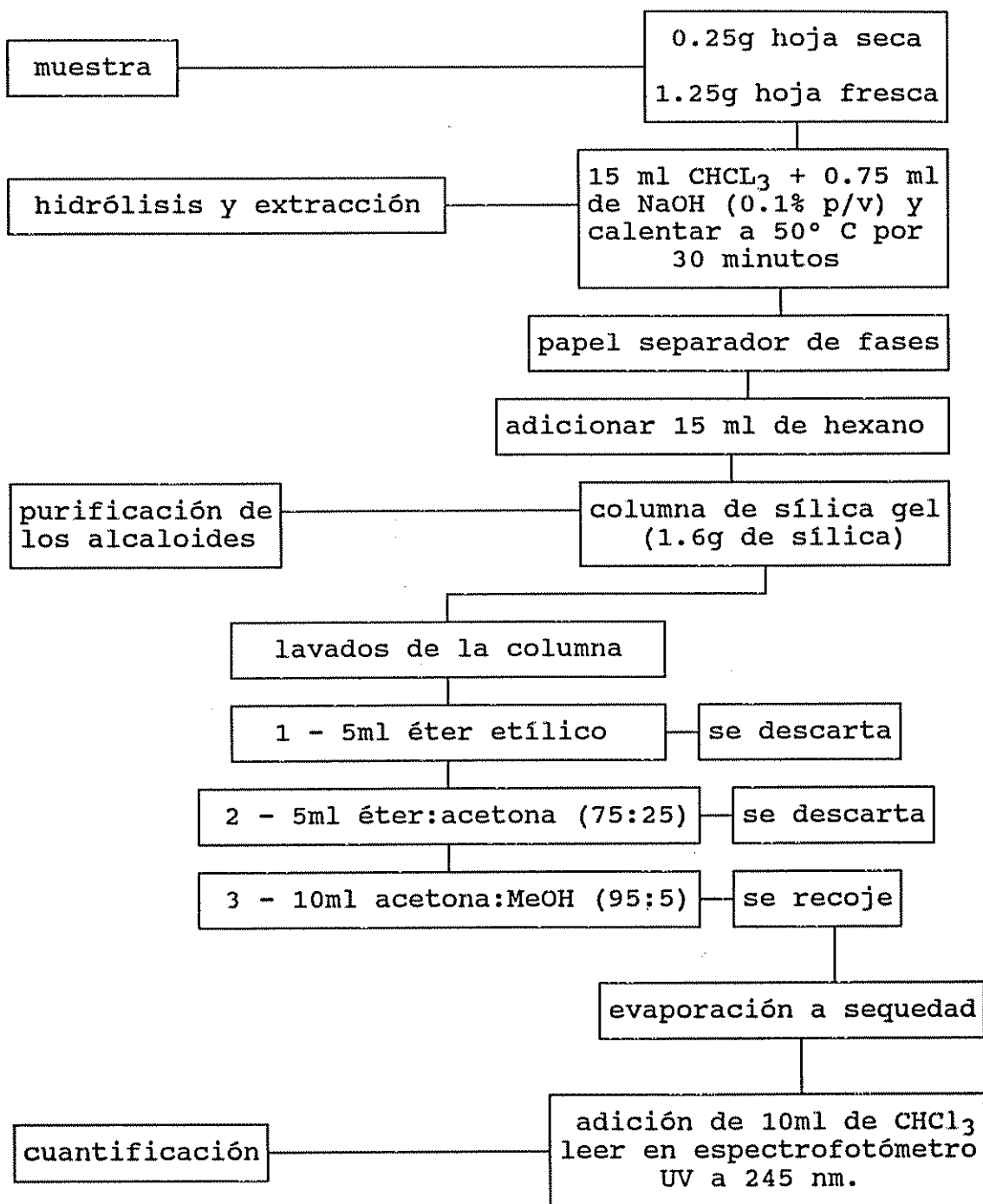


Figura 11. Diagrama de flujo para el procedimiento propuesto para el análisis de alcaloides totales en poró (*Erythrina* spp).

