

ESTUDIO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EN ORUGA, POLILLA Y
HUEVO DE *Utetheisa ornatrix*, ALIMENTADA CON HOJAS O SEMILLAS DE
Crotalaria spp.

JESÚS ALBERTO ZAMBRANO RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2018

ESTUDIO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EN ORUGA, POLILLA Y
HUEVO DE *Utetheisa ornatrix*, ALIMENTADA CON HOJAS O SEMILLAS DE
Crotalaria spp.

JESÚS ALBERTO ZAMBRANO RODRÍGUEZ

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

DIRECTORA:

ELENA E. STASHENKO. QUÍMICA, PH.D.

CO-DIRECTORES:

JAIRO RENE MARTÍNEZ. QUÍMICO, PH.D.

FAUSTO PRADA CHAPARRO, QUÍMICO.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2018

AGRADECIMIENTOS.

A COLCIENCIAS, Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Contrato RC-0572-2012; la Universidad Industrial de Santander–VIE, proyecto 1786, y al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), por la financiación del proyecto.

A la doctora Elena E. Stashenko y el doctor Jairo René Martínez, por los conocimientos, experiencias y dedicación aportados en los últimos años de mi carrera.

A Fausto Prada, por la dedicación en el desarrollo de mi proyecto de grado.

A mis padres María E. Rodríguez, Nancy T. Zambrano, Libardo Zambrano y Alfonso Mantilla, porque sin ella no sería la persona quien soy actualmente, quienes me han apoyado emocional y económicamente de manera excepcional.

A mis hermanos Víctor Mantilla, Albert G. Zambrano y Liseth E. Rodríguez y demás familiares que de una u otra forma estuvieron presentes.

A José M. Pinto, Carol Y. Pimiento, Leidy Santamaría, Miguel Cáceres, Yurley P. Villamizar, Diana Basto, especialmente, a Laura Díaz, Daniela Báez y Oscar Montero, quienes me aconsejaron en todo momento acerca de mis decisiones.

*“Sólo podemos ver poco del futuro, pero lo suficiente
para darnos cuenta de que hay mucho por hacer”*

Alan Turing

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	23
1. ESTADO DEL ARTE	28
1.1. ANTECEDENTES Y ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO.....	29
2. MARCO TEÓRICO.....	34
2.1. METABOLITOS SECUNDARIOS.....	34
2.2. ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS.	35
2.3. <i>Utetheisa ornatix</i>	36
2.4. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA.....	40
2.5. CROMATOGRAFÍA.	40
2.5.1. Cromatografía de gases.....	41
2.5.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	41
2.6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	43
2.6.1. Detector de masas <i>Orbitrap</i>	43
3. METODOLOGÍA.....	46
3.1. REACTIVOS Y EQUIPOS AUXILIARES.....	46
3.2. RECOLECCIÓN DE HOJAS Y SEMILLAS DE <i>Crotalaria</i> spp.	47
3.3. RECOLECCIÓN DE ORUGAS <i>U. ornatix</i>	49
3.4. OBTENCIÓN DE HUEVOS DE <i>U. ornatix</i> PARA EXPERIMENTOS.....	49

3.5. ENSAYO PARA ALIMENTAR LAS ORUGAS <i>U. ornatrix</i> CON HOJAS O SEMILLAS DE <i>Crotalaria</i> spp.....	50
3.6. COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PA EN HOJAS Y SEMILLAS DE <i>Crotalaria</i> spp. Y EN <i>U. ornatrix</i> EN SUS DIFERENTES ESTADOS USANDO GC-MS Y LC-Orbitrap-MS.....	53
3.7. CONTENIDO DE PA EN EL ALIMENTO (HOJAS Y SEMILLAS DE <i>Crotalaria</i> spp.) Y EN <i>U. ORNATRIX</i> EN SUS DIFERENTES ESTADOS USANDO LC-Orbitrap-MS.	60
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN MSPD.....	64
4.2. IDENTIFICACIÓN TENTATIVA DE PA Y PANO.....	65
4.2.1. Patrones de fragmentación en GC-MS.....	72
4.2.2. Análisis de los espectros de masas obtenidos por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS.	77
4.3. ACUMULACIÓN DE PA EN <i>U. ornatrix</i> (ORUGA, POLILLA, HUEVOS, EXCREMENTO) ALIMENTADAS CON HOJAS O SEMILLAS DE <i>Crotalaria</i> spp.....	86
4.3.1. Acumulación de PA en <i>U. ornatrix</i> alimentada con hojas o semillas de <i>C. nitens</i>	88
4.3.2. Acumulación de PA en <i>U. ornatrix</i> alimentada hojas o semillas de <i>C. retusa</i>	94
4.3.3. Acumulación de PA en <i>U. ornatrix</i> alimentada hojas o semillas de <i>C. pallida</i>	99
4.3.4. Acumulación de PA en <i>U. ornatrix</i> alimentada con hojas o semillas de <i>C. incana</i>	104
4.4. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE PA DE HOJAS Y SEMILLAS DE <i>Crotalaria</i> spp. Y SU ACUMULACIÓN Y TRANSFORMACIÓN EN <i>U. ornatrix</i>	110

5. CONCLUSIONES.....	117
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	118
ANEXOS	141

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Número de publicaciones relacionadas con acumulación de PA en polillas, en el periodo de 1975 - 2017 Fuente: Elsevier (Scopus). Fecha de consulta: 18 de abril de 2018.	31
Figura 2. Crecimiento de publicaciones sobre los análisis de PA por la cromatografía líquida. Periodo de observación: 1982 - 2017. Base de datos: Elsevier (Scopus). Fecha de consulta el 18 de abril de 2018.	32
Figura 3. Estructuras moleculares de la monocrotalina (base) y el N-óxido de monocrotalina; hidroxidanaidal, creatonotina B e <i>iso</i> -creatonotina B.	36
Figura 4. A. Oruga y B. polilla de <i>Utetheisa ornatrix</i> (Foto: Jesus Alberto Zambrano Rodriguez, Fechas: 22 de noviembre del 2016 y 2 de enero del 2017), Lugar: CENIVAM.	37
Figura 5 Diagrama del ciclo de vida de <i>Utetheisa ornatrix</i> (Fotos: Jesus Alberto Zambrano Rodriguez), Fechas: 22 de noviembre del 2016 y 2 de enero del 2017. Lugar: CENIVAM	39
Figura 6. Mariposarios para polillas de cría, (Foto: Jesus Alberto Zambrano Rodriguez. Fechas: 15 diciembre del 2016 y 2 de enero del 2017), CENIVAM, UIS, Bucaramanga.	50
Figura 7. Proceso para determinar la eficiencia de extracción de los PA usando MSPD a partir de hojas de <i>Crotalaria nitens</i>	55

Figura 8. Equipos analíticos utilizados para la determinación en los PA de los extractos obtenidos de <i>Crotalaria</i> spp y <i>U. ornatix</i> en sus diferentes estados. A. UHPLC- <i>Orbitrap</i> -MS y B. GC-MS. Foto: Jesus A. Zambrano Rodriguez. Fecha: 21 de noviembre de 2017. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.	59
Figura 9. Perfiles cromatográficos obtenidos de los PA y PANO protonados $[M+H]^+$ presentes en los extractos de las hojas de <i>C. nitens</i> y <i>U. ornatix</i> (orugas) obtenidos por LC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS.....	70
Figura 10. Perfiles cromatográficos obtenidos de los PA y PANO protonados $[M+H]^+$ presentes en los extractos de <i>U. ornatix</i> (polillas y huevos) obtenidos por LC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS.	71
Figura 11. Espectro de masas (EI, 70 eV), de la retronecina.	72
Figura 12. Patrón de fragmentación de retronecina. EI, 70 eV.	73
Figura 13. Espectro de masas (EI, 70 eV), obtenido por GC-MS (<i>Full Scan</i>) del patrón de monocrotalina.	74
Figura 14. Patrón de fragmentación de la monocrotalina.EI, 70 eV.....	75
Figura 15. Espectro de masas (EI, 70 eV) obtenido por GC-MS (modo <i>Full Scan</i>) del patrón de retrorsina.....	76
Figura 16. Patrón de fragmentación de la retrorsina (EI, 70 eV). Tomado de [62] con algunas modificaciones.	77
Figura 17. Espectros de masas de la monocrotalina obtenido por A. GC-MS, EI, 70 eV y B. LC-ESI(+)-MS, HCD, 40 eV.....	77

Figura 18. Esquema de fragmentación de alcaloides pirrolizidínicos 1,2 insaturados obtenidos por LC-ESI(+)-MS.....	79
Figura 19. Estructuras de la creatonotina A <i>N</i> -óxido (1), la creatonotina B (2) y la calimorfina <i>N</i> -óxido (3).....	80
Figura 20. Espectro de masas de la creatonotina B obtenido por LC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS (modo <i>step scan</i>), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).....	81
Figura 21. Posible ruta de fragmentación en el espectro de masas de la creatonotina B LC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS (modo <i>step scan</i>), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).....	82
Figura 22. Espectro de masas de la creatonotina A <i>N</i> -óxido obtenido por LC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS (modo <i>step scan</i>), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).	83
Figura 23. Posible ruta de fragmentación en el espectro de masas de la creatonotina A <i>N</i> -óxido obtenido por LC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS (modo <i>step scan</i>), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).	84
Figura 24. Espectro de masas de la callimorfina <i>N</i> -óxido obtenido por LC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS (modo <i>step scan</i>), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).....	85

Figura 25. Posible ruta de fragmentación en el espectro de masas de la callimorfina <i>N</i> -óxido LC-Orbitrap-MS (modo <i>step scan</i>), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).....	86
Figura 26. Curva de calibración de la monocrotalina (estándar analítico, <i>Sigma Aldrich</i> , St. Louis, Missouri, EE.UU.).....	87
Figura 27. Contenido en equivalentes de monocrotalina de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y <i>N</i> -óxido (PANO) en hojas de <i>C. nitens</i> y <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados	89
Figura 28. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en equivalentes de monocrotalina en forma de base libre (PA) y <i>N</i> -óxido (PANO) en semillas de <i>C. nitens</i> y en <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados.....	90
Figura 29 Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y <i>N</i> -óxido (PANO) en hojas de <i>C. retusa</i> y en <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados...	94
Figura 30. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y <i>N</i> -óxido (PANO) en semillas de <i>C. retusa</i> y en <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados.....	95
Figura 31. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y <i>N</i> -óxido (PANO) en hojas de <i>C. pallida</i> y <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados....	99
Figura 32. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y <i>N</i> -óxido (PANO) en semillas de <i>C. pallida</i> y en <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados.....	100

Figura 33. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y N-óxido (PANO) en hojas de <i>C. incana</i> y en <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados	104
Figura 34. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y N-óxido (PANO) en semillas de <i>C. incana</i> y <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estado	105
Figura 35. Relación entre la concentración de PA totales en las hojas de <i>Crotalaria</i> spp. y la concentración de PA totales de los diferentes estados de <i>U. ornatrix</i>	111
Figura 36. Relación entre la concentración de PA totales en las hojas de <i>Crotalaria</i> spp. y la concentración de PA totales de los diferentes estados de <i>U. ornatrix</i>	112

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Listado de reactivos y equipos auxiliares empleados para la extracción de los PA en las hojas y semillas de <i>Crotalaria</i> spp. y en la <i>U. ornatrix</i> en sus diferentes estados.	46
Tabla 2. Identificación de <i>Crotalaria</i> spp. con códigos de Voucher, la exsiccata en el HNC.	48
Tabla 3. Parte de la planta suministrada a las orugas de <i>U. ornatrix</i>	51
Tabla 4. Esquema de muestreo de alimento (hojas y semillas de <i>Crotalaria</i> spp.) y <i>U. ornatrix</i> (oruga, polilla, huevo, excremento).....	61
Tabla 5. Recuperación de retrorsina usando MSPD con diferentes soportes sólidos y solventes de extracción.	65
Tabla 6. Los PA y PANO tentativamente identificados en hojas, semillas y <i>U. ornatrix</i> (polilla, huevo y oruga), usando LC-Orbitrap-MS y GC-MS.....	67
Tabla 7. Figuras de mérito para la monocrotalina para la cuantificación de PA y PANO en <i>Crotalaria</i> spp. y <i>U. ornatrix</i> usando LC-ESI(+)-Orbitrap-MS.....	87
Tabla 8. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> alimentadas con hojas <i>C. nitens</i>	91
Tabla 9. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> , alimentadas con semillas <i>C. nitens</i>	92

Tabla 10. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> , alimentadas con hojas de <i>C. retusa</i>	97
Tabla 11. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> , alimentadas con semillas de <i>C. retusa</i>	98
Tabla 12. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> , alimentadas con hojas de <i>C. pallida</i>	102
Tabla 13. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> , alimentadas con semillas de <i>C. pallida</i>	103
Tabla 14. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> alimentadas con hojas de <i>C. incana</i>	107
Tabla 15. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> alimentadas con semillas de <i>C. incana</i>	108
Tabla 16. Peso de la <i>U. ornatrix</i> de sus diferentes estados, cuando se alimentaba con hojas o semillas de <i>Crotalaria</i> spp.....	113

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Espectro de masas de la retronecina, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	142
Anexo B. Espectro de masas de un PA no identificado con fórmula molecular $C_7H_8O_2N$, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV...	142
Anexo C. Espectro de masas de un PANO no identificado con fórmula molecular $C_8H_{16}O_2N$, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	143
Anexo D. Espectro de masas de la retronecina <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	143
Anexo E. Espectro de masas de un PANO no identificado con fórmula molecular $C_8H_{16}ON$, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV...	144
Anexo F. Espectro de masas de la monocrotalina, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 40 eV	144
Anexo G. Espectro de masas del patrón de montocrotalina (estándar analítico, <i>Sigma Aldrich</i> , zSt. Louis, Missouri, EE.UU.), obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 40 eV	145
Anexo H. Espectro de masas de la monocrotalina <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 40 eV.	145
Anexo I. Espectro de masas de la <i>iso</i> -creatonotina B <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 30 eV.	146

Anexo J. Espectro de masas de un PANO no identificado con fórmula molecular de $C_{18}H_{26}O_7N$, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	146
Anexo K. Espectro de masas de la crispatina, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	147
Anexo L. Espectro de masas de la creatonotina B <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 30 eV.	147
Anexo M. Espectro de masas de la usaramina, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	148
Anexo N. Espectro de masas de la usaramina <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	148
Anexo O. Espectro de masas de la retusina <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	149
Anexo P. Espectro de masas de la crispatina <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	149
Anexo Q. Espectro de masas de la integerrimina, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 40 eV.	150
Anexo R. Espectro de masas de la integerrimina <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 50 eV.	150
Anexo S. Espectro de masas de la callimorfina <i>N</i> -óxido, obtenido por LC- <i>Orbitrap</i> -MS con una energía en la HCD de 30 eV.	151

LISTADO DE ABREVIATURAS

CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CI	<i>Chemical Ionization</i> (Ionización química).
CROM-MASS	Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas.
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
DB-5MS	Columna cromatográfica de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano).
d_f	Espesor de la fase estacionaria.
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionización por electrospray).
eV	Electrón-voltio.
FT-ICR-MS	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas con analizador de resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier).
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
HCD	<i>Higher Energy Collisional Dissociation</i> (Disociador colisional de alta energía)
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones).
LC-Orbitrap-MS	<i>Liquid Chromatography–Orbitrap Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con analizador Orbitrap).

LC-TOF-MS	<i>Liquid Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo).
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida)
<i>m/z</i>	Relación masa-carga.
PA	<i>Pyrrolizidine Alkaloids</i> (Alcaloides pirrolizidínicos).
PANO	<i>Pyrrolizidine Alkaloid N-oxides</i> (N-óxidos de alcaloides pirrolizidínicos).
PI	<i>Photoionization</i> (Fotoionización).
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida).
UIS	Universidad Industrial de Santander.

RESUMEN.

TITULO: ESTUDIO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EN ORUGA, POLILLA Y HUEVO DE *Utetheisa ornatrix*, ALIMENTADA CON HOJAS O SEMILLAS DE *Crotalaria* spp.*

AUTOR: Jesús Alberto Zambrano Rodríguez**

PALABRA CLAVE: *Utetheisa ornatrix*, *Crotalaria* spp., Alcaloides pirrolizidínicos, MSPD, GC-MS, LC-MS

Los alcaloides pirrolizidínicos (PA) y sus *N*-óxidos (PANO) presentes en especies del género *Crotalaria* (Familia: Fabaceae) asociados con defensa química de la planta. Sin embargo, las orugas de *Utetheisa ornatrix* (orden Lepidóptera, familia: Erebidae) pueden consumirlos y acumularlos para su propio beneficio. En el presente trabajo se evaluó la acumulación y transformación de PA por parte de *U. ornatrix* cuando se alimentó independientemente de hojas o semillas de especies de *Crotalaria* con diferente composición química y concentración de PA (*C. nitens*, *C. retusa*, *C. pallida* y *C. incana*). Se determinó el contenido de PA, PANO y los PA-transformados en los diferentes estados de *U. ornatrix* (huevos, oruga y polilla). Los alcaloides se extrajeron usando extracción de la matriz en fase sólida (MSPD) y análisis GC-MS y LC-Orbitrap-MS. La identificación de los PA se realizó comparando los índices de retención lineales (IRL) obtenidos por GC-MS, con los reportados en literatura y la obtención de las masas exactas y cálculo de fórmulas moleculares a partir de las especies protonadas $[M+H]^+$, usando el detector de alta resolución Orbitrap. Los principales alcaloides presentes en *Crotalaria* spp. y *U. ornatrix* fueron la monocrotalina, integerrimina, usaramina y crispatina, acumulados principalmente en forma de *N*-óxidos en la oruga, polilla y huevos. *U. ornatrix* pudo acumular hasta 7,8 mg/g de tejido fresco. Se observó que a mayor concentración de PA en la planta, mayor es su acumulación en *U. ornatrix*. No se encontró correlación entre la concentración de PA total en la planta y la cantidad de compuestos biosintetizados o el peso final de orugas o polillas de *U. ornatrix*. Finalmente, se detectaron la creatonotina B, iso-creatonotina B, la creatonotina A y la callimorfina como productos de transformación de PA en *U. ornatrix*. La creatonotina A y la callimorfina se reportaron por primera vez en *U. ornatrix*.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Elena E. Stashenko. Química Ph.D., Jairo Rene Martínez. Químico Ph.D. Co-director: Fausto Prada Chaparro, Químico.

ABSTRACT

STUDY OF PYRROLIZIDINE ALKALOIDS ON CATERPILLAR, MOTH AND EGGS OF *Utetheisa ornatrix*, FED WITH LEAVES OR SEEDS OF *Crotalaria* spp.*

Author: Jesús Alberto Zambrano**

Key words: *Utetheisa ornatrix*, *Crotalaria* spp, Pyrrolizidine Alkaloids, MSPD, GC-MS, LC-MS.

The pyrrolizidine alkaloids (PAs) and their *N*-oxides (PANOs) present in species of the genus *Crotalaria* (Fabaceae family). The PAs have been associated with the chemical defense of these plants. However, the caterpillar of the *Utetheisa ornatrix* moth (order Lepidoptera, family: Erebidæ) can sequester and accumulate the PAs for its own benefit. In this work, the accumulation and transformation of PAs sequestered by *U. ornatrix* were evaluated when the caterpillar were fed from leaves or seeds of four *Crotalaria* species with different composition and concentration of PAs (*C. nitens*, *C. retusa*, *C. pallida*, and *C. incana*). The content of PAs, PANOs and PA-transformed products at different states of *U. ornatrix* (eggs, caterpillar and moth) were determined. The PAs and PANOs were extracted using matrix solid-phase dispersion (MSPD) and analyzed by GC-MS and LC-Orbitrap-MS. The identification of the PAs was done by comparison of the linear retention indexes (LRI) obtained by GC-MS with those reported in literature, and the molecular formulas obtained from the exact masses of the protonated species $[M+H]^+$ of the alkaloids using high resolution mass spectrometry with Orbitrap detector. The main alkaloids found in *Crotalaria* spp. and *U. ornatrix* were monocrotaline, integerrimine, usaramine and crispatine. The accumulation in *U. ornatrix* was mainly in the *N*-oxide form. The caterpillars of *U. ornatrix* were able to accumulate up to 7.8 mg/g of wet weight. The higher the PAs concentration in plant seeds of leaves, the higher the accumulation in *U. ornatrix*. No correlation was found between the total PAs concentration in the plant and the amount of transformed compounds or the final weight of caterpillars or moths. Finally, creatonotine B, *iso*-creatonotine B, creatonotine A and callimorphine were detected as PA-transformed products in *U. ornatrix*. Creatonotine A and callimorphine were reported for the first time in *U. ornatrix*.

*Degree Project

**Faculty of Sciences, School of Chemistry. Supervisors: Elena E. Stashenko, Ph.D., and Jairo Rene Martínez, Ph.D. Co-supervisor: Fausto Prada Chaparro, Chemist

INTRODUCCIÓN.

Una característica de las plantas es su capacidad de sintetizar una enorme variedad de sustancias conocidas como metabolitos secundarios. Estos cumplen la función de defensa, algunos son agentes repelentes o distractores de insectos, antifúngicos, antivirales, antigerminativos, absorbentes de la radiación UV, hormonas, entre otros(1, 2).

Las plantas se defienden de los insectos herbívoros mediante la formación de una gran cantidad de defensas químicas, las cuales pueden producirse constitutivamente o ser inducidas por herbivoría. Dentro de las defensas, se incluyen las toxinas, agentes disuasorios y señales volátiles que atraen a los depredadores de herbívoros. Hasta la fecha, una gran cantidad de compuestos derivados de las plantas han sido reportados como metabolitos secundarios, entre ellos, los terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (3, 4). Los terpenoides son probablemente el grupo tipo más diverso y preponderante de productos naturales; los compuestos fenólicos representan el 40% del carbono orgánico de la biosfera, y los alcaloides, con el 20%, son producidos por la angiosperma (5). Un grupo de sustancias químicas empleadas en la defensa contra depredadores son los alcaloides pirrolizidínicos (PA) y sus respectivos *N*-óxidos (PANO). Estos alcaloides se encuentran en las plantas de algunas especies, principalmente, de las familias Asteraceae, Boraginaceae y Fabaceae.

En plantas del género *Senecio*, el *N*-óxido de senecionina, se sintetiza en las raíces y se distribuye hacia todos los tejidos, especialmente, hacia flores y frutos

(6). El transporte en la planta ocurre exclusivamente a través del floema; los alcaloides se almacena en la vacuola en forma *N*-óxidos (7, 8). Se ha demostrado, que las plantas sintetizan los PA para defenderse del ataque de algunos insectos (9). Generalmente, las defensas empleadas por las plantas son efectivas contra la gran mayoría de especies potencialmente herbívoras. Aun así, se puede encontrar que algunas especies de herbívoros han evolucionado y proporcionan las contramedidas necesarias para superar algunas defensas químicas de la planta, logran sobrevivir mediante la explotación de comida proporcionada por la planta. La mayoría de insectos especializados, se alimentan solo de ciertas especies que se relacionan entre sí por emplear el mismo tipo de defensas químicas. Cuando el insecto se enfrenta a una serie de compuestos similares y “predecibles”, puede desplegar sus contramedidas e incluso usar estos compuestos como un estimulante de la alimentación y oviposición. El grado de especialización del insecto puede extenderse a la acumulación selectiva, transporte, modificación y despliegue de sustancias químicas para su propia defensa. Algunas especies de insectos de las familias *Erebidae* (antes *Arctiidae*), *Danainae* e *Ithomiinae* (*Lepidóptera*), acumulan los PA y los usan para su propia defensa contra depredadores (10, 11) y como precursores de la biosíntesis de feromonas de cortejo (12, 13). Los estudios sobre PA en insectos hasta ahora realizados se han centrado en polillas tales como *Estigmene acrea* (14), *Grammia geneura*(15), *Tyria jacobea* (16), *Arctia caja* (17), *Callimorpha dominula* (18), (19), *Gnophaela latipennis* (20), *Hyalurga syma* (21), *Cretonos transiens* (22) y *Utetheisa ornatrix* (23).

La *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Erebidae) es una polilla que acumula los PA de las especies de *Crotalaria* y los usa como defensa y como precursores de hormonas de cortejo (23). Se encontró que *U. ornatrix* usa los PA para defenderse contra la araña *Nephila clavipes* (23). Durante el cortejo, los machos transfieren los PA a las hembras y éstas a sus huevos. Como resultado de la transferencia, los huevos también se protegen de los depredadores (24). Por otro lado, la *U. ornatrix* biosintetiza derivados de PA llamados creatonotinas (23), compuestos precursores de las hormonas de cortejo (25).

La acumulación de los PA por parte de *U. ornatrix*, es un ejemplo de la interacción planta-insecto en un medio natural. Sin embargo, aún quedan varios interrogantes. ¿Cuántos PA puede acumular *U. ornatrix*? ¿esto depende de la fuente o del ciclo de vida? ¿el tipo de alimento determina cuáles serán los PA acumulados en *U. ornatrix*?

En el presente trabajo, se desarrolló un modelo de interacción *Crotalaria* spp. - *U. ornatrix* para contestar parcialmente algunas de las preguntas anteriores. Se usó un método de extracción selectivo (Dispersión de la matriz en fase sólida, MSPD). Los alcaloides y sus derivados se analizaron con espectrometría de masas de alta resolución (LC-orbitrap-MS). La instrumentación analítica empleada en la literatura (23, 26) posee varias limitantes; los métodos colorimétricos no permiten determinar la estructura molecular de las sustancias químicas, solo hacer la cuantificación total de alcaloides. El análisis mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permite elucidar la estructura

molecular, pero infortunadamente los PANO, debido a que son muy polares, no volátiles y se descomponen en el puerto de inyección, no pueden ser analizados por GC-MS, se requiere analizarlos por LC-MS.

En el presente trabajo, se determinó la acumulación y la biotransformación de PA en diferentes estados de la *U. ornatrix* (orugas, polillas, huevos), alimentada con hojas o semillas de *Crotalaria* spp. (*C. nitens*, *C. pallida*, *C. incana* y *C. retusa*). Los PA y PANO se extrajeron de las diferentes partes de la planta (hojas y semillas) y de la *U. ornatrix* (orugas, polillas y huevos) con MSPD, se cuantificaron con cromatografía líquida (LC) y se identificaron empleando una combinación entre LC-Orbitrap-MS y GC-MS.

La fase de prospección está avalada por el “Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica N° 101”, entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM. Este trabajo hace parte del proyecto “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana”, financiado por COLCIENCIAS, ejecutado por la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, a través del Centro de Investigación de Biomoléculas CIBIMOL, contrato RC-0572-2012; también contó con la co-financiación de La Universidad Industrial de Santander–VIE, Proyecto 1786. La manipulación de orugas, polillas y huevos de *U. ornatrix*,

fue avalada por el COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION CIENTIFICA –
CIENCI de la UIS

1. ESTADO DEL ARTE

Las especies de lepidópteras como *Erebidae* e *Ithomiinae*, escarabajos del género *Oreina* y los saltamontes del género *Zonocerus*, acumulan y mantienen los PA en forma de PANO(27). El saltamontes *Zonocerus* y la especies del género *Erebidae* convierten los PA a los PANO mediante una enzima que cataliza la *N*-oxidación(28). Los escarabajos no poseen la misma capacidad de oxidar los PA; ellos ingieren ambos alcaloides, pero solo almacenan los PANO (16). La *Tyria jacobaeae* (*Lepidoptera*), alimentada con *Senecio jacobea* (*Asteaceae*), oxida los PA en PANO (16). Esta *N*-oxidación se cataliza por la enzima senecio *N*-oxigenasa (SNO). La SNO actúa en la hemolinfa del insecto, siendo la *N*-oxidación altamente específica para los sustratos que contienen grupos que son bioactivados por la enzima P450 (24, 29). La *Spodoptera littoralis* excreta rápidamente los PA de las células que puedan ser dañadas. Algunos escarabajos del género *Platyphora* (30) limpian eficientemente los PA de la hemolinfa y los acumulan en glándulas defensivas. Cualquier PA que escape de alguno de estos mecanismos de adquisición será glucosidado en la hemolinfa. Algunas especies de polillas, durante el proceso de metamorfosis transforman los PANO a otros derivados. Se conocen dos familias de estructuras transformadas a partir de los PA en la etapa de oruga, *i.e.*, las calimorfinas (17, 19–22, 30) y las creatonotinas (31, 32). Se ha reportado (31–33), que el macho de la *T. jacobaeae* transfiere los PA a la hembra durante la copulación; este proceso se induce con el uso de la feromona hidroxidanaidal, un derivado de la creatonotina. La biosíntesis de la

feromona hidroxidanaidal en *Cretonotos transiens* ha sido elucidada empleando una alimentación específica con derivados de heliotrina deuterada (24).

1.1. ANTECEDENTES Y ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO.

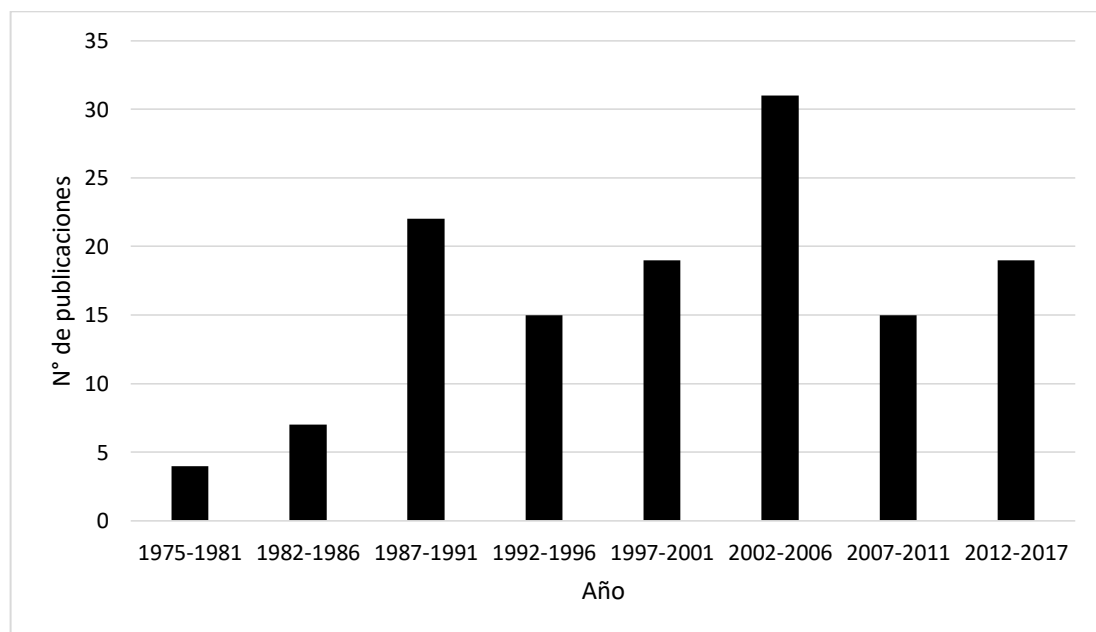
El primer trabajo relacionado con la acumulación y la biotransformación de los PA en insectos apareció en el año de 1966, cuando Meinwald J y Meinwald YC (34) aislaron una feromona presente en la coremata de machos de *Lycorea ceres*, y observaron que la feromona posiblemente, no era producida por la mariposa, sino que debía ser un compuesto presente en la fuente de comida. Dos años después Miriam Rothschild y colaboradores (35), por primera vez reportaron un insecto acumulador de PA (*T. jacobaeae*) alimentado con *Jacobaeae vulgaris* y determinaron que la *T. jacobaeae* sintetizaba una nueva sustancia que llamaron callimorfina. Doce años después del descubrimiento de la callimorfina, en 1980, esta sustancia se identificó como éster-O⁹-retronecina, acetilada con el ácido 2-hidroxi-2-metilbutírico (18). Se demostró que la callimorfina en la *T. jacobaeae* provenía de la retronecina producida por la planta de la cual se alimentaba la oruga (13). En la década de los 80, la callimorfina se encontró en un cierto número de especies de la familia *Erebidae* tales como: *Arctia caja* (17), *Callimorpha dominula* (18), *Cretonotos transiens* (24), *Gnophaela latipennis* (20), *Hyalurga syma* (21), lo que dio lugar a un aumento inusual en el número de publicaciones en esta década, como se puede observar en la **Figura 1**.

En las últimas décadas los estudios se han centrado en el tema sobre la acumulación de PA en algunas especies, e. g., el saltamontes *Zonocerus*

variegatus (36), el áfido *Aphis jacobaeae* (8), *Ceroplastes albolineatus* (37), los hemípteros, *Neacoryphus bicrucis* (38), *Largus rufipennis* (39), y *Lopidea instabile* (40). En un estudio realizado en el 2016, se detectaron 14 metabolitos secundarios derivados de PA provenientes de la planta, en los huevos, orugas, crisálida y polillas de la especie *Scearctia figulina* (41).

Las investigaciones de PA en insectos de las familias *Erebidae*, *Danaineae* e *Ithomiine* como una defensa química contra depredadores y su uso como precursores químicos de feromonas sexuales han sido un tema de interés desde los años 80 (Véase **Figura 1**).