#### 4.5 Efecto del tratamiento de las muestras previo a las determinaciones del laboratorio

En el Cuadro 9 y Figura 12 se puede apreciar la variación en el contenido de alcaloides totales entre los clones seleccionados para la evaluación del método desarrollado en el presente estudio, así como el efecto del tratamiento de la muestra luego de su recolección en el campo. Se puede notar que los valores más altos corresponden al clon 2652 el cual fue identificado como *E. berteriana* y el valor más bajo corresponde al clon 2650, el cual se identificó como *E. costaricensis*. Por otro lado, se observó que los clones de más alto contenido de alcaloides totales se presentan consistentemente para las muestras liofilizadas. (Cuadro 10)

Para el contenido de alcaloides totales, se detectaron diferencias altamente significativas en el efecto de los individuos ( $p < 0.0001$ ), de los tratamientos ( $p < 0.002$ ) y para la interacción individuo x tratamiento ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 11).

Dependiendo del proceso de secado de la muestra, se notaron grandes diferencias cuantitativas más que cualitativas en cuanto a la presencia de estos metabolitos secundarios como se puede apreciar en la Figura 13. En el caso de secado al horno en donde los resultados son bajos, se atribuyen a pérdidas por volatilización, reacciones enzimáticas catalizadas por la temperatura del horno,

procesos de oxidación de los alcaloides fenólicos a quinonas y finalmente a polimerización irreversible con otros componentes de la planta.

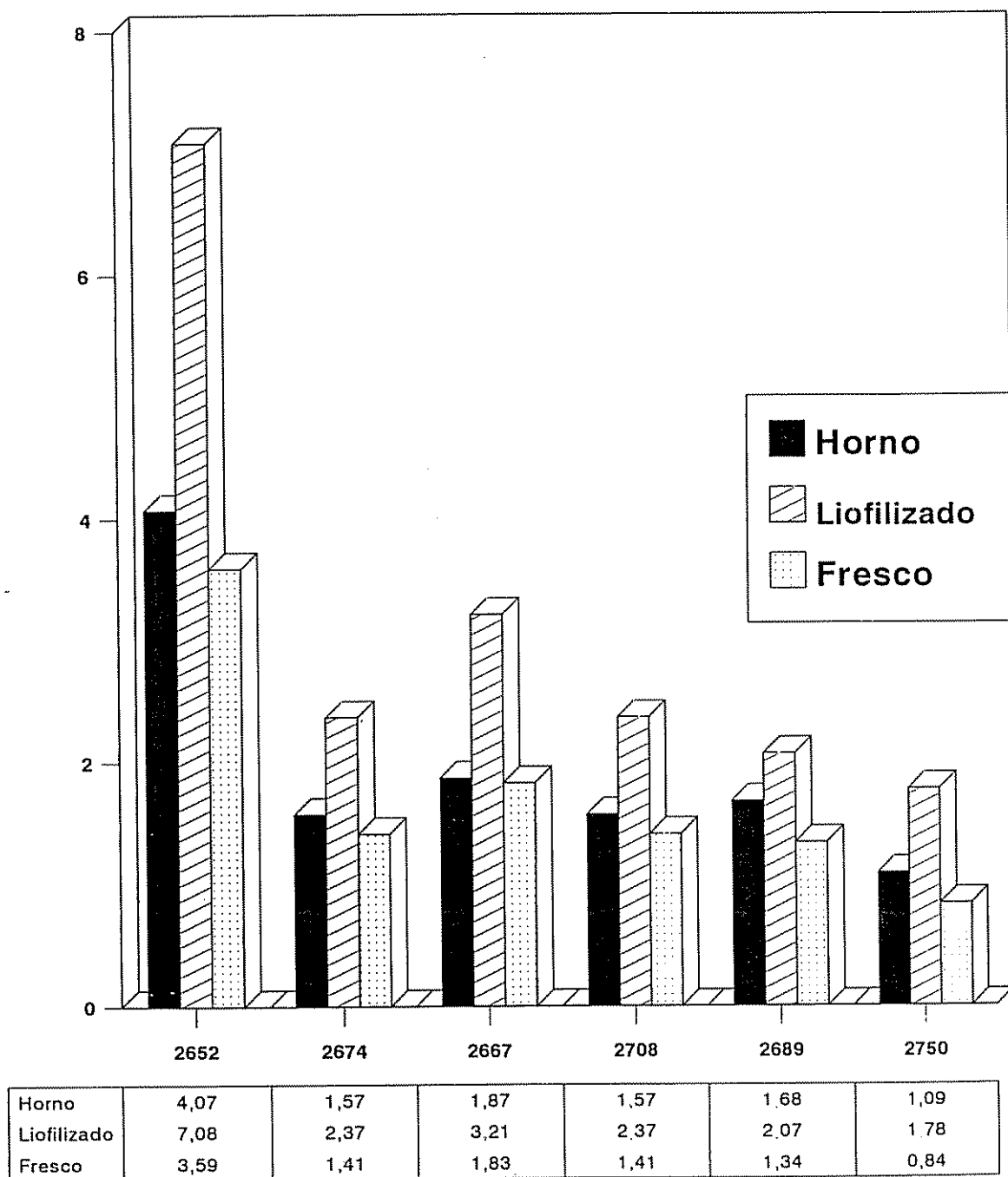
**Cuadro 9.** Concentración (A/g MS) de alcaloides totales presentes en las hojas de seis individuos del género *Erythrina*.