Figura 1. Número de publicaciones relacionadas con acumulación de PA en polillas, en el periodo de 1975 - 2017



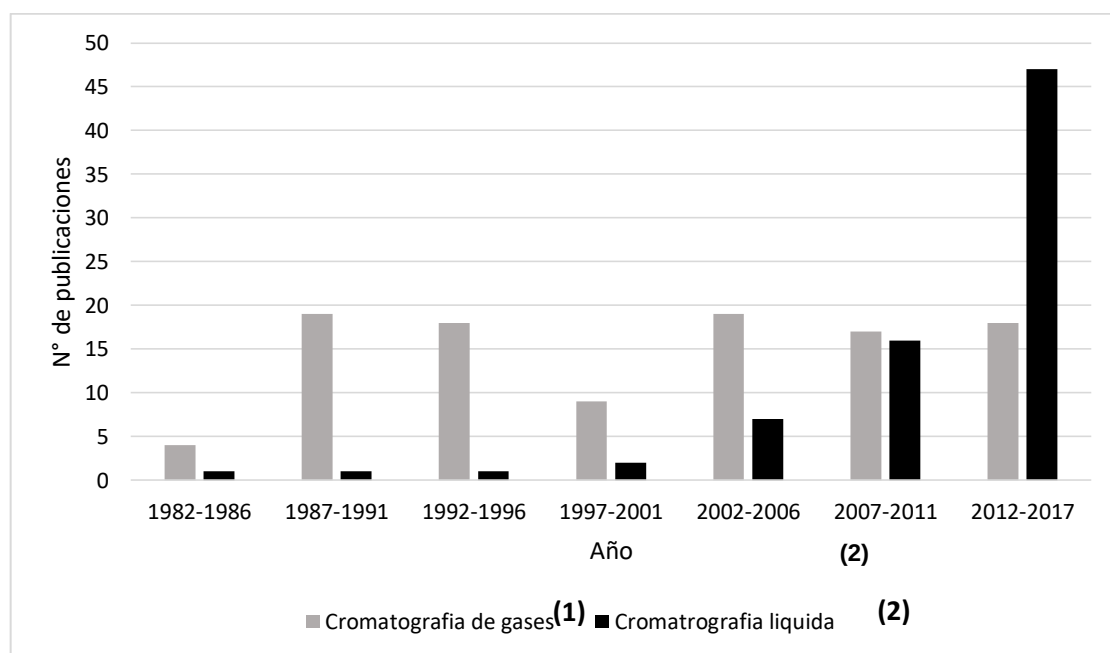
Fuente: Elsevier (Scopus). Fecha de consulta: 18 de abril de 2018. Ecuación de búsqueda: [TITLE-ABS-KEY (moth) AND TITLE-ABS-KEY (pyrrolizidine AND alkaloid)].

Las investigaciones relacionadas con *U. ornatrix* comenzaron en la década de los 80. En 1981, Conner *et. al.* (42), encontraron que la polilla macho que posee una mayor concentración de hidroxidanaidal tenían una probabilidad superior en el éxito de la copulación con una hembra; nueve años más tarde (43), los autores notaron que la hembra usaba la concentración de hidroxidanaidal como indicador del contenido de PA en el macho. Los PA se transfiere a las hembras durante la copulación; las hembras pasan luego los PA a los huevos (34, 44). En las dos últimas décadas, los estudios se han centrado en el tema de la promiscuidad de la polilla hembra, la cual es capaz de copular con varios machos, para obtener más PA, que posteriormente serán transferidos a los huevos (45, 46) y no por tener un mayor éxito en la fecundación (47). En las plantas de *C. pallida*, vigiladas continuamente por hormigas por a la presencia de nectarios extra-florales, las hormigas atacaban más a las orugas de *U. ornatrix*, cuando éstas están cerca de las flores y frutos, en comparación con el ataque de las hormigas cuando permanecían en las hojas (48). Martins y colaboradores (23) identificaron y detectaron otros metabolitos propios de la polilla (tanto machos como hembras) derivados de los PA presentes en las plantas de *Crotalaria* spp., *i.e.*, la creatonotina B y la *iso*-creatonotina B.

Con respecto al análisis de los PA, se observó que el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas está en aumento, mientras que el empleo de la cromatografía de gases ha tenido una disminución, tal como se puede observar en la

Figura 2. Este comportamiento se debe a la facilidad, sensibilidad y especificidad en los análisis usando LC-MS, además, esta técnica permite analizar simultáneamente a los PA y sus *N*-óxidos, sustancia muy polares y no volátiles.

Figura 2. Crecimiento de publicaciones sobre los análisis de PA por la cromatografía líquida. Periodo de observación: 1982 - 2017. Base de datos: Elsevier (Scopus). Fecha de consulta el 18 de abril de 2018.



Se emplearon dos ecuaciones de búsqueda: (1) cromatografía de gases: [TITLE-ABS-KEY (GC) AND TITLE-ABS-KEY (pyrrolizidine AND alkaloids)]; (2) Para

cromatografía líquida: [TITLE-ABS-KEY (LC) AND TITLE-ABS-KEY (pyrrolizidine AND alkaloids)].

2. MARCO TEÓRICO

2.1. METABOLITOS SECUNDARIOS.

Los metabolitos en las plantas pueden clasificarse en primarios o secundarios, dependiendo de su función y papel en el metabolismo de la planta. Dentro de los metabolitos primarios se encuentran los sacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros (3). En general, los metabolitos secundarios son sustancias químicas que se relacionan con la defensa, desarrollo y adaptación (evolución) de las plantas, se producen y almacenan en células especializadas (1). Estas moléculas contribuyen enormemente a las interacciones dentro de los ecosistemas. Los metabolitos secundarios son en su mayoría sustancias bioactivas, algunos son antifúngicos, antivirales, repelentes, antigerminativos (alelopatía). Además, son compuestos absorbentes de la luz UV, con lo que evitan daños en las plantas (2). Los metabolitos secundarios han sido utilizados en la medicina tradicional debido a sus propiedades biológicas; algunos, se usan como ingredientes naturales, por ejemplo, en cosméticos (como antioxidantes), repelentes de insectos, fitofarmacos, aceites para masajes, entre otros. Los metabolitos secundarios han surgido por selección natural durante millones de años, son de importancia para las plantas principalmente como defensa contra herbívoros, bacterias, parasitoides, patógenos, plantas competitivas, entre otras, y para la reproducción a través de atracción de insectos polinizadores o repelentes de insectos. Por lo tanto, los metabolitos secundarios son importantes para la

supervivencia de la planta, su aptitud reproductiva y para la adaptación al medio (49).

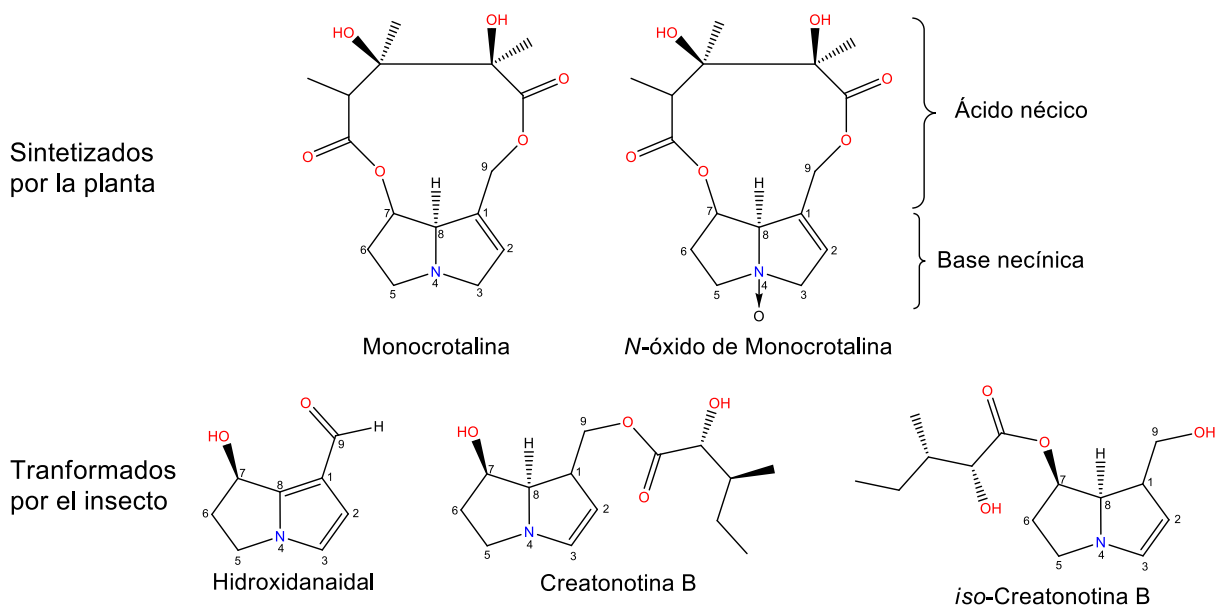
La herbivoría es una amenaza a la supervivencia de las plantas y, como proceso de la evolución, las plantas pueden acumular sustancias químicas tóxicas contra los herbívoros. La mayoría de los metabolitos en las plantas proporcionan la defensa contra los animales herbívoros (4). Para evitar su auto-toxicidad, generalmente, estas sustancias se encuentran en la vacuola de la célula. Los compuestos químicos más comunes asociados con agentes antiherbivoría son los terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (3). Un ejemplo específico de los metabolitos secundarios empleados por la planta para su defensa, son los PA.

2.2. ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS.

Los PA son metabolitos secundarios que se producen en las plantas como uno de los mecanismos de su defensa contra los insectos herbívoros (27). Se han encontrado más de 660 PA y *N*-óxidos en más de 6000 plantas y, aproximadamente, la mitad de ellos, presentan hepatotoxicidad (27). En la naturaleza, se han encontrado 370 estructuras químicas de los PA (10, 50). Los PA son ésteres de alcaloides compuestos de una base de necina y un alquilo, un aralquilo o ácido néxico, pueden existir en dos formas; como de *N*-óxido (PANO) y como base libre (PA) (Véase **Figura 3**). Los PA son un ejemplo de compuestos químicos que influyen en los parámetros bioquímicos, sensoriales y de comportamiento en los Lepidópteros (polilla, mariposas, entre otras) y Coleópteros (escarabajos) (51). Los PA se encuentran principalmente en las familias

Boraginaceae, *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Senecioneae* y *Eupatorieae* y en ciertas especies del género *Orchidaceae*. Las especies de *Erebidae*, *Danainae* e *Ithomiinae* (Lepidoptera) son capaces de utilizar los PA para su propia protección (12).

Figura 3. Estructuras moleculares de la monocrotalina (base) y el *N*-óxido de monocrotalina; hidroxidanaidal, creatonotina B e *iso*-creatonotina B.

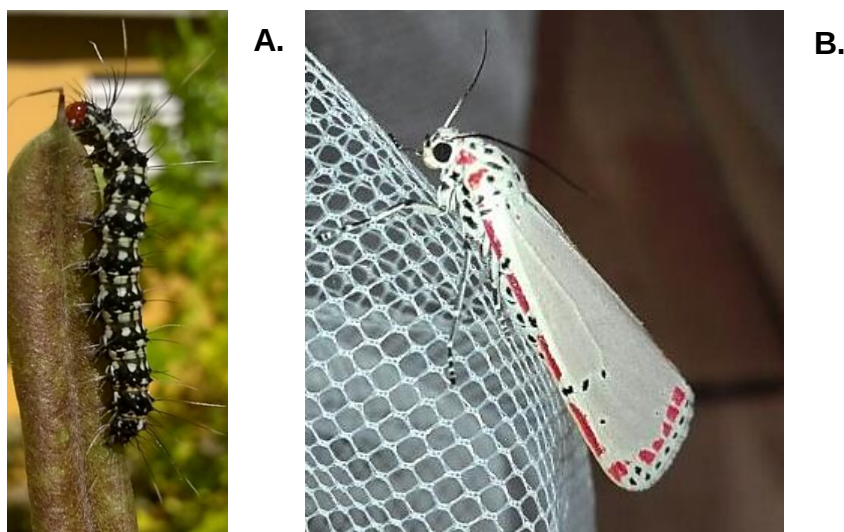


2.3. *UTETHEISA ORNATRIX*.

La *U. ornatrix* (Erebidae: Lepidoptera) (Véase **Figura 4**), comúnmente se llama “Polilla bella”. Es una Lepidóptera, que pertenece a la familia *Erebidae*. A diferencia de la mayoría de las polillas que son nocturnas, la *U. ornatrix* es diurna. Los huevos son esféricos de color blanco o amarillo. Las orugas miden 30-35 mm de longitud, son de color naranja-marrón, con bandas negras e irregulares. Las

bandas negras tienen puntos blancos antes y después de cada banda, presenta vellosidades en todo el cuerpo. Mientras que la mayoría de larvas de este género presentan verrugas, la *U. ornatix* no las tiene. Las crisálidas son de color negro con bandas irregulares de color naranja-marrón y están cubiertas por una capa de seda. La polilla posee una coloración variable, lo que ha llevado a una confusión con respecto a su taxonomía y la asignación de muchos nombres. Mide entre 3.0 y 4.5 cm; tiene alas delanteras de color amarillo con bandas blancas que contienen una fila de puntos negros; las alas posteriores son de color rosa brillante (51).

Figura 4. A. Oruga y B. polilla de *Utetheisa ornatix* (Foto: Jesus Alberto Zambrano Rodriguez, Fechas: 22 de noviembre del 2016 y 2 de enero del 2017), Lugar: CENIVAM.



Las orugas se alimentan con plantas del género *Crotalaria*, que contienen PA. La *U. ornatix* ha desarrollado adaptaciones para superar la defensa de la planta y utiliza los PA en su propia defensa contra depredadores, además empleados para

la síntesis de la hormona hidroxidanaidal (Véase **Figura 3**), utilizada para atraer a la hembra durante el apareamiento (7, 42). La protección contra la *N. clavipes* es más efectiva, cuando la concentración de PA aumenta en el alimento de la *U. ornatrix* (23). Se confirmó la conversión de heliotrina al hidroxidanaidal, cuando la oruga se alimentó con la heliotrina deuterada (24).

La adquisición de los PA no afecta significativamente en su desarrollo físico (tiempo de vida, peso, número de individuos que sobreviven hasta la etapa de madurez, número de huevos colocados por las polillas, entre otros) de los herbívoros especializados, incluyendo a la *U. ornatrix*, independientemente de la concentración de PA (9). A diferencia, de algunos saltamontes, áfidos, mariposas, polillas y moscas (*Miramella alpina*, *Locusta migratoria*, *Frankliniella occidentalis*, *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus persicae*, *Choristoneura fumiferana*, entre otras) no especializados, sí se observa un efecto negativo cuando se alimentan con PA (11).

Durante el ciclo de vida, los huevos se ponen en racimos del follaje. Al eclosionar, las larvas jóvenes se alimentan del follaje, pero, luego se trasladan a las vainas que perforan para alimentarse de las semillas. Al llegar a la madurez, las larvas migran de huésped hacia la corteza suelta de árboles cercanos, a una vegetación espesa o en escombros para formar crisálidas. Una vez polillas, se disponen a reproducirse y depositar los huevos nuevamente en la vegetación (51). En la **Figura 5**, se muestra detalladamente el ciclo de vida de la *U. ornatrix*.

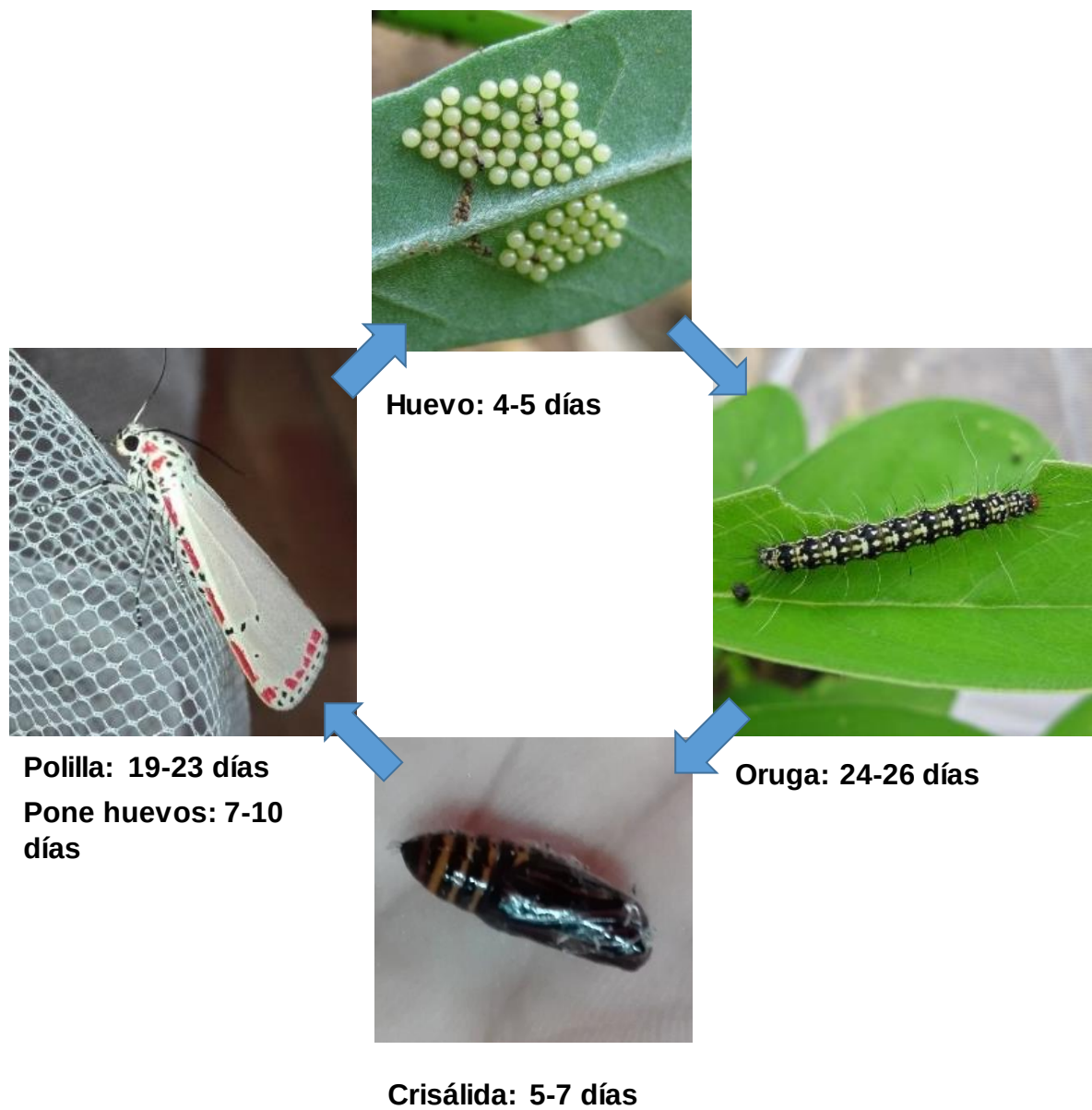


Figura 5 Diagrama del ciclo de vida de *Utetheisa ornatrix* (Fotos: Jesus Alberto Zambrano Rodriguez), Fechas: 22 de noviembre del 2016 y 2 de enero del 2017. Lugar: CENIVAM (51).

2.4. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA.

La dispersión de la matriz en fase sólida MSPD es una técnica de extracción que permite aislar componentes de matrices sólidas, semisólidas o viscosas. La MSPD emplea un mecanismo de rompimiento y dispersión simultánea de la muestra en un soporte sólido tal como sílice o sílice modificada con C_8 o C_{18} . El soporte y la muestra se depositan en un mortero donde se homogeneizan y pulverizan. Los componentes de la muestra se distribuyen en la superficie del soporte, dependiendo de la polaridad. Los compuestos no polares se dispersan en la fase orgánica y los compuestos más polares se distribuyen en la superficie de la sílice. Posteriormente, el pulverizado resultante se coloca en una columna donde previamente se ubican un filtro en la parte inferior. Finalmente, se hace elución con uno o varios solventes (hexano, acetato de etilo, acetonitrilo, metanol o agua). El solvente de elución puede contener ácidos, bases o sales para alterar el estado iónico de los analitos. La MSPD permite: (i) reducir el tiempo del análisis; (ii) aumentar la cantidad de muestras procesadas; (iii) reducir la cantidad de solventes en la extracción y (iv) generar una información igual o, en algunos casos, mejor que los métodos tradicionales (Soxhlet, Extracción en fase sólida) (52, 53).

2.5. CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía es el proceso en el cual los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria y otra, móvil. La fase estacionaria puede ser líquida o sólida, mientras que la fase móvil puede ser líquida o gaseosa. En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas y en la

cromatografía líquida, es un líquido. Los componentes de la mezcla viajan a velocidades diferentes a través del sistema cromatográfico, por lo que se separa. La separación se basa en la repartición diferencial entre la fase móvil y la fase estacionaria. Las pequeñas diferencias en el coeficiente de partición, K_D , de los compuestos dan como resultado un tiempo de retención diferente para cada analito (54).

2.5.1. Cromatografía de gases. El método más utilizado desde la mitad del siglo XX para la separación de mezclas complejas es la cromatografía de gases, que puede tener varios sistemas de detección. La GC brinda gran sensibilidad, selectividad, repetitividad y robustez, en un amplio rango de concentraciones de analitos (55). Un cromatógrafo de gases convencional está conformado básicamente por cuatro partes: inyector, columna, horno y detector. El inyector es el sitio donde se inyecta la muestra, comúnmente se encuentra a una temperatura de 250-300 °C. Posteriormente, los compuestos pasan a la columna, donde ocurre la separación de los compuestos, según sus constantes de distribución, K_D ; la columna se encuentra dentro del horno con temperatura programable. Un detector genera una respuesta, según alguna propiedad físico-química específica de los compuestos que emergen de la columna. Los detectores pueden ser destructivos (FID, NPD, MSD) y no destructivos (ECD, TCD). Uno de los más usados en la GC es un detector de ionización en llama (FID).

2.5.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica analítica en la que se usa la fase móvil

líquida. La mezcla de solvente se hace pasar a través de la columna cromatográfica con una presión de varios MPa. En 1941, Martin y Synge (56), estaban conscientes, que en teoría se podría incrementar la eficiencia, haciendo la fase estacionaria de partículas muy pequeñas y, por lo tanto, se necesitaba una alta presión para forzar a la fase móvil pasar a través de la columna.

Existen diferentes modos de separación en HPLC: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa. La cromatografía en fase normal utiliza como fase estacionaria un material relativamente polar, siendo sílice la más popular, pero a menudo se usan alúmina y óxido de magnesio, y una fase móvil no polar como hexano o éter. Caso contrario ocurre en la cromatografía en fase reversa, donde la fase estacionaria es apolar, tal como sílice modificada con C₁₈, y la fase móvil es polar, como agua, metanol o acetonitrilo. También existen otros tipos de cromatografía líquida: cromatografía de intercambio iónico, afinidad o por exclusión de tamaño, entre otras.

Un HPLC está compuesto por un depósito de solvente, líneas de transferencia, una bomba de alta presión, un dispositivo de inyección de la muestra, una columna, detector, un dispositivo controlador de la temperatura en un termostato, un degasificador y un dispositivo de adquisición de datos.

La diferencia más importante entre HPLC y GC es que GC solo permite analizar sustancias volátiles (>350°C) o sustancias que a altas temperaturas sean estables. Solo el 20% de los compuestos orgánicos se pueden analizar por GC,

sin un tratamiento previo. Sin embargo, HPLC posee una menor capacidad de resolver las bandas cromatográficas.

2.6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que mide las masas de partículas cargadas y las separa según su relación m/z . La ionización puede darse por métodos físicos o químicos. La separación de los iones se realiza por campos eléctricos o magnéticos, estáticos o dinámicos. Existen dos tipos de espectrómetros de masas, según su resolución: i) espectrómetros de masas de alta resolución y ii) espectrómetros de masas de baja resolución. Los espectrómetros de masas de baja resolución miden masas nominales (trampa de iones, cuadrupolo). Los espectrómetros de masas de alta resolución permiten medir masas exactas de los iones (FT-ICR-MS, TOF-MS, *Orbitrap*-MS).

2.6.1. Detector de masas *Orbitrap*. El detector de masas *Orbitrap* basa su principio de funcionamiento en una trampa en orbital, introducida en 1923 (57). Kingdon describió un dispositivo en forma de trampa que consistía de un alambre estirado a lo largo del eje de una caja de metal cerrada. El eje establecía un campo eléctrico dentro de la caja. Dentro de la caja los iones se mantenían girando sobre el eje debido al campo eléctrico. No obstante, requería un dispositivo con mejoras significantes para resolver incluso mezclas simples de iones.

El desarrollo del *Orbitrap* fue basado en la necesidad de un nuevo espectrómetro de masas que no tuviese los defectos de otros instrumentos, como la magnitud, complejidad y costo del FT-ICR-MS; el bajo rango dinámico del TOF y la exactitud baja de analizador de trampa de iones. Basando en el principio de la trampa electrostática, Makarov (58, 59), propuso mejorar el esquema de detección por uno que fuera compatible con la estructura de la trampa.

El detector de masas *Orbitrap* fue diseñado para remplazar el eje (electrodo), usando uno central en forma de huso en combinación con dos electrodos simétricos externos que complementaban la forma del electrodo central. Los electrodos externos que están eléctricamente aislados uno del otro y se usan para dos propósitos: (i) el establecimiento del campo de la trampa de iones y (ii) como plato receptor para la detección de la corriente de imagen. Para habilitar la inyección de los iones generados externamente, se construyó un espacio con un electrodo de compensación para minimizar la pérdida de iones durante la transferencia. Con los iones girando exitosamente en la trampa en forma de orbital y oscilando alrededor del electrodo central, las corrientes de imagen de los iones oscilantes se detectan en los platos (antenas) receptores.

El primer instrumento prototipo incorporando un detector de masas *Orbitrap* poseía un inconveniente: la ausencia del control sobre el número de iones que entran en la trampa producía un decaimiento de los iones, su poca transmisión y rango de masas bajo. La clave fue la implementación de un dispositivo de almacenamiento de iones, llamado *C-Trap*, que permitió la acumulación de los

iones antes de su inyección al *Orbitrap*. *C-Trap* permite convertir el haz continuo proveniente de fuente de iones (ESI), en uno por pulsos. El espectro de masas se genera por un tratamiento matemático (transformada de Fourier) de la señal y aplicando dos puntos de calibración (60).

3. METODOLOGÍA

3.1. REACTIVOS Y EQUIPOS AUXILIARES.

En la **Tabla 1** se muestran los reactivos y equipos auxiliares empleados para la extracción y análisis de los PA en *Crotalaria* spp. y *U. ornatrix*.

Tabla 1. Listado de reactivos y equipos auxiliares empleados para la extracción de los PA en las hojas y semillas de *Crotalaria* spp. y en la *U. ornatrix* en sus diferentes estados.

Reactivos	Descripción
Sílice modificada con C18	Tamaño de partícula: 40-63 µm, carbono 23%, <i>Silicycle Inc.</i> Quebec, Canadá.
Ácido clorhídrico	ACS Reagent 36,5-38%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
2-propanol	ACS Reagent 99,8%, <i>Sigma Aldrich</i> , Saint Louis, EE.UU.
Agua tipo 1	Sistema de purificación <i>Synergy UV</i> , <i>Millipore S.A.S.</i> , Molsheim, Francia
Acido fórmico	Suprapur [®] , 98-100%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania
Acetonitrilo (ACN)	LiChorosolv [®] <i>Hypergrade for LC-MS</i> , >99,9%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Metanol	ENSURE [®] , ACS, ISO, Reag. Ph Eur 99,7%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania

Zinc en polvo	95-99%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
---------------	--

Tabla 1. Continuación

Hidróxido de amonio	28-30%, <i>J. T. Baker</i> , New Jersey
Monocrotalina	99,9%, <i>Sigma Aldrich</i> , Saint Louis, EE.UU.
Retronecina	99,9%, <i>Sigma Aldrich</i> , Saint Louis, EE.UU.
Retrorcina	99,9%, <i>Sigma Aldrich</i> , Saint Louis, EE.UU.
<i>n</i> -Hexano	ENSURE [®] , ACS, ISO, Reag. Ph Eur 99,7%, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania

Materiales y equipos auxiliares

Viales cromatográficos	2 mL, (<i>Agilent Technologies</i> , Santa clara, CA, EE.UU.).
Micropipetas	2-20, 20-200, 100-1000 µL.
Consumibles	Jeringas plásticas 5 mL, <i>septa</i> , algodón.
Balanza analíticas	<i>Mettler-Toledo</i> PB1502-S, Nänicon, Suiza
Ultrasonido	<i>Elmasonic</i> E30H, Elma, Alemania
Minishaker	IKA, Hofheim, Alemania
Centrífuga	Campac II, <i>Clay Adams</i> (Sparks, MD, EE. UU.)
Rotaevaporador	<i>Heidolph</i> , Schwabach, Alemania

3.2. RECOLECCIÓN DE HOJAS Y SEMILLAS DE *Crotalaria* spp.

Las plantas se recolectaron, respetando lo establecido en el decreto 1376 del 2013 emitido por el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, “por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial”, otorgado a la Unión temporal Bio-Red-Co-CENIVAM, a través del contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biología N° 101 entre el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la unión Temporal Bio-Red-Co-CENIVAM. Las hojas y semillas se obtuvieron de plantas situadas en parcelas cultivadas en el CENIVAM (UIS). La identificación se realizó en el Herbario Nacional de Colombia (HNC), del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Las *exsiccatae* de las especies vegetales se registraron con los números de colecta presentes en la **Tabla 2**. Se conservó una *exsiccata* testigo en el Herbario del Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

Tabla 2. Identificación de *Crotalaria* spp. con códigos de Voucher, la *exsiccata* en el HNC.

Nombre.	Voucher N° COL.	Determinó.
<i>Crotalaria nitens</i> Kunt	582810	O. Rivera Díaz
<i>C. retusa</i> L.	582808	O. Rivera Díaz
<i>C. pallida</i> Aiton	582807	O. Rivera Díaz
<i>C. incana</i> L.	582806	O. Rivera Díaz

3.3. RECOLECCIÓN DE ORUGAS *U. ornatrix*

Se recolectaron entre 20 y 30 orugas de *U. ornatrix* entre los municipios de Girón y Betulia, sobre la vía San Vicente de Chucurí, con coordenadas 7°02'25,6" N 73°20'47.8"W. En el sitio de colecta, las orugas se dispusieron en un recipiente de plástico (32x28x16 cm) junto con algunas ramas de *Crotalaria* spp., y se transportaron al CENIVAM.

3.4. OBTENCIÓN DE HUEVOS DE *U. ornatrix* PARA EXPERIMENTOS.

Las orugas recolectadas de su entorno natural se utilizaron para obtener los huevos necesarios para los ensayos. Se alimentaron con hojas y semillas de las especies *C. retusa* y *C. nitens* mayormente disponibles en el jardín de CENIVAM.

El alimento se cambiaba diariamente, se hacía limpieza día por medio, hasta la etapa de crisálida. Las crisálidas se colocaron en un mariposario construido con una caja de cartón cubierta de tela tul (41 x 41 x 60 cm), como se puede observar en la **Figura 6**. En el mariposario se colocaron plantas de *C. retusa* y *C. nitens* (edad de 1 mes) para que las polillas colocaran los huevos debajo de sus hojas. Las hojas se revisaban diariamente; mientras, que las polillas se alimentaban con una solución acuosa de miel (5%), según la metodología de Martins y colaboradores(23). Los huevos que colocaron las polillas se emplearon para posteriores ensayos.

Figura 6. Mariposarios para cría de *U. ornatix*, (Foto: Jesus Alberto Zambrano Rodriguez. Fechas: 15 diciembre del 2016 y 2 de enero del 2017), CENIVAM, UIS, Bucaramanga.



3.5. ENSAYO PARA ALIMENTAR LAS ORUGAS *U. ornatix* CON HOJAS O SEMILLAS DE *Crotalaria* spp.

El suministro del alimento a *U. ornatix* se hizo separadamente con hojas o semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*, que se cultivaron en parcelas experimentales en el jardín del CENIVAM.

Tabla 3. Parte de la planta suministrada a las orugas de *U. ornatix*.

N° de tratamiento	Especie	Parte de la planta suministrada
1	<i>C. nitens</i>	Hoja
2		Semilla
3	<i>C. retusa</i>	Hoja
4		Semilla
5	<i>C. incana</i>	Hoja
6		Semilla
7	<i>C. pallida</i>	Hoja
8		Semilla

Se colocaron entre 30-60 huevos recolectados de las polillas *U. ornatix* de la **sección 3.3** por cada uno de los ocho tratamientos descritos en la

Tabla 3. Cuatro con hojas y cuatro con semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*. Los huevos recolectados para los ensayos se colocaron dentro de recipiente de un plástico de forma cilíndrica (22 x 10 cm), con la parte superior cubierta con la malla de tela tul.

En el caso de los ensayos con hojas, los huevos se colocaban sobre las hojas verdes de la especie correspondiente a cada tratamiento. Al emerger las orugas, iniciaban el proceso de alimentación en las hojas. El alimento de las orugas se cambiaba diariamente, colocando hojas frescas debajo de las hojas secas. Las orugas se trasladaban por su cuenta de las hojas viejas a las frescas; al día siguiente, se retiraban las hojas viejas y se colocaban frescas. En el caso del

tratamiento con semillas, se les suministraba una alimentación semiartificial durante la primera semana. La dieta consistió, en macerar las semillas frescas (1 g) de la especie correspondiente al tratamiento, con gelatina sin sabor (0,8 g). El macerado se colocaba en un tubo plástico (15 mL) y se le adicionaba agua caliente (5 mL). Se dejaba enfriar y se les suministraba diariamente a las orugas. A partir de la segunda semana, las orugas se alimentaron directamente de las semillas inmaduras sin la vaina. En la tercera semana, las orugas se alimentaban con vainas verdes abiertas; las orugas más grandes hacían un agujero para buscar las semillas, tal como sucede en condiciones naturales. A todos los tratamientos, se les realizaba limpieza del recipiente cada tres días. En la limpieza, se quitaban las hojas, semillas, gelatina sobrante, se lavaba el recipiente y se recolectaban los excrementos en recipientes plásticos de 50 mL, procurando que no se almacenara PA con otro tipo de partículas (hojas, semillas o suciedad) diferentes al excremento. Al formar la crisálida, se cambiaba del recipiente plástico a una caja de cartón (41 x 41 x 62 cm), con ventanas y cubierta de tela tul, como se observa en la **Figura 6**. Las polillas se alimentaban diariamente con una solución acuosa de miel (5%). La solución se dispersaba sobre la malla de tela tul de la parte superior de la caja, en forma de pequeñas gotas, donde las polillas se alimentaban fácilmente. La metodología empleada fue una modificación de la propuesta por Martins y colaboradores(23). Las polillas se mantuvieron en la caja hasta que las hembras pusieron los huevos. Para ello, se colocó una planta de *C. nitens*. Sin embargo, las polillas realizaron la postura de huevos, tanto en las hojas de la planta, como en la malla de tela tul de la cubierta de la caja.