| Individuo | Especie        | Tratamiento | Alcaloides* |
|-----------|----------------|-------------|-------------|
| 2652      | berteroana     | Horno       | 4.071       |
|           |                | Liofilizado | 7.078       |
|           |                | Fresco      | 3.593       |
| 2674      | berteroana     | Horno       | 1.551       |
|           |                | Liofilizado | 3.499       |
|           |                | Fresco      | 1.780       |
| 2667      | berteroana     | Horno       | 1.865       |
|           |                | Liofilizado | 3.214       |
|           |                | Fresco      | 1.833       |
| 2708      | poepigiana     | Horno       | 1.571       |
|           |                | Liofilizado | 2.366       |
|           |                | Fresco      | 1.414       |
| 2689      | berteroana     | Horno       | 1.680       |
|           |                | Liofilizado | 2.067       |
|           |                | Fresco      | 1.336       |
| 2750      | costarricensis | Horno       | 1.089       |
|           |                | Liofilizado | 1.784       |
|           |                | Fresco      | 0.843       |

nota:

\* = promedio de ocho repeticiones

## Alcaloides (A/g MS)



## Clones y tratamientos

Figura 12. Concentración de alcaloides totales en seis clones del género *Erythrina* spp. a diferentes tratamientos de secado de la muestra.

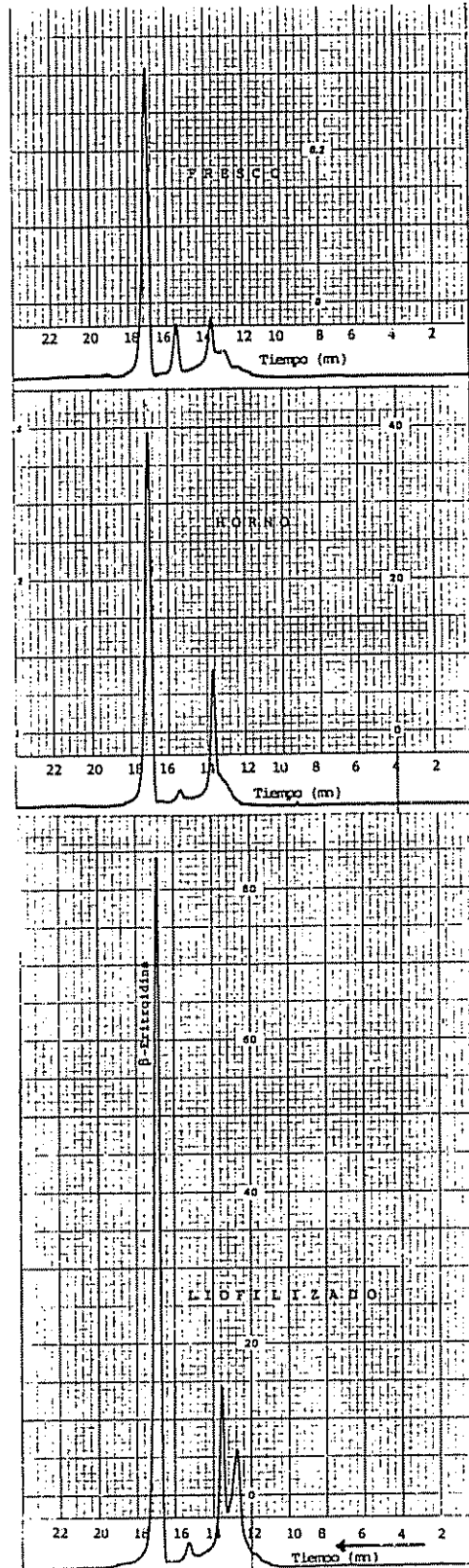


Figura 13. Cromatograma en HPLC del extracto de alcaloides totales presentes



En el caso de la muestra fresca, los bajos resultados se pueden atribuir al método de extracción, ya que éste se realiza con un disolvente orgánico insoluble en agua, y la muestra fresca contiene alrededor del 80 % de humedad, por lo que es posible que no haya un buen contacto entre el disolvente y el soluto (alcaloides totales) que se desea extraer.