3.6. COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PA EN HOJAS Y SEMILLAS DE *Crotalaria* spp. Y EN *U. ornatix* EN SUS DIFERENTES ESTADOS USANDO GC-MS Y LC-Orbitrap-MS.

Se implementó el método de extracción de PA y PANO presentes en hojas y semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. pallida*, además en *U. ornatix* en sus diferentes estados usando MSPD. Los alcaloides (PA y PANO) se identificaron de manera tentativa usando información complementaria obtenida tanto por LC-Orbitrap-MS, como por GC-MS. En LC-MS, se determinó la presencia de los PA y PANO mediante la generación de la fórmula molecular a partir de la masa exacta de las especies protonadas $[M+H]^+$, además se estudiaron los patrones de fragmentación de los espectros de masas. Para GC-MS, los criterios fueron la comparación de los índices de retención lineales (IRL) de los PA con los encontrados en la literatura [61] y la comparación de los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos (NIST y Wiley) y en algunos casos con las sustancias de referencia. Los PA y PANO para la identificación se extrajeron directamente de hojas, semillas o el insecto en los diferentes estados de desarrollo usando MSPD. Para el análisis de los alcaloides usando GC-MS, los PANO se convirtieron a PA por reducción con Zn en polvo en medio ácido.

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE PA USANDO MSPD

La estandarización del método de extracción MSPD se realizó en una matriz homogeneizada de hojas de *C. nitens*. Se probaron tres tipos de soportes sólidos, *i.e.*, arena, florisil o gel de sílice modificada con C₁₈. Se variaron dos tipos de solventes de extracción: metanol o metanol acidificado con ácido fórmico (2%) para evaluar si la protonación de los PA y PANO mejoraba el proceso de extracción. La variable de respuesta fue la recuperación de retrorsina, un alcaloide pirrolizidínico que no está presente en las hojas de *C. nitens*.

Se tomaron hojas frescas de *C. nitens* (200 g) de plantas del jardín de CENIVAM. Se trituraron en nitrógeno líquido y se liofilizaron para preservar la muestra. Las hojas trituradas y secas se molieron hasta homogeneización. Se tomaron muestras de hojas (50 mg), se adicionó la retrorsina (200 µL, 99,5 µg/mL en metanol). La mezcla se homogeneizó en el mortero para incorporar el estándar en la matriz. Se adicionó el soporte sólido en relación 1:4 (200 mg) y 2-propanol (200 µL). Se maceró y el polvo fino se transfirió a una columna MSPD (5 mL) que contenía un filtro de algodón en el fondo. Se realizó la elución con el solvente (5 mL). Se tomó una alícuota de extracto (50 µL) y se llevó a 1 mL con fase móvil (9:1 agua:acetonitrilo con 0,2% de ácido fórmico. La solución se filtró (0,22 µL) y se analizó por LC-MS (**Figura 7**).

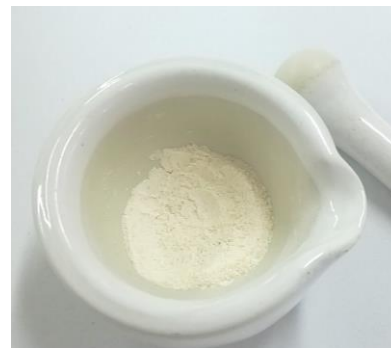
Figura 7. Proceso para determinar la eficiencia de extracción de los PA usando MSPD a partir de hojas de *Crotalaria nitens*.



Trituración de
hojas de
C. nitens con N₂
líquido



Muestra con el
estándar de retrorsina
incorporado. Adición
de soporte sólido y 2-
propanol



Muestra
homogeneizada y lista
para la extracción en
columna MSPD.



Elución con el
solvente de
extracción



Alícuota, aforo a
1 mL. Análisis
LC-MS

Para determinar la recuperación de retrorsina en el proceso de extracción, se preparó una solución patrón de concentración final igual a la esperada en la muestra (199 µg/L), así; se tomó una alícuota (200 µL, 99,5 µg/mL), se diluyó en metanol acidulado al 2% con ácido fórmico (5 mL) para simular el proceso de extracción en la muestra real, se tomó una alícuota (50 µL) y se aforó a 1 mL con

una solución 9:1 agua:acetonitrilo con 0,2% de ácido fórmico, se filtró y se analizó por LC-MS, bajo las mismas condiciones que las muestras. La solución patrón se inyectó por triplicado.

Se calculó el porcentaje de recuperación con la relación de áreas entre la retrorsina extraída de las muestras, que se esperaba de 199 µg/L y la retrorsina del patrón, así:

$$\%Rec = \frac{\text{Área retrorsina extraída de la muestra}}{\text{Área retrorsina patrón, 199 µg/L}} * 100$$

Extracción de PA para identificación usando GC-MS y LC-MS: las orugas y las polillas se sacrificaron, usando nitrógeno líquido. Se tomaron semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana*, *C. pallida*, orugas y polillas de los ocho tratamientos (Véase **Figura 7**). Los PA y PANO se extrajeron usando MSPD. Se tomó la muestra (1 g) en relación 1:4 con el soporte sólido (sílice modificada con C₁₈). Se maceró hasta obtener un polvo fino. Se colocó en una jeringa (20 mL) y se eluyó con MeOH con 2% de ácido fórmico (15 mL). Para el análisis por LC-Orbitrap-MS, se tomó una alícuota (30 µL) y se llevó a 1 mL con una solución H₂O:ACN 9:1 (v/v) con 0,2 % de ácido fórmico; se filtró (0,22 µm). Para el análisis GC-MS, los PANO se redujeron a PA con Zn metálico en polvo en medio ácido. El extracto se llevó hasta la sequedad, usando el rotoevaporador (*Heidolph*, Schwabach, Alemania) y N₂ gaseoso. El extracto se redisolvió en una solución acuosa de HCl (10 mL, 2,5%), se adicionó Zn metálico (200 mg) y se agitó durante 2 horas para reducir los PANO a PA. Se limpió el extracto con hexano (3 x 10 mL). Se adicionó una

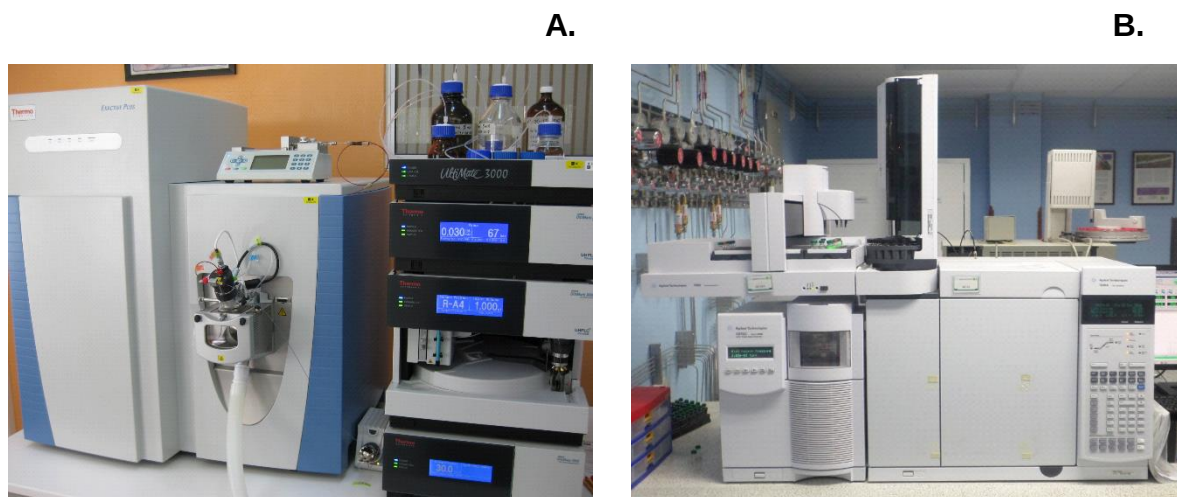
solución acuosa de NH_4OH (ca. 1 mL, 28% hasta pH 10) y se agitó. Los PA se extrajeron con diclorometano (3 x 5 mL). Se tomó una alícuota (30 μL), se llevó a sequedad y se redisolvió en 1 mL de una solución $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ 9:1 (v/v) con 0,2 % de ácido fórmico, se filtró (0,22 μm) y se analizó por LC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS. El extracto remanente se llevó hasta la sequedad, se redisolvió en metanol (1 mL) y se filtró (0,22 μm) para su análisis por GC-MS.

Condiciones LC-*Orbitrap*-MS: Para el análisis de las muestras, se usó un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC) *Dionex™ UltiMate™ 3000* (*Thermo Scientific*, Germering, Alemania), equipado con un degasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG-3400RS), un inyector automático (WPS-300TRS) y una unidad termostatada para la columna (TCC-3000RS). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna *Hypersil GOLD™ aQ* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.) de 100 x 2.1 mm d.i., 1.9 μm de tamaño de partícula. La unidad termostatada se mantuvo a 30 °C. La fase móvil fue ácido fórmico al 0,2 % en agua (A) y ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo (B). La condición inicial de gradiente fue así: 100% de A cambiando linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante durante 4 min, se regresó a 100% A en 1 min y se mantuvo en equilibrio durante 3 min. Los flujos fueron de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el volumen de inyección fue de 1 μL . El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas *Orbitrap™ Exactive Plus* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) a través de una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), operada en modo positivo, a 350 °C. El nitrógeno (>99%) para la HESI-II se obtuvo de un generador

NM32LA (*Peak Scientific*, Scotland, Reino Unido). La temperatura del capilar fue de 320 °C y el voltaje del nebulizador fue de 3,5 kV. Los flujos de nitrógeno usados como gas *sheath* y gas auxiliar se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. La resolución del detector de masas *Orbitrap*, para el modo de barrido completo (*Full MS Scan*), se ajustó a 70000 (*Full-Width-at-Half-Maximum*, a m/z 200, R_{FWHM}), usando un control de ganancia automático (AGC) de 3×10^6 y un tiempo de inyección en la cámara *C-trap* de 200 ms. Para estudiar los patrones de identificación, los iones se enviaron a la celda de colisiones HCD (*High-Energy Collisional Dissociation*) usando a diferentes energías (20, 30, 40 y 50 eV) en el modo de barrido por pasos (*Stepped Scan*). Los espectros de masas se registraron en el modo AIF (*All-Ion Fragmentation*) para cada energía de colisión, a una resolución R_{FWHM} de 35 000, usando un AGC de 3×10^6 y un tiempo de inyección en la cámara *C-trap* de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de m/z 80–1000. Antes de la adquisición, el detector *Orbitrap* se calibró en modo positivo con una solución de referencia, preparada en el laboratorio, que contenía *n*-butilamina, dodecilsulfato de sodio, taurocolato de sodio hidratado, cafeína, acetato de Met-Arg-Phe-Ala y una solución estándar *Ultramark*TM 1621 *Mass Spec*. La solución de calibración se preparó en acetonitrilo:metanol:agua con de ácido acético (1%), siguiendo el procedimiento descrito en el manual de operaciones del *Orbitrap*TM *Exactive Plus* (*Thermo Fisher Scientific*, P/N 1323060, Revision A, 2012). Los datos obtenidos se analizaron con el software *Thermo Xcalibur V3.1* (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE.UU.).

Condiciones de GC-MS: El análisis cromatográfico de los extractos por GC-MS se realizó en un equipo GC *Agilent Technologies* 6890 Plus (Palo Alto, California, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5973 Network. La separación se llevó a cabo en una columna con fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm d_i; empleando helio (99,995 %; Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre. La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C, modo de inyección *split* (1:30).

Figura 8. Equipos analíticos utilizados para la determinación en los PA de los extractos obtenidos de *Crotalaria* spp y *U. ornatix* en sus diferentes estados. A. UHPLC-Orbitrap-MS y B. GC-MS. Foto: Jesus A. Zambrano Rodriguez. Fecha: 21 de noviembre de 2017. Lugar: CENIVAM, UIS, Bucaramanga.



La temperatura del horno se programó de 45 a 150 °C, a 4 °C/min, se aumentó a 250 °C (5 min), a 5 °C/min, y, luego, a 275 °C (15 min), a 10 °C/min. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV.

3.7. CONTENIDO DE PA EN EL ALIMENTO (HOJAS Y SEMILLAS DE *Crotalaria* spp.) Y EN *U. ORNATRIX* EN SUS DIFERENTES ESTADOS USANDO LC-Orbitrap-MS.

Se determinó la eficiencia de extracción de los PA y PANO en tejido vegetal de *Crotalaria nitens* usando MSPD y posteriormente se aplicó el método para la extracción y cuantificación de los PA y PANO en hojas y semillas de *Crotalaria* spp. y en la *U. ornatrix* en diferentes estados (oruga, polilla y huevos), así como en el excremento de la oruga, usando MSPD-LC-Orbitrap-MS.

Muestreo y cuantificación de PA en alimento y *U. ornatrix* en diferentes estados: se realizaron tres muestreos por triplicado en hojas y semillas durante la vida de la oruga (al inicio, durante el desarrollo y antes de convertirse en crisálida), para estimar el contenido de alcaloides promedio presente en el alimento suministrado. Se tomaron muestras por triplicado de las orugas antes de alcanzar la crisálida. Se tomaron entre cinco y seis orugas y se determinó el peso total y promedio de cada oruga. En estado adulto (polilla), se muestrearon por triplicado entre tres y seis polillas en dos estados: antes de la postura de huevos y después o al momento de morir, se registró el peso total y el peso promedio de cada polilla. Se realizó muestreo por duplicado de huevos, se tomaron entre 100 y 300 huevos por muestra, se registró el peso total y el promedio por huevo. Las muestras de

excremento, por triplicado, se tomaron de la acumulación durante toda la vida de la oruga. El resumen de las muestras tomadas se presenta en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Esquema de muestreo de alimento (hojas y semillas de *Crotalaria* spp.) y *U. ornatix* (oruga, polilla, huevo, excremento).

Nº de Tratamiento	Especie	Parte de la planta	Nº de muestras				
			Alimento ¹	Oruga ²	Polilla ³	Huevo ⁴	Excremento ²
1	C. nitens	Hoja	9	3	6	2	3
2		Semilla	9	3	6	2	3
3	C. retusa	Hoja	9	3	6	2	3
4		Semilla	9	3	6	2	3
5	C. incana	Hoja	9	3	6	2	3
6		Semilla	9	3	6	2	3
7	C. pallida	Hoja	9	3	6	2	3
8		Semilla	9	3	6	2	3
Subtotal			72	24	48	16	24
Total			174				

¹ Durante el desarrollo de la oruga se realizaron tres muestreos por triplicado. Al comienzo, en el intermedio y al final del ciclo de la oruga

² Triplicado de muestras

³ Se tomarán polillas jóvenes (por triplicado) y adultas (por triplicado)

⁴ Duplicado de muestras

Las orugas y polillas se colocaban en nitrógeno líquido (Linde, Bucaramanga, Colombia) y se maceraron hasta convertirlas en polvo. Los PA de las muestras maceradas de hojas, semillas de *Crotalaria* spp., orugas, excremento, polillas y huevos se extrajeron usando MSPD. En el caso de hojas, semillas, oruga,

excremento y polilla se tomó la muestra (100 mg) y se mezcló con el soporte sólido en relación 1:6 (sílice modificada con C₁₈, 600 mg).

Para la cuantificación de los PA y PANO se usó el factor de respuesta de la curva de calibración de la monocrotalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), uno de los alcaloides más comunes en *Crotalaria* spp. Se preparó una solución patrón de 550 mg/L en metanol. Se tomó una alícuota (50 µL) y se dosó en metanol (10 mL) para obtener la solución de 2,8 mg/L. Se tomaron alícuotas de 4, 20, 40, 80 y 200 µL y se aforaron (1 mL) con solución H₂O:ACN 9:1 (v/v) con 0,2 % de ácido fórmico para obtener cinco puntos de 11, 55, 110, 220 y 550 µg/L. La curva de calibración se inyectó en el LC-MS bajo las mismas condiciones que las muestras. Para diferentes días de análisis, se corroboró el factor de respuesta de la curva de calibración con la inyección del patrón de 110 µg/L por duplicado al comienzo de la corrida y luego cada 20 muestras. El contenido total de alcaloides PA o PANO (mg/g de muestra) se expresó como equivalentes de monocrotalina basados en la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de PA/PANO (mg/g)} = \frac{A_x - b}{m_{\text{monocrotalina}}} V_{\text{final}} * \frac{V_{\text{extracción}}}{V_{\text{alícuota}}} * \frac{1}{P_{\text{muestra}}} * F$$

Donde:

A_x: Área del alcaloide (PA o PANO) en el extracto.

b: intercepto en la curva de calibración de la monocrotalina.

m: pendiente de la curva de calibración de la monocrotalina.