**Cuadro 10.** Prueba de rango múltiple de Duncan para la variable contenido de alcaloides totales en poró (*Erythrina* spp).

| Tratamiento | Promedio | Agrupamiento Duncan |
|-------------|----------|---------------------|
| Liofilizado | 3.34     | A                   |
| Horno       | 1.97     | B                   |
| Fresco      | 1.80     | B                   |

**Cuadro 11.** Análisis de varianza de los seis clones de poró (*Erythrina* spp) utilizados en la cuantificación de alcaloides totales.

| F.de V.        | Gl         | CM    | F                 | Pr> F  |
|----------------|------------|-------|-------------------|--------|
| Individuo      | 5          | 41.11 | 887               | 0.0001 |
| Tratamiento    | 2          | 33.95 | 12                | 0.0020 |
| Indiv x Trat   | 10         | 2.74  | 59                | 0.0001 |
| Error muestral | 126        | 0.05  |                   |        |
| <b>Total</b>   | <b>143</b> |       | <b>C.V. = 9.1</b> |        |

En el Cuadro 12 se muestran los coeficientes de correlación intraclase ( $r_i$ ) según el tratamiento de secado aplicado. Estos valores dan una idea de cuán repetibles son los resultados obtenidos empleando el método propuesto, el máximo valor esperado es de 1.0, el cual representa la máxima precisión posible para el análisis.

El tratamiento de secado al horno corresponde al valor más alto, seguido del liofilizado y por último el tratamiento en fresco. Lo mismo sucede con el coeficiente de variación (C.V.). Entre los dos primeros métodos no hay diferencia en cuanto a precisión, pero sí para el último tratamiento y esto es atribuible a que la muestra fresca es difícil de manejar por la alta variación en el contenido de humedad de una repetición a otra y a la imposibilidad de analizar todas las muestras al mismo tiempo. Hay que recordar que estas muestras permanecieron congeladas hasta el día del análisis, y que la muestra a analizar (1.25 g) fue tomada y pesada a temperatura ambiente y que las condiciones ambientales de un día a otro nunca fueron las mismas. En el caso del método de liofilización, a pesar de ser muy parecido en precisión al secado en el horno, las diferencias en el coeficiente de correlación y de variación se atribuyen a valores muy altos de absorbancia ya que la ley que relaciona la absorbancia con la concentración (Ley de Beer Lamber) es más precisa cuando se hacen lecturas

entre el intervalo de 0.2 y 0.6 unidades de absorbancia para una celda de 1 cm<sup>2</sup>.

**Cuadro 12.** Coeficiente de correlación intraclase (ri) para las determinaciones de alcaloides totales en muestras de poró (*Erythrina* spp) sometidas a diversos tratamientos de secado previos a su análisis.

| Tratamiento | Coef. Corr. (ri) | C.V. |
|-------------|------------------|------|
| Horno       | 0.99             | 4.0  |
| Liofilizado | 0.98             | 7.6  |
| Fresco      | 0.93             | 14.6 |

Se sugiere que el tratamiento de secado al horno a sesenta grados centígrados por 48 horas es el más apropiado no sólo porque muestra una repetibilidad alta, sino porque requiere de equipo de secado generalmente disponible en todos los laboratorios. Por el contrario, si bien el método de liofilización presenta una repetibilidad similar al anterior, requiere de un equipo poco común y oneroso.

En el Cuadro 13 se presentan los valores de correlación entre el método de cuantificación establecido en esta investigación, el método ácido-base (A-B) y el método de PAYNE (1991). En las Figuras 14 y 15 se muestran los esquemas de los métodos, por ejemplo; en el procedimiento seguido por PAYNE (1991) se emplean cantidades grandes de muestras, períodos largos de extracción e hidrólisis y finalmente un método complicado y costoso de cuantificación por cromatografía de gas y detector de masas, difícilmente

accesible para la mayoría de los laboratorios de análisis rutinarios.