V_{final}: Volumen (L) de aforo de la solución final (normalmente 1 mL).

$V_{\text{extracción}}$: Volumen final (mL) de la extracción MSPD (normalmente 5 mL).

$V_{\text{alícuota}}$: Volumen de alícuota (mL) tomada del extracto MSPD para análisis LC-MS.

P_{muestra} : Peso de la muestra (mg).

F: Factor de recuperación de la extracción MSPD.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Más del 50% de las orugas recolectadas en campo estaban parasitadas y murieron antes de convertirse en crisálidas. Sin embargo, las polillas restantes fueron suficientes para obtener la cantidad de huevos de los experimentos y mantener una colonia estable. Las orugas criadas en condiciones de laboratorio no presentaron parasitismo. Una vez las orugas eclosionaban de los huevos buscaron su alimento de manera constante. Bajo las condiciones del experimento, las orugas tenían tiempos similares, en el ciclo de vida. Las orugas que eclosionaban el mismo día, cambiaban de instar y formaban la crisálida en tiempos parecidos. Se observó que cuando las polillas salían de la crisálida, no se reproducían inmediatamente, sino que permanecían calmadas en los primeros tres días y después se volvían más activas. El apareamiento ocurría entre 7–10 días después de emerger de la crisálida. El porcentaje de mortalidad de orugas y polillas criadas en condiciones de laboratorio fue menor que 10%.

4.1. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN MSPD

La mayor recuperación de retrorsina se encontró con sílice- C_{18} , como soporte sólido, y solvente de elución MeOH y MeOH-acidulado, 79 y 84%, respectivamente. La arena y el fluorisil presentaron % de recuperación menores de 80%. El porcentaje de recuperación (84%) mayor y la dispersión (± 2) menor se observó cuando se usó como soporte sólido sílice- C_{18} y se eluyó con metanol acidificado con ácido fórmico. (Véase **Tabla 5**). El soporte sólido y el solvente de elución que se emplearon para la extracción de PA y PANO en hojas y semillas de

Crotalaria spp. y *U. ornatix* en sus diferentes estados, fueron sílice-C₁₈ y metanol acidificado ácido fórmico (2%), respectivamente, por poseer el mayor porcentaje de recuperación, la menor dispersión y porque el ácido fórmico está presente en la fase móvil para protonar los alcaloides.

Tabla 5. Recuperación de retrorsina usando MSPD con diferentes soportes sólidos y solventes de extracción. Valores promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Los valores con diferente letra presentan diferencias significativas. ANOVA, prueba de comparación de medias, Diferencias Mínimas Significativas (DMS), $p < 0,05$.

Soporte	Solvente de extracción	% Recuperación retrorsina	
Arena	MeOH	50 $\pm$ 10	d
	MeOH con 2% de AF	64 $\pm$ 2	c
Sílice modificada con C ₁₈	MeOH	79 $\pm$ 4	ab
	MeOH con 2% de AF	84 $\pm$ 2	a
Florisil	MeOH	72 $\pm$ 5	bc
	MeOH con 2% de AF	44 $\pm$ 4	d

4.2. IDENTIFICACIÓN TENTATIVA DE PA Y PANO.

La identificación de los PA se realizó mediante la comparación de sus espectros de masas (GC-MS, EI, 70 eV) con los de la literatura (61) y los estándares de monocrotalina y retrorcina, también, por comparación de los índices de retención lineal (IRL) con los de la literatura (61), análisis de los espectros de masas

obtenidos por LC-*Orbitrap*-MS (HCD, a diferentes energías) y los patrones de fragmentación de los espectros de masas de LC-MS, determinación de la fórmula molecular, usando las masas exactas experimentales de los iones (Véase **Tabla 6**).

En la **Figuras 9 y 10**, se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por LC-MS, de los extractos MSPD de las hojas de *C. nitens* y de la *U. ornatrix* en sus diferentes estados (orugas, polillas y huevos). Se observó, que los principales alcaloides fueron los mismos en el alimento y en *U. ornatrix*. Sin embargo, las polillas y los huevos presentaron unos picos pequeños que corresponden a la creatonotina A y la callimorfina.

Tabla 6. Los PA y PANO tentativamente identificados en hojas, semillas y *U. ornatix* (polilla, huevo y oruga), usando LC-Orbitrap-MS y GC-MS. Los espectros LC-MS se encuentran en los **Anexos A–S**.

N°	t _R , min	Compuesto	Fórmula	[M+H] ⁺		Δ ppm	Energía HCD*, eV	Iones característico experimentales (% de abundancia relativa)	IRL**		Modo de identificación
				Calc.	Exp.				Exp	Lit [23]	
1	1,0	Retronecina	C ₈ H ₁₃ NO ₂	156,10191	156,10192	0,05	30	156,10192(80), 138,09187 (13), 126,09148 (10), 112,07620 (50), 96,08138 (27), 94,06561 (88), 93,05782 (42), 91,05475 (28), 86,06073 (47), 82,06564 (100)	1489	1487	a, b, c
2	1,0	N.I.	C ₇ H ₇ NO ₂	138,05496	138,05478	1,27	30	138,05478 (34), 110,06023 (96), 96,04475 (49), 94,06566 (100), 93,05786 (26), 92,04985 (27), 85,02904 (13)			a
3	1,0	N.I.	C ₈ H ₁₅ NO ₂	158,11756	158,11729	1,70	50	158,11729 (100), 124,07600 (20), 108,08109 (79), 98,06068 (20), 94,06572 (11), 91,05504 (21), 84,08136 (18), 82,06538 (39)			a
4	1,2	Retronecina N-óxido	C ₈ H ₁₃ NO ₃	172,09682	172,09701	1,10	30	172,09701 (100), 155,09413 (4), 111,06816 (47), 106,06567 (10), 94,06572 (25)			a
5	1,4	N.I.	C ₈ H ₁₅ NO	142,12264	142,1228	1,14	50	142,1228 (54), 124,1128 (9), 108,0811 (58), 96,08133 (20), 94,06599 (14), 91,05508 (10), 83,07399(16), 82,06587 (100)			a
6	3,0	Monocrotalina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	326,15981	326,15963	0,55	40	326,15963 (9), 194,11778 (18), 138,09167 (15), 120,08124 (100), 94,06551 (47)	2373	2388	a, b, c
7	3,2	Creatonotina A N-óxido	C ₁₃ H ₂₂ NO ₅	272,14925	272,14923	0,0067	30	272,14922 (59), 172,09671 (53), 154,08655 (9), 138,09120 (100), 136,07556 (23), 111,06831 (13), 108,08102 (6), 94,06578 (54), 93,05800 (31), 90,94791 (6), 80,05000 (7),			a

Tabla 6. Continuación

8	3,2	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	C ₁₆ H ₂₃ NO ₇	342,15473	342,15363	1,10	40	342,15363 (100), 236,12886 (18), 157,08591 (11), 137,08350 (56), 136,07588 (30), 120,08113 (36), 119,07336 (41), 108,08086 (15), 94,06440 (24)			a
9	3,4	<i>iso</i> -Creatonotina B <i>N</i> -óxido	C ₁₄ H ₂₄ NO ₅	286,16490	286,16522	1,13	30	286,16368 (8), 172,09659 (33), 138,09111 (6), 111,06825 (10), 106,06535 (12), 93,03709 (76), 92,05328 (100), 80,04997 (6)			a
10	3,5	Creatonotina B	C ₁₄ H ₂₄ NO ₄	270,16998	270,17020	0,78	20	270,16957 (100), 156,10388 (7), 138,09137 (40), 120,08064 (18), 94,06546 (80), 92,05301 (10)	2058	2048	a, b
11	3,5	N.I.	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17062	368,17024	0,38	50	368,17024 (65), 136,07549 (39), 120,08151 (68), 118,06541 (61), 106,06548 (21), 94,06543 (100)			a
12	3,7	Crispatina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	310,16490	310,16528	1,23	30	310,16469 (10), 282,16469 (5), 156,10219 (24), 138,08121 (25), 94,06572 (100)	2220	2231	a, b
13	3,7	Creatonotina B <i>N</i> - óxido	C ₁₄ H ₂₄ NO ₅	286,16490	286,16522	1,13	30	286,16541 (100), 172,09633 (30), 154,08623 (7), 138,09169 (83), 136,07605 (21), 111,06812 (7), 94,06563 (43), 93,05785 (29), 80,04988 (4)			a
14	3,9	Usaramina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	352,17706	1,60	50	352,17706 (12), 220,13454 (8), 138,09166 (45), 120,08154 (97), 108,08153 (27), 96,08154 (44), 94,06575 (100)	2683	2673	a, b
15	3,9	Usaramina <i>N</i> -óxido	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17038	368,16972	1,78	50	368,16972 (100), 138,09109 (11), 136,07538 (45), 120,08043 (65), 118,06534 (62), 94,06538 (95)			a

Tabla 6. Continuación

16	3,9	Retusina <i>N</i> -óxido	C ₁₆ H ₂₅ NO ₆	328,17546	328,17435	1,11	50	328,17435 (59), 154,08658 (39), 140,10680 (54), 138,09160 (34), 122,0963 (96), 120,08102 (100), 108,08121 (14), 96,08092 (23)	a
17	3,9	Crispatina <i>N</i> -óxido	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	326,15981	326,15984	0,06	50	326,15984 (100), 298,16364 (1), 136,07610 (50), 120,08118 (69), 94,06570 (75), 93,05789 (39)	a
18	4,0	Integerrimina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	336,18055	336,18173	1,18	40	336,18173 (36), 308,18610 (23), 220,13392 (5), 138,09164 (65), 120,08121 (100), 94,06549 (71)	2435 2451 a, b
19	4,1	Integerrimina <i>N</i> -óxido	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	352,17505	0,41	50	352,17505 (50), 136,070608 (47), 120,08101 (68), 118,0653 (64), 106,06538 (22), 94,06580 (100)	a
20	4,2	Callimorfina <i>N</i> -óxido	C ₁₅ H ₂₄ NO ₆	314,15981	314,15991	0,31	30	314,16138 (57), 254,13992 (100), 154,08650 (53), 138,09193 (61), 136,07628 (47), 126,09172 (9), 118,06545 (7), 112,07605 (9), 108,08101 (8), 94,06578 (24), 93,05798 (45), 80,05034 (5)	a

* Cámara de colisiones activadas ** Índices de retención lineales (IRL).

Modo de identificación: a – Masa exacta de la molécula protonada y espectro de masas LC-*Orbitrap*-MS; b –

Comparación del espectro de masas con el de la base de datos (GC-MS. NIST, versión 2014) e IRL con la literatura (Martins, *et al.*, 2015), c – sustancias de referencia.

Figura 9. Perfiles cromatográficos obtenidos de los PA y PANO protonados $[M+H]^+$ presentes en los extractos de las hojas de *C. nitens* y *U. ornatix* (orugas) obtenidos por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS. Véase identificación en la **Tabla 6**.

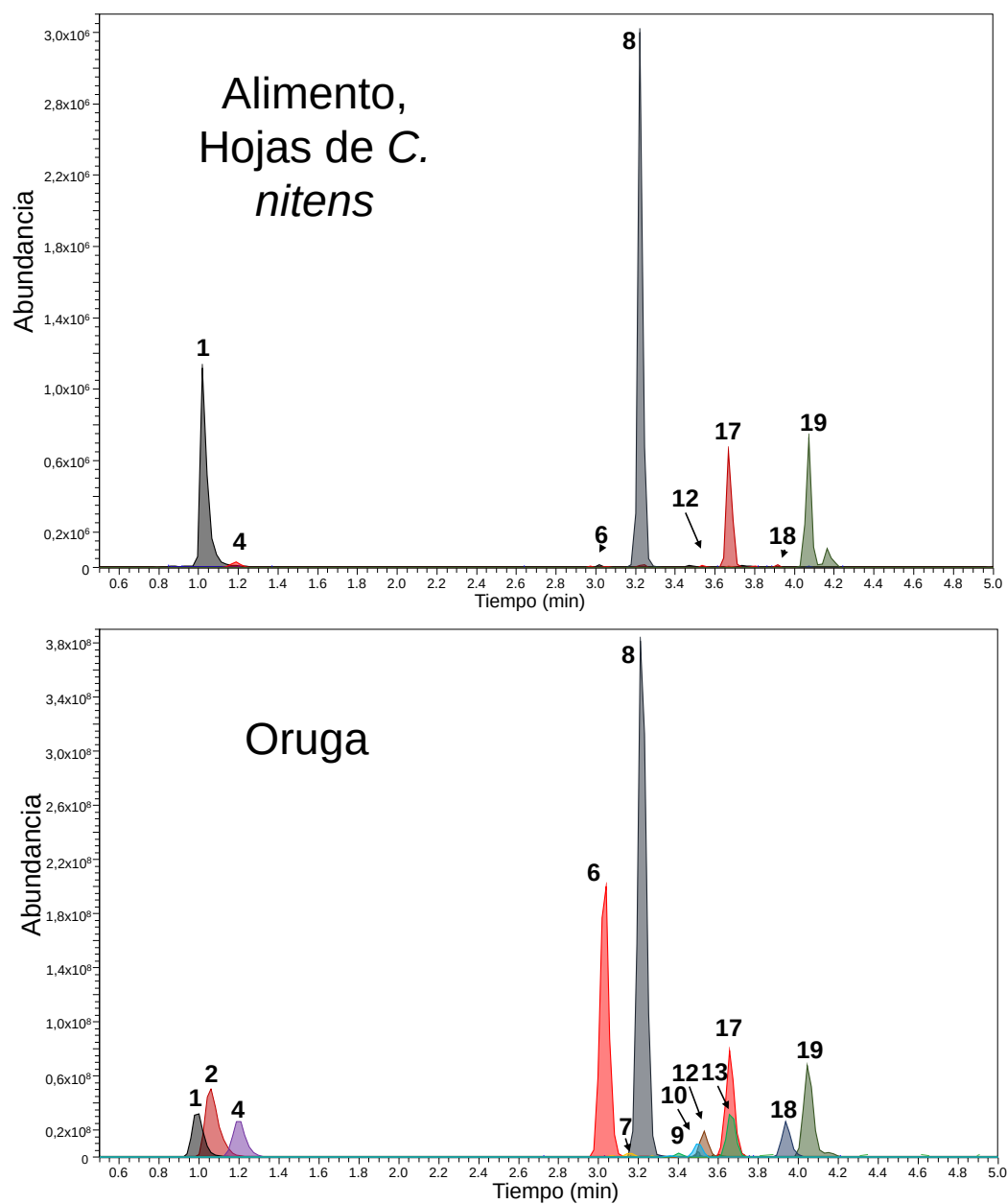
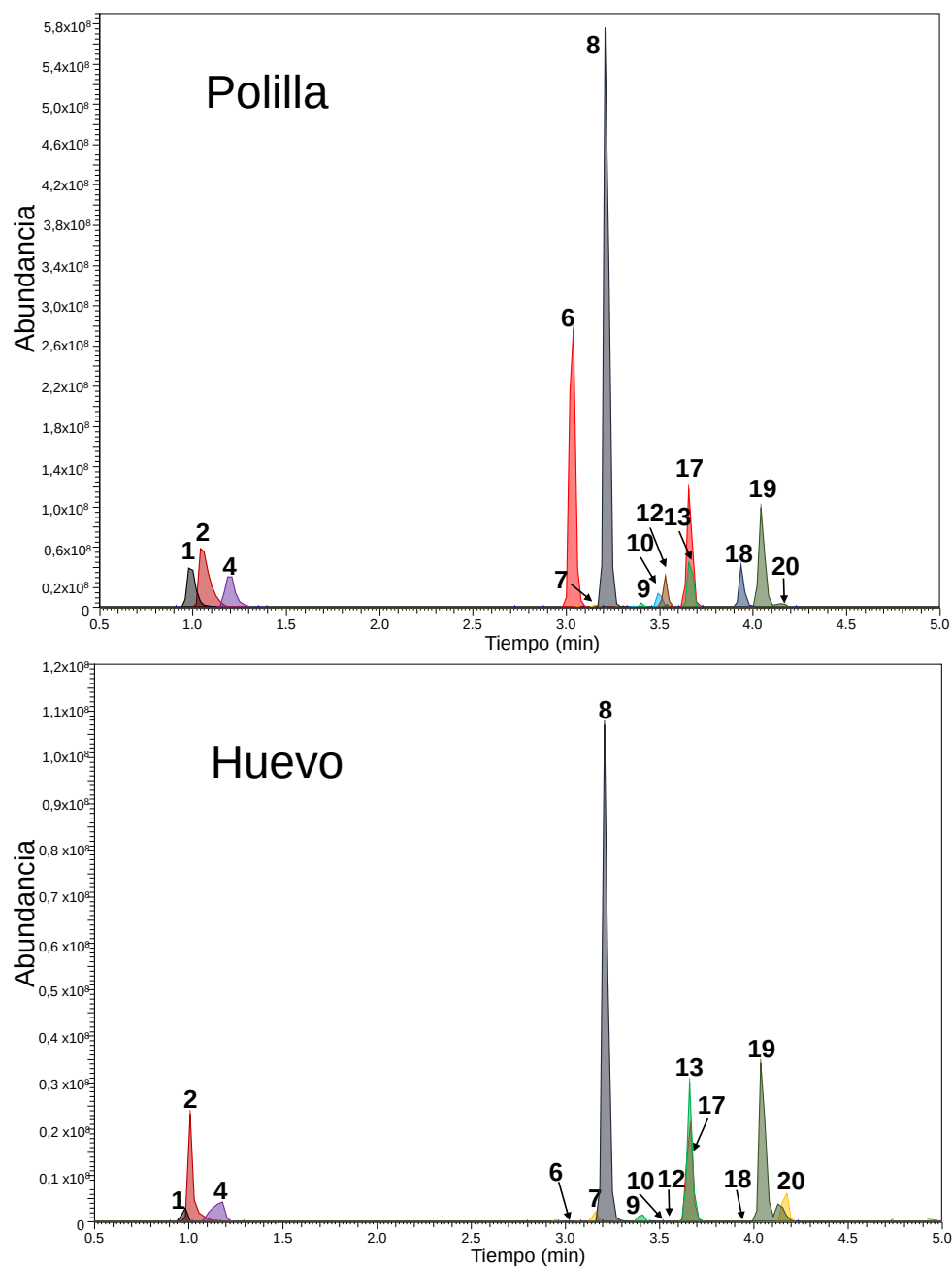