**Cuadro 13.** Prueba de correlación de los diferentes métodos evaluados en la cuatificación de alcaloides totales en poró (*Erythrina spp*).

|         | A-B (1)           | Payne             | Liofil.           | Fresco            |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Horno   |                   | 0.95886<br>0.0025 | 0.96089<br>0.0023 | 0.97546<br>0.0009 |
| Fresco  |                   | 0.89222<br>0.0168 | 0.99002<br>0.0001 |                   |
| Liofil. | 0.96733<br>0.0016 | 0.84676<br>0.0334 |                   |                   |
| Payne   | 0.91567<br>0.0104 |                   |                   |                   |

El esquema de la Figura 14 presenta el método ácido-base, muy común en el aislamiento y purificación de alcaloides presentes en el tejido vegetal. Supone una serie de extracciones orgánicas e inorgánicas basadas en las propiedades ácido-base de los alcaloides, lo cual lo convierte en un procedimiento lento, tedioso y de poca repetibilidad. Este método extrae solo alcaloides, por lo que puede servir como marco de referencia para comparar otras técnicas.

La correlación entre el método A-B (liofilizado), el método de Payne y el propuesto en esta investigación, fué alta y significativa. Es importante resaltar la buena correlación entre el método propuesto y el de Payne (1991) en lo que se refiere al tratamiento al horno, ya que fueron

pocos los individuos evaluados y además que las muestras, a pesar de corresponder a los mismos clones, fueron recolectadas en diferentes sitios, época y reportados en diferente forma.

Finalmente, el método establecido, no requiere patrones de cada uno de los alcaloides, cosa que es importante resaltar si se toma en cuenta que estos compuestos no se encuentran accesibles en el mercado. El equipo empleado para la extracción, purificación y principalmente para la cuantificación es común en la mayoría de laboratorios de análisis proximal del área, necesitándose como equipo adicional únicamente un pequeño espectrofotómetro UV-VIS para la determinación de los alcaloides totales.

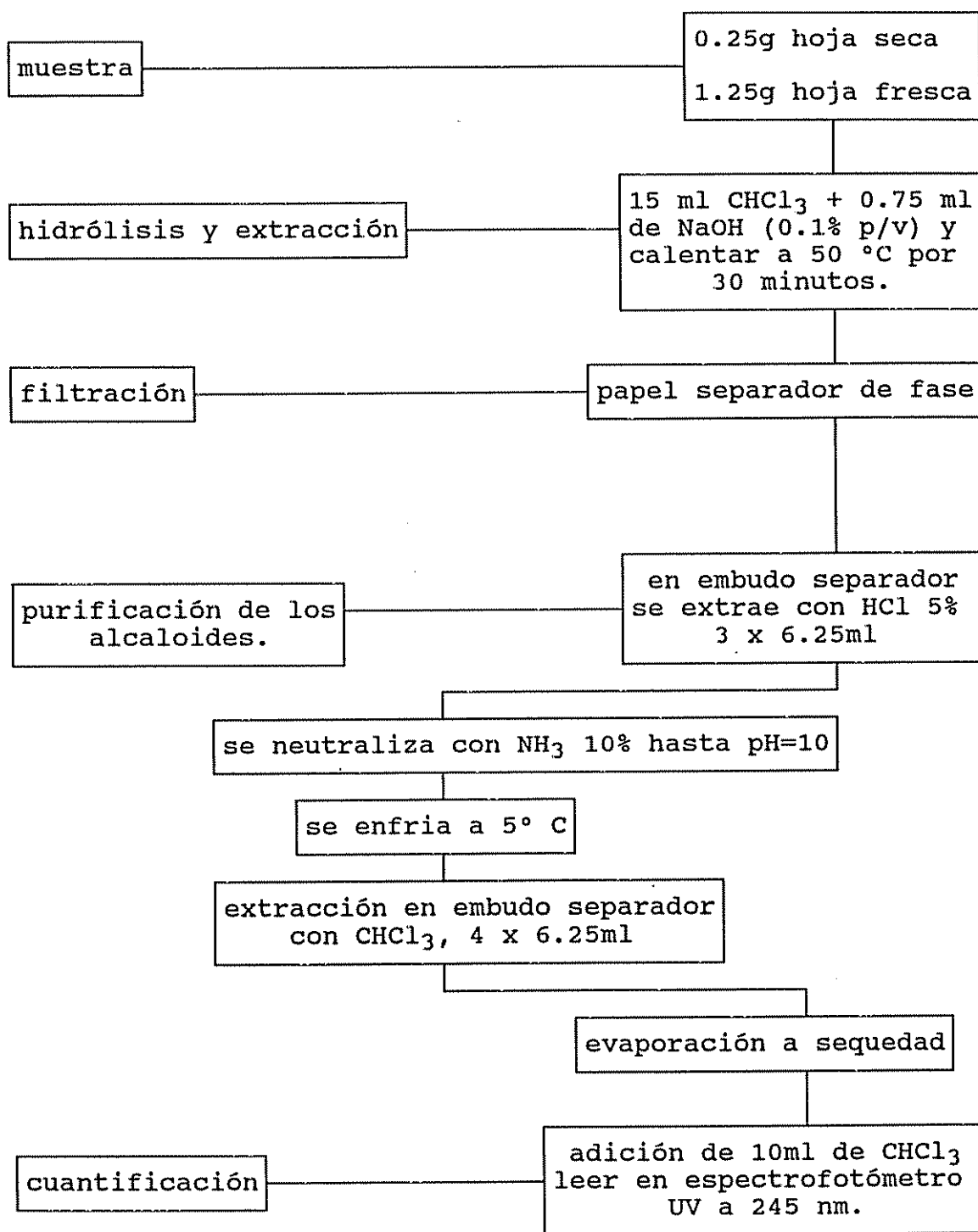


Figura 14. Diagrama de flujo para el procedimiento ácido-base (A-B) para el análisis de alcaloides totales en poró (*Erythrina* spp).