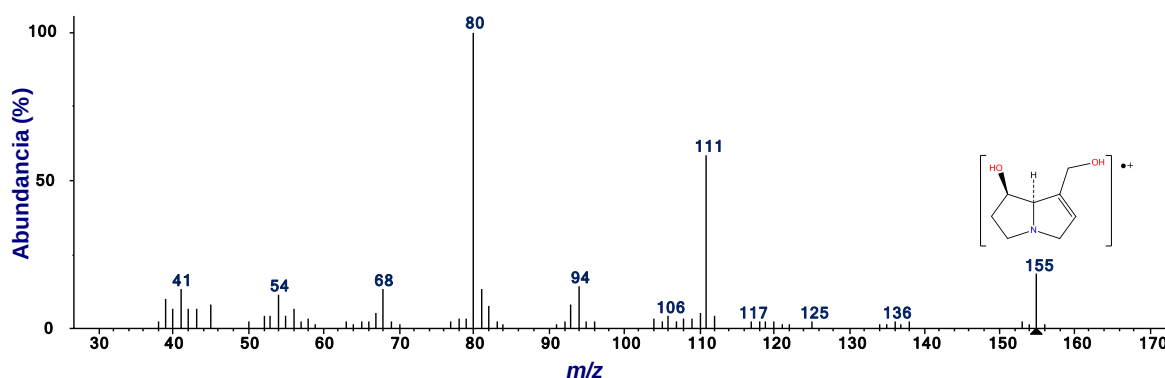
Figura 10. Perfiles cromatográficos obtenidos de los PA y PANO protonados $[M+H]^+$ presentes en los extractos de *U. ornatix* (polillas y huevos) obtenidos por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS. Véase identificación en la Véase identificación en la **Tabla 6**.



4.2.1. Patrones de fragmentación en GC-MS. Se hizo el análisis del patrón de fragmentación para espectros de algunas sustancias, *i. e.*, retronecina, monocrotalina y retrorsina y se compararon con los reportados en las bases de datos de NIST o Wiley (EI, 70 eV).

Retronecina. En la **Figura 11**, se muestra el espectro de masas de la retronecina obtenido por EI (70 eV), se observan los iones característicos son: m/z 155, 111 y en 80, que es el ion pico de base.

Figura 11. Espectro de masas (EI, 70 eV), de la retronecina.

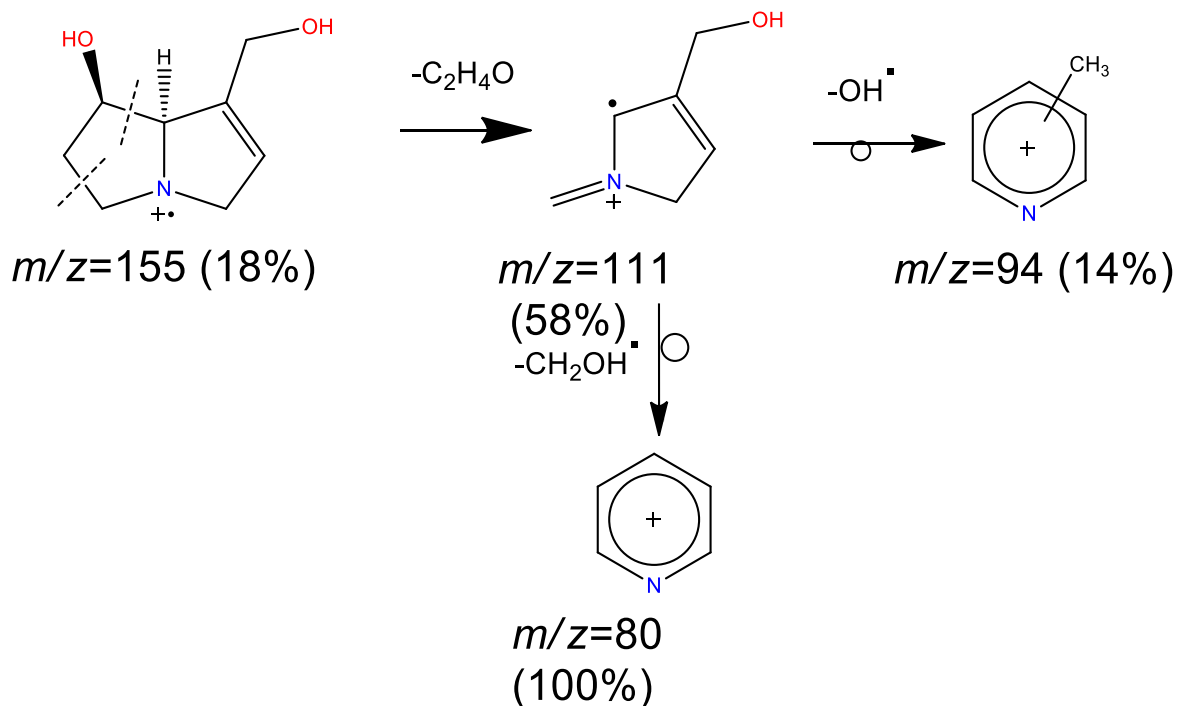


Tomado de la base de datos NIST MS. Versión 2008 (61).

En la **Figura 12**, se muestra el patrón de fragmentación de la retronecina, propuesto por Neuner-Jehle *et al.* (62). El ion m/z 111 se forma a partir del ion molecular mediante una reorganización del ciclo de pirrolizidina. El ion m/z 94 surge partiendo de una ruptura simple del ion m/z 111 en el cual se desprende un radical $\text{OH}^\cdot$, el ion biradicalario que se forma es altamente inestable. Por esta razón se reorganiza rápidamente para formar una especie cíclica más estable. El

ion m/z 80 se forma de la ruptura simple en el ion m/z 111. No obstante, en este caso se desprende un radical $\text{CH}_2\text{OH}^\bullet$; una reorganización conduce al ion más estable.

Figura 12. Patrón de fragmentación de retronecina. EI, 70 eV.

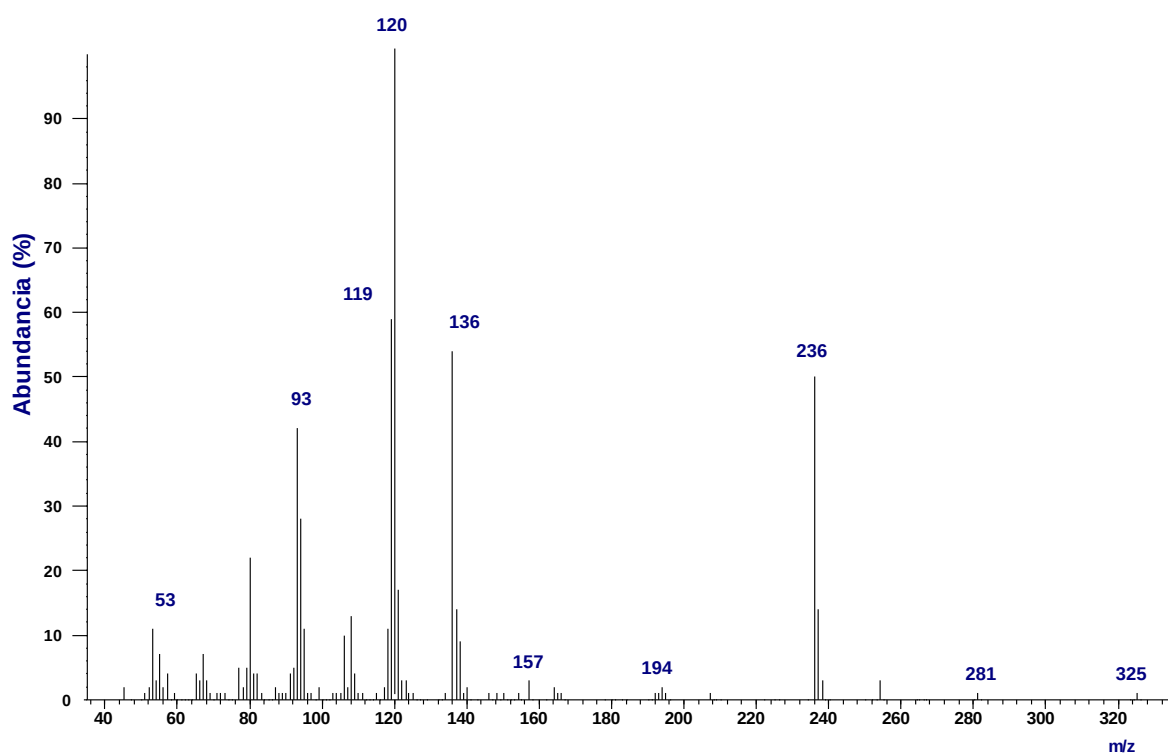


Tomado con modificaciones de [62].

Monocrotalina. En la **Figura 13**, se muestra el espectro de masas de la monocrotalina obtenido por EI, 70 eV. Los picos de los iones característicos aparecen en: m/z 325, 236, 136, 120, 93 y en 80. El ion, pico de base, se registra en m/z 120.

En la **Figura 14**, se muestra el patrón de fragmentación de la monocrotalina propuesto por N. Neuner-Jehle *et al.* (62).

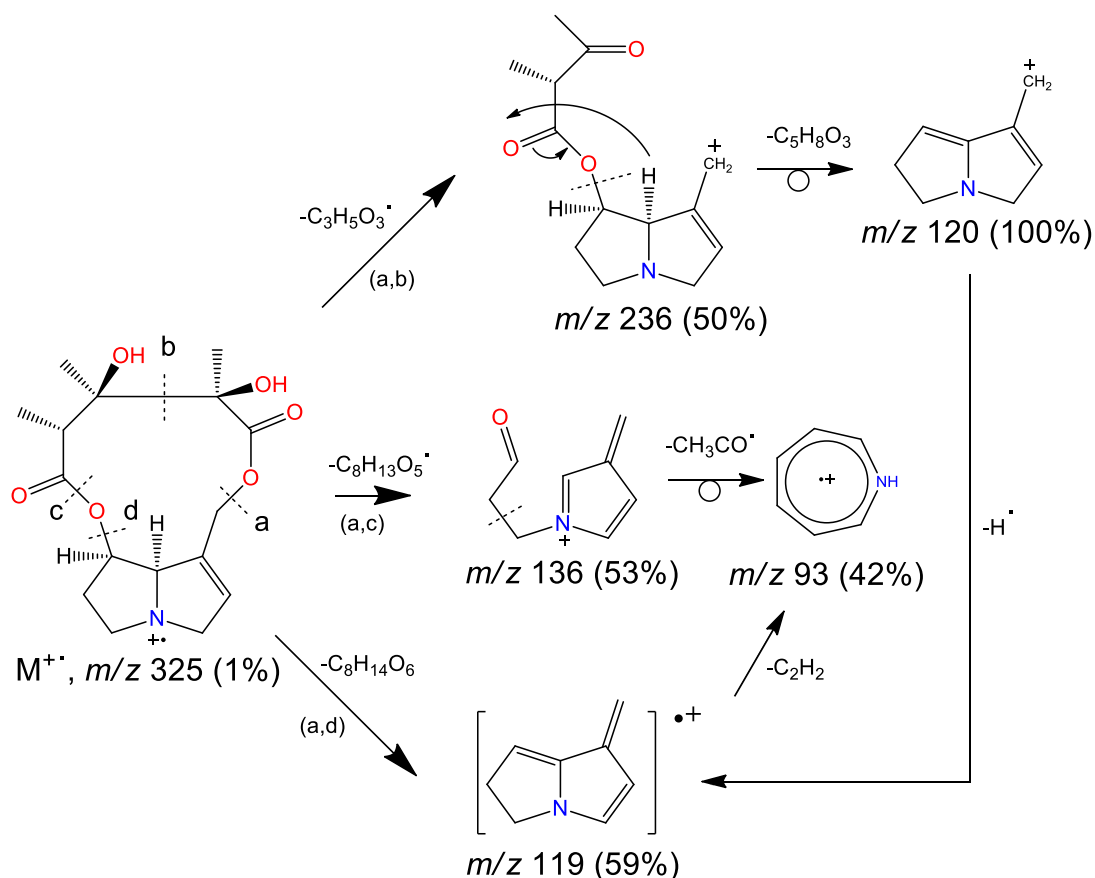
Figura 13. Espectro de masas (EI, 70 eV), obtenido por GC-MS (*Full Scan*) del patrón de monocrotalina.



El ion en m/z 236 surge a partir del ion molecular mediante una ruptura simple del ciclo entre el carbono 9 y el oxígeno, seguida de una transposición de hidrógeno, este rearrreglo puede ocurrir con el enlace OH o CH de la posición ϵ .

El ion m/z 120 surge a partir del ion m/z 236 producto de un rearrreglo McLafferty. El ion m/z 120 posee una estructura bicíclica y con dos enlaces insaturados lo que confiere alta estabilidad y es por ello que es el ion más intenso.

Figura 14. Patrón de fragmentación de la monocrotalina. EI, 70 eV.

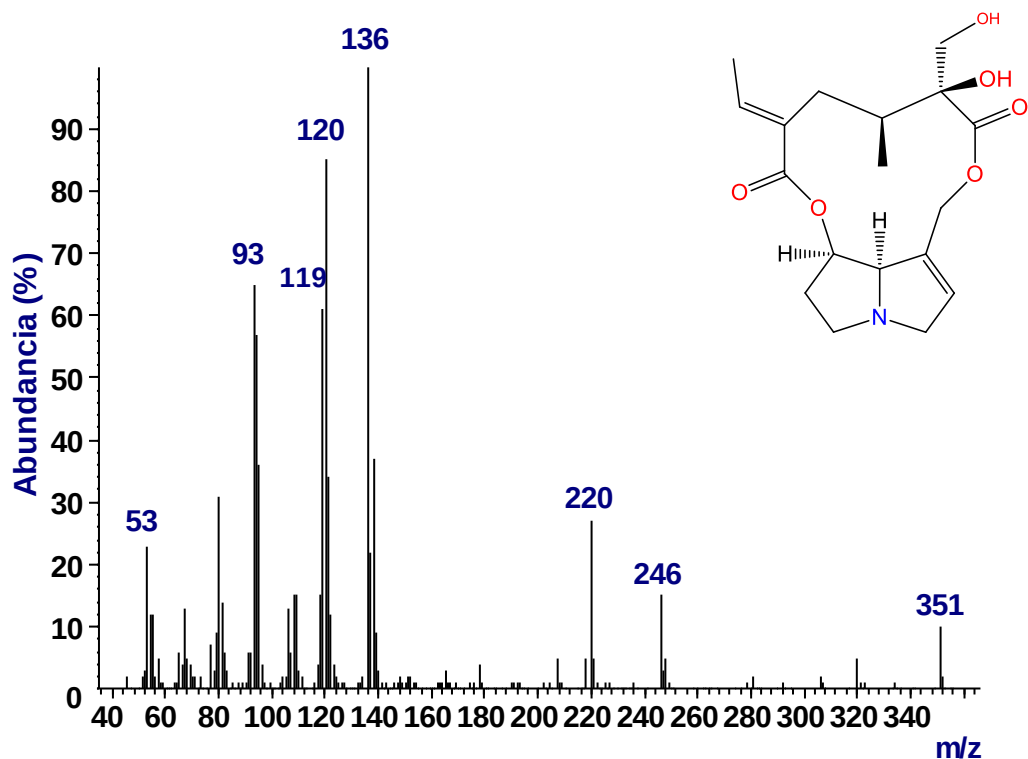


Tomado, con algunas modificaciones (62).

El ion en m/z 136, surge a partir del ion molecular, mediante la ruptura del anillo de pirrolizidina, seguida de un rearrreglo con transferencia protón. El ion m/z 93, se produce de una ruptura simple del ion m/z 136, entre el carbono 5 y 6, seguida de un reordenamiento para dar lugar a un ion que es posiblemente el más estable. Finalmente, el ion m/z 119, proviene de una doble transferencia de protón en la estructura del ion molecular.