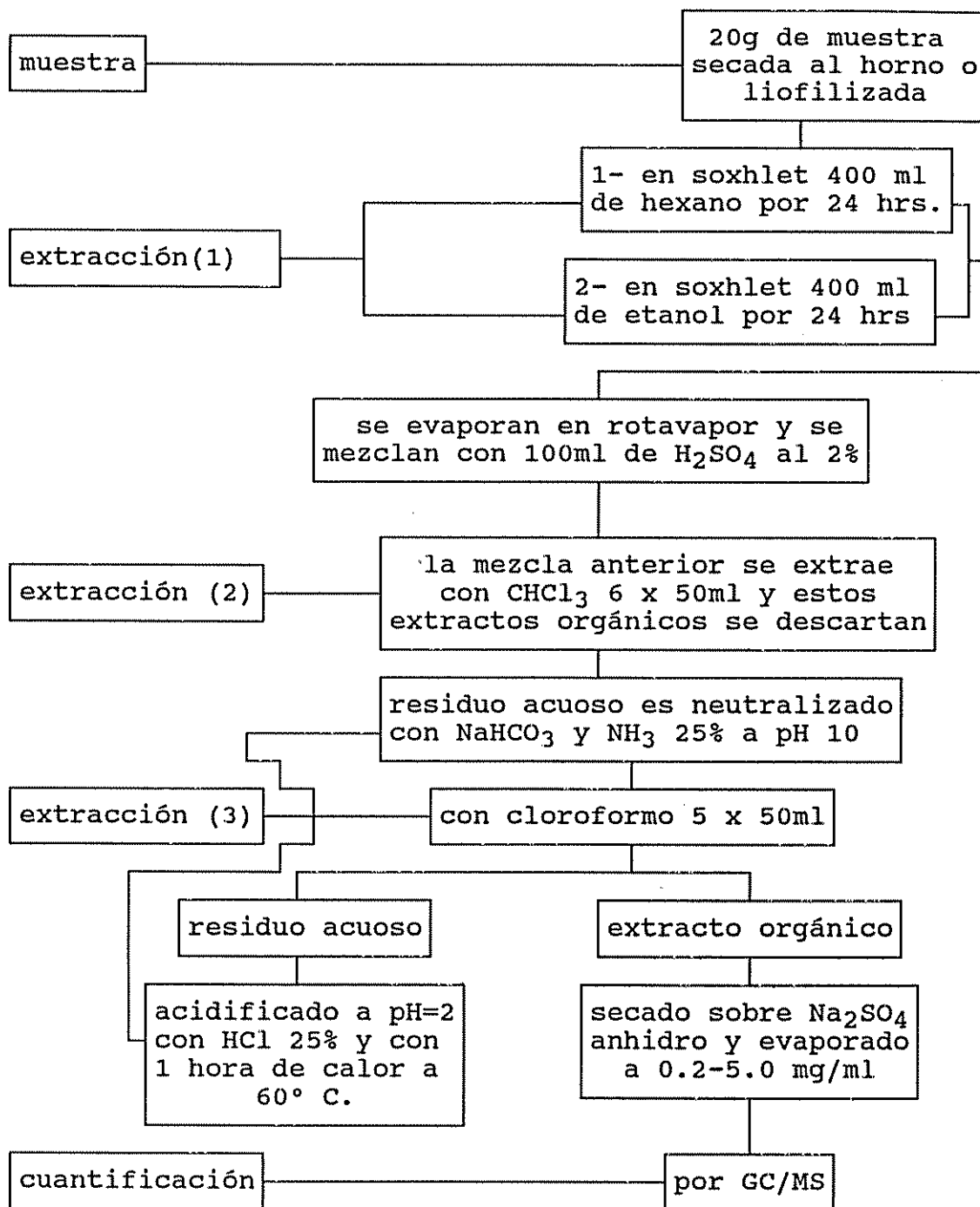


Figura 15. Diagrama de flujo para el procedimiento propuesto por Payne (1991), para el análisis de alcaloides en poró (*Erythrina* spp).

## 5. CONCLUSIONES

El tiempo de hidrólisis-extracción, el método de secado empleado y el uso de hidróxido de sodio, influyen en la cantidad de alcaloides totales extraídos en hojas de *Erythrina* spp.

El método de secado al horno es el más adecuado en cuanto a precisión, costos de equipo y secado, aunque el método liofilizado es el que extrae la mayor cantidad de alcaloides.

La técnica de espectroscopía ultravioleta (UV) puede ser utilizada para el análisis de alcaloides totales en hojas de poró (*Erythrina* spp), reportando los resultados como absorbancia por gramo de muestra seca (A/g MS).

El método propuesto en esta investigación tiene ventajas con respecto a los métodos reportados en la literatura, como: bajos costos del equipo empleado, corta duración del análisis y no requiere de alcaloides puros como patrones.



## 6. RECOMENDACIONES

A pesar de la alta correlación entre los métodos convencionales y el propuesto en esta investigación, sería conveniente analizar un número mayor de individuos y especies del género *Erythrina* para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos en este trabajo.

Para determinar con exactitud la escogencia del tratamiento de la muestra, es necesario evaluar los tratamientos de secado al horno y fresco por el método ácido-base (A-B) y correlacionarlos con los resultados obtenidos en esta investigación.

Esta técnica puede ser utilizada para la selección de genotipos de *Erythrina spp* con bajos contenidos de alcaloides, lo que disminuye los riesgos potenciales de acción tóxica en animales que los consumen.

Evaluar el efecto ambiental en la concentración de alcaloides en especies de *Erythrina*.

Analizar el contenido de alcaloides en orina, heces y leche con el propósito de verificar si hay acumulación o no de estos metabolitos secundarios en el animal.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ABDULLAH, M.I. BARAKAT, I.E. 1979. Studies of *Erythrina* alkaloids, Part III. G.C./M.S. Investigation of alkaloids in the seeds of a further fourteen species. *Annals Missouri Botanical Gardens*, (U.S.A.), 66:533-560.
- ALAGON, G. 1990. Comparación del poró (*Erythrina poeppigiana*) con otras fuentes nitrogenadas de diferente potencial de escape a la fermentación ruminal como suplemento de vacas lecheras alimentadas con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis M Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 145 p.
- BARCELO, J.R. 1976. Diccionario Terminológico de Química, Editorial Alhambra, Madrid, España.
- BARTON, D.H.R.; POTTER, C.H.; WIDDOWSON, D.A.. 1974. *Journal Chemical Society, Perkin Trans I*, 1974:346-348.
- BOEKELHEIDE, V. 1990. The *Erythrina* alkaloids. In *The Alkaloids, Chemistry and Physiology*, V. VII, Academic Press, U.S.A., pp 201-227.
- CAMERO, L. 1991. Evaluación del poró (*Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook) y madero negro (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.) como suplementos protéicos para vacas lecheras alimentadas con heno de jaragua (*Hyparrhenia rufa*). Tesis M Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 91 p.
- CHAWLA, A.S.; REDHA, F.M.; JACKSON, A.H. 1985. Alkaloids in seeds of four *Erythrina* species. *Phytochemistry*, 24:1821-1890.
- CRAIG, E.L. 1955. Curare-Like Effects. In *the Alkaloids, Chemistry and Physiology*, Academic Press, USA., p. 265-290.
- DAYNE, E.; STEGLICH, L. 1883. *Tetrahedron Letter*. 24 (4):5067-5070.
- DOMINGUEZ, X.A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica, Centro Relacional de Ayuda Técnica, Mexico, Editorial Limusa, S.A. 45 p.

- ESNAOLA, M.A.; BENAVIDES, J.E. 1983. El enfoque de la investigación en cabras del CATIE. Trabajo presentado en el Curso Intensivo sobre Producción Caprina en el Trópico, realizado en Turrialba, febrero de 1983. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 46 p.
- ESPINOZA, J.F. 1984. Caracterización nutritiva de la fracción nitrogenada del forraje de madero negro (*Gliricidia sepium*) y poró (*Erythrina poeppigiana*). Tesis Mag. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. UCR-CATIE. 90 p.
- FALCONER, D.S. 1964. Introduction to quantitative genetics. London, Oliver and Boyd. pp. 142-149.
- FOLKERS, K.; SHAREL, J. 1941. *Erythrina* alkaloids. Isolation and characterization of erysodina and other liberated alkaloid. *Journal of the American Chemical Society*, 63:1544-1553.
- GUTIERREZ, R.; BENAVIDES, J.E. 1986. Utilización del follaje del poró gigante (*Erythrina poeppigiana*) (Walpers O.F. Cook) en la alimentación de rumiantes menores. *Producción Animal Tropical*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 18 p.
- HARGREAVES, R.T.; JONHSON, R.D. 1974. "Alkaloids of american species of *Erythrina*". *Lloydia*, 37:569-573.
- JACKSON, A.H. 1985. *Erythrina* alkaloids. In *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloid*. Edited by Springer-Verlang, Alemania. 5 p.
- \_\_\_\_\_,.; CHAWLA, A.S. 1982. Studies of *Erythrina* alkaloids, part IV. G.C./M.S. investigations of alkaloids in the leaves of *E. poeppigiana*, *E. macrophylla*, *E. berteriana* and *E. salviiflora*. *Allertonia*, 3: 39-45.
- \_\_\_\_\_, A.H.; PLUDGARTE, K.; MAVRAGANIS, V. 1982. Studies of *Erythrina* alkaloids, part V. G.C./M.S. investigations of alkaloids in the seeds of *E. subumbrans*, *E. lanata*, *E. rubrinervia*, *E. acanthocarpa*, *E. variegata* and *E. melanacantha*. *Allertonia*, 3: 47-51.
- MARION, L. 1959. The *Erythrina* alkaloids. In *The Alkaloids, chemistry and biology*. V II. Academic press Inc, Publishers. N.J. USA. p. 595-510.

- NEILL, D., 1987. Trapliners in the trees: Hummingbird pollination of *Erythrina* sect. *Erythrina*. Annals Missouri Botanical Garden. 74: 27-41.
- PAYNE, L. 1991. The alkaloids of *Erythrina*: Clonal Evaluation and Metabolic Fate, Ph.D. Thesis, University of California at Davis, U.S.A..
- PEREZ, E.E. 1990. Evaluación del Ensayo clonal de *Erythrina* spp en San Juan Sur. Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 104 p.
- PINEDA, O. 1986. Utilización del follaje de poró (*Erythrina poeppigiana*) en la alimentación de terneros de lechería. Tesis Mag. Sc., Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. UCR-CATIE. 61p.
- RODRIGUEZ, R.A. 1985. Producción de biomasa de poró gigante (*Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook) y King-Grass (*Pennisetum purpureum* x *P. typhoides*) intercalados, en función de la densidad de siembra y la frecuencia de poda del poró. Tesis Mag. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. UCR-CATIE. 96p.
- ROTTINGHAUS, G.E.; GARNER, G.B.; CONELL, C.N.; ELLIS, T.L. 1991. HPLC Method for quantitating ergovaline in Endophyte-Infested tallfescue: Seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. J. of Agric. and Food Chemistry, 39: 112-115.
- RUSSO, R. 1984. *Erythrina*: un género versátil en sistemas agroforestales del trópico Húmedo. Programa de Recursos Naturales Renovables CATIE, Turrialba, Costa Rica. 14p.
- \_\_\_\_\_. 1982. Resultados preliminares de biomasa de la poda de *Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook (Poró) en Turrialba, Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 10p.
- SNEDECOR, G.W. ; COCHRAN, G.C. 1991. Métodos Estadísticos. Continental Mexico. 703p.

- VARGAS, A. 1987. Evaluación del forraje del poró (*Erythrina coccleata*) como suplemento protéico para toretes en pastoreo. Tesis Mag. Sc., Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica, 88p.
- VASQUEZ, R. F. 1991. Comparación del poró (*Erythrina poeppigiana*) con dos fuentes nitrogenadas convencionales en la suplementación de terneras de lechería alimentadas con una dieta basal de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis M Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 107 p.