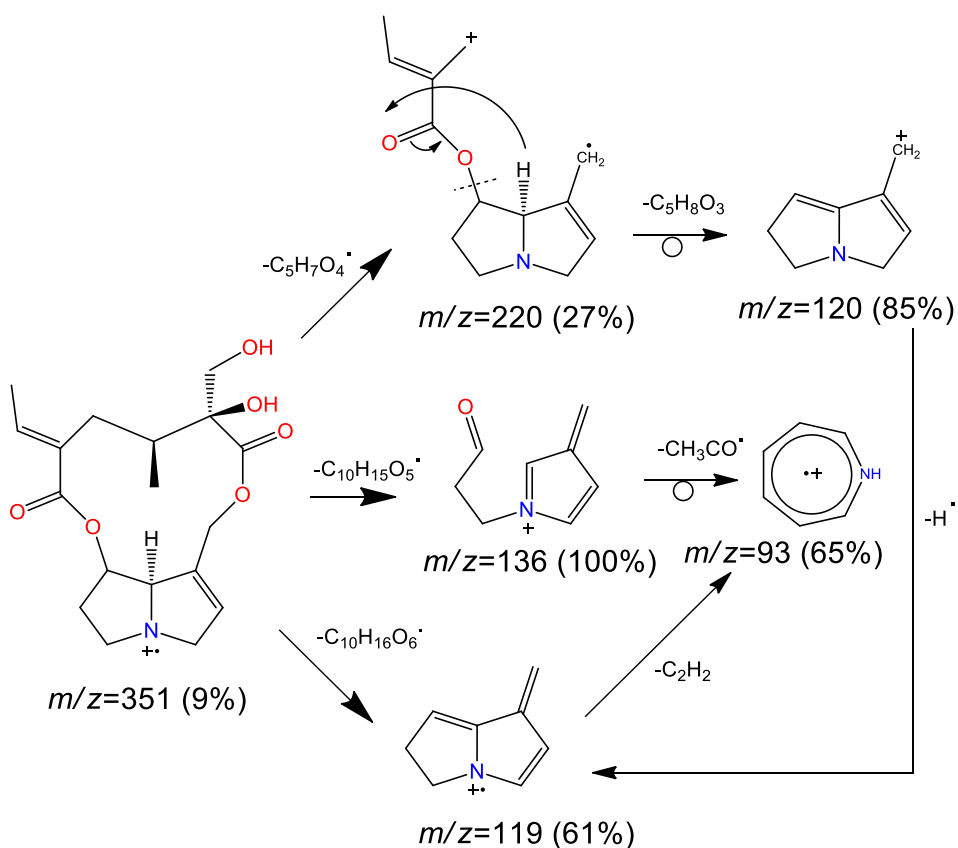
Retrorsina. En la **Figura 15**, se muestra el espectro de masas de la retrorsina obtenido por EI (70 eV). Los picos de los iones característicos aparecen en m/z 351 220, 136, 120, 119 y 93. El ion pico de base se registra en m/z 136.

Figura 15. Espectro de masas (EI, 70 eV) obtenido por GC-MS (modo *Full Scan*) del patrón de retrorsina.



En la **Figura 16** se muestra el patrón de fragmentación de la retrorsina. Los iones m/z 136, 120, 119, 93 se registraron también en el espectro de masas de la monocrotalina, lo que sugiere rutas de fragmentación similares. La diferencia con la monocrotalina es la aparición del ion m/z 220, el cual puede surgir a partir de una ruptura simple entre el carbono 9 y el oxígeno, seguida de una ruptura alílica.

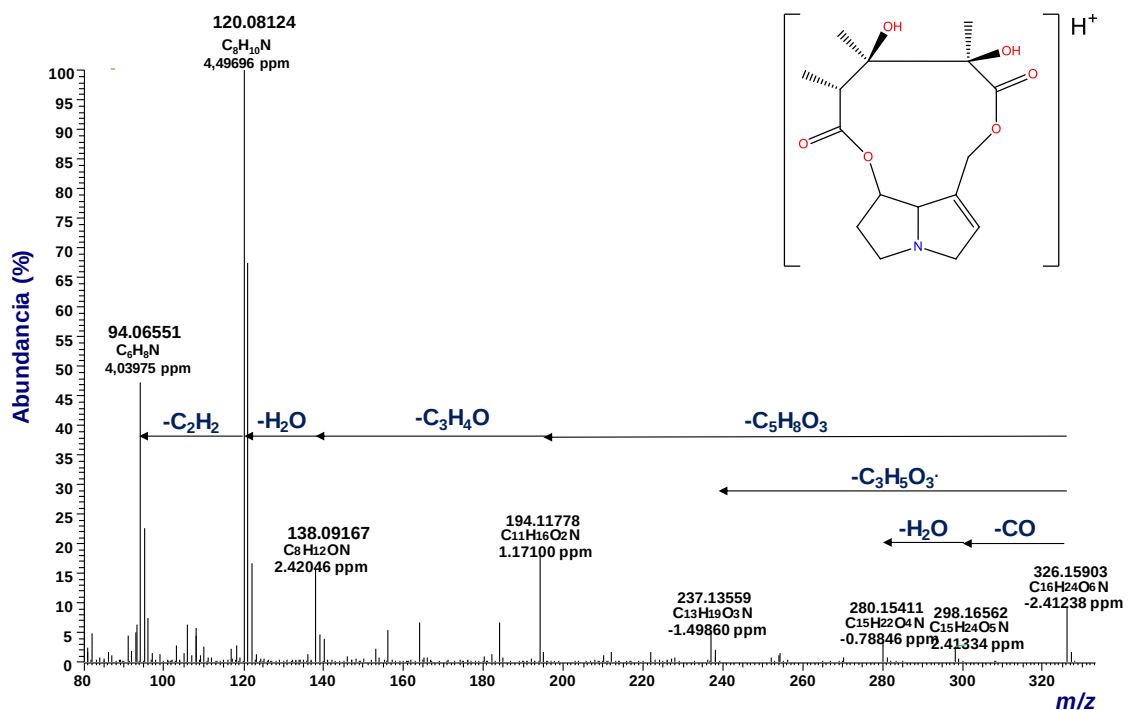
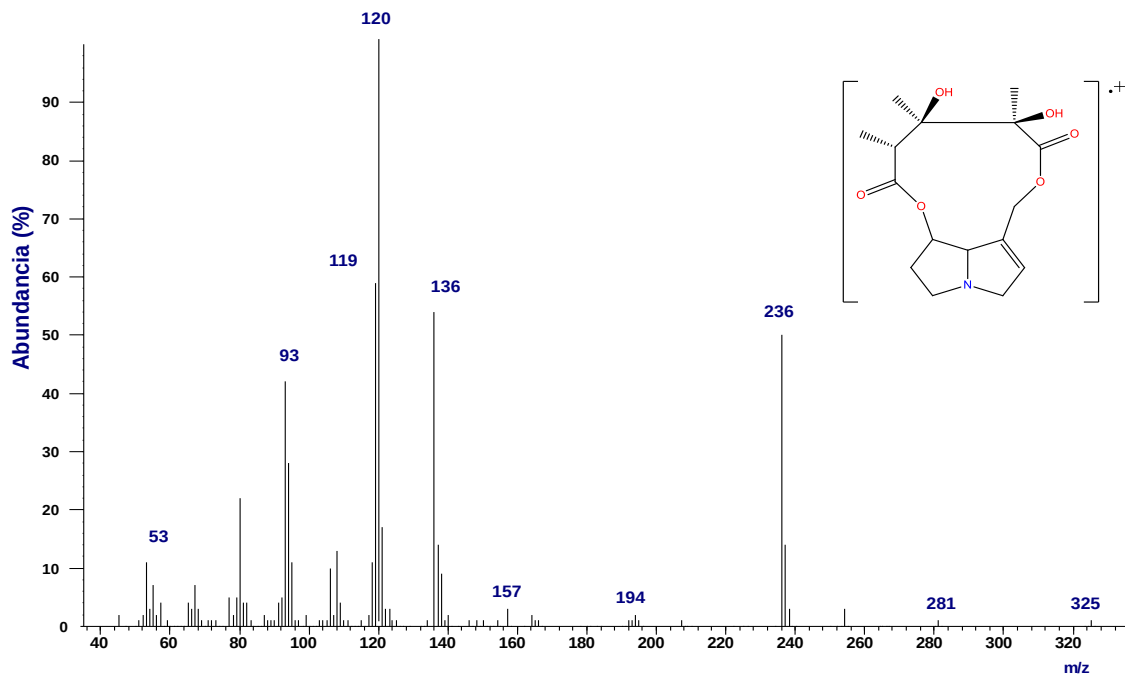
Figura 16. Patrón de fragmentación de la retrorsina (EI, 70 eV).



Tomado de [62] con algunas modificaciones.

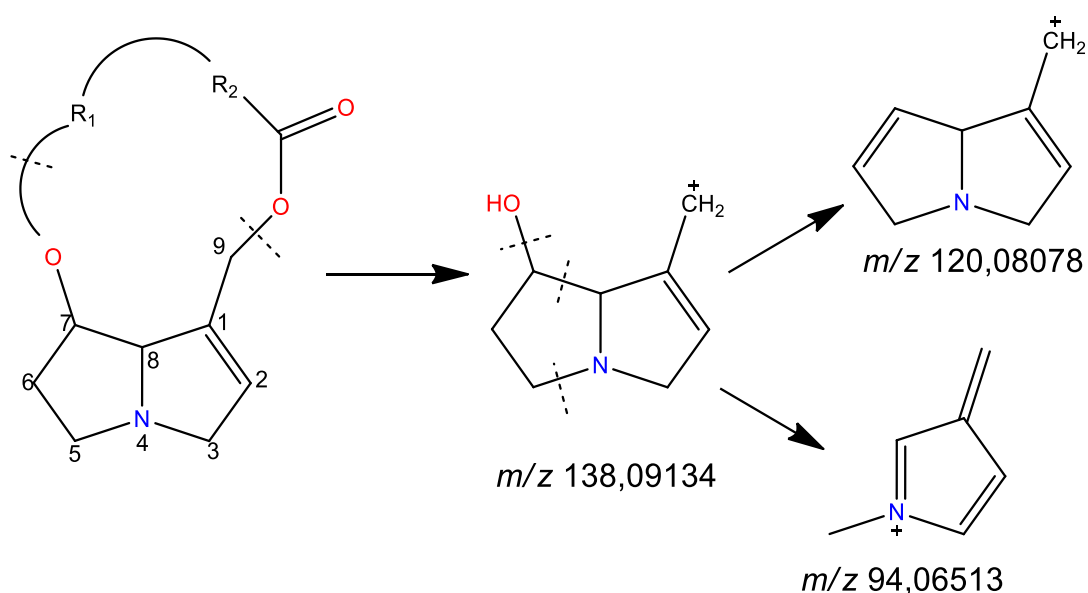
4.2.2. Análisis de los espectros de masas obtenidos por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS. Algunos PA, sobre todo sus *N*-óxidos, no se pueden analizar por GC-MS debido a que no son volátiles, ni termoestables. Por a esta razón, los PA y PANO se analizaron por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS. Usando espectrometría de masas de alta resolución se determina la fórmula molecular de los compuestos y usando la celda de colisiones activadas (HCD) es posible establecer el patrón de fragmentación que es único para cada especie. En la literatura se encuentra poca información de sus patrones de fragmentación, por LC-MS.

Figura 17. Espectros de masas de la monocrotalina obtenido por A. GC-MS, EI, 70 eV y B. LC-ESI(+)-MS, HCD, 40 eV.



El estudio de los espectros obtenidos por LC-MS se facilita, cuando se conocen los patrones de fragmentación obtenidos por EI (70 eV). En la **Figura 17**, se muestran los espectros de masas de la monocrotalina, obtenidos por A. GC-MS (EI, 70 eV) y B. LC-ESI(+)-Orbitrap-MS (HCD, 40 eV).

Figura 18. Esquema de fragmentación de alcaloides pirrolizidínicos 1,2 insaturados obtenidos por LC-ESI(+)-MS. Tomado de [64].

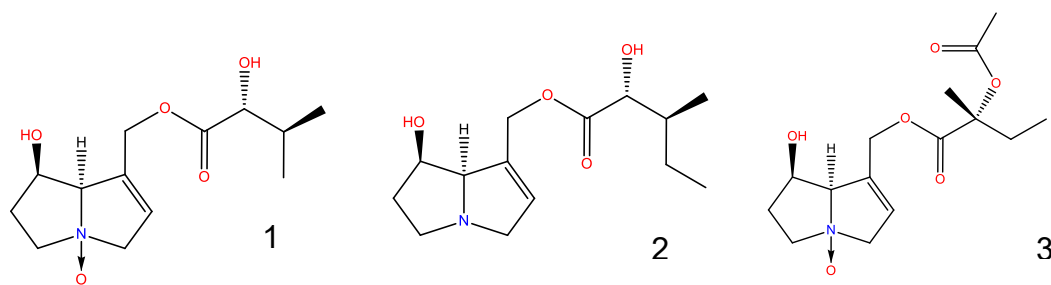


Se puede observar que el único ion que coincide en espectros es m/z 120. El ion m/z 93 obtenido por EI (70 eV) aparece protonado en m/z 94,06551 usando LC-ESI(+)-Orbitrap-MS, HCD, 40 eV; el ion en m/z 136 en EI, 70 eV aparece a m/z 138,09167 en LC-ESI(+)-Orbitrap-MS, HCD, 40 eV. Se observó que los iones característicos para los alcaloides pirrolizidínicos 1,2 insaturados obtenidos por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS y fragmentación en la HCD, fueron 94,06513, 120,08078 y

138,09134 correspondientes a las fragmentaciones del base retronecina (**Figura 18**).

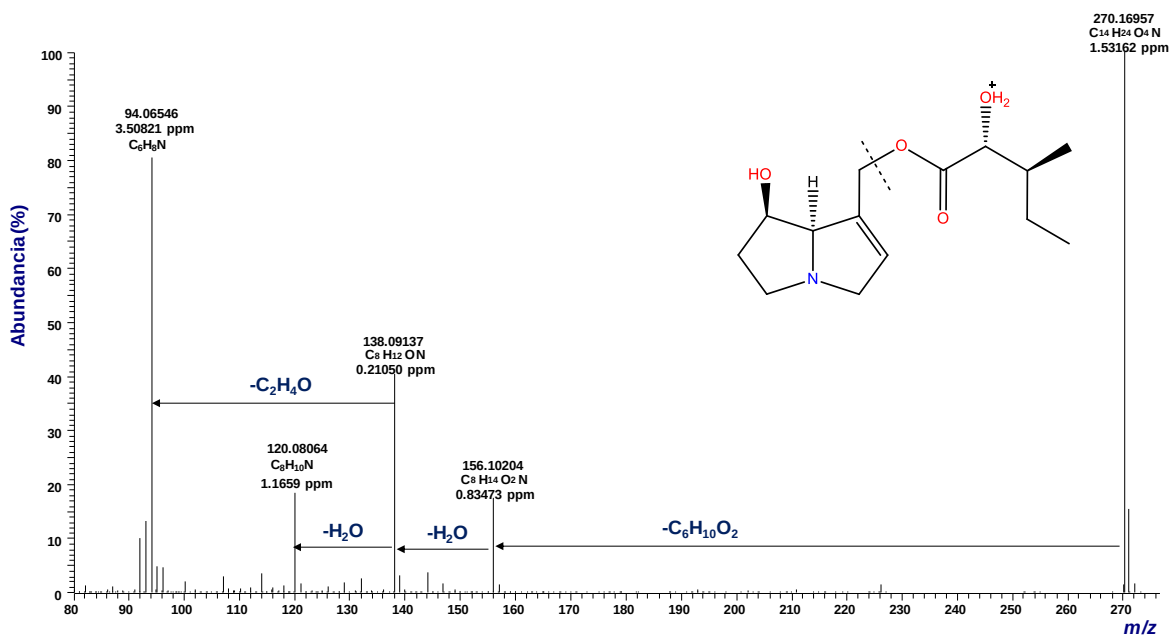
A continuación, se muestra el análisis de los espectros de masas de compuestos transformados por la *U. ornatix*, i.e., la creatonotina B, la creatonotina A *N*-óxido, y la callimorfina *N*-óxido (Véase **Figura 19**). Estos compuestos aparecen en *U. ornatix*, sintetizados a partir de los PA de la planta (hojas o semillas).

Figura 19. Estructuras de la creatonotina A *N*-óxido (1), la creatonotina B (2) y la calimorfina *N*-óxido (3).



Creatonotina B. La creatonotina B es el único PA, base libre, que se detectó en los diferentes estados de la *U. ornatix*. En la **Figura 20**, se muestra el espectro de masas de la creatonotina B. Los picos significativos son, la molécula protonada $[M+H]^+$ en m/z 270,16957, el ion $[M-C_6H_{10}O_2]^+$ en m/z 156,10204, el ion $[M-C_6H_{10}O_2-H_2O]^+$ en m/z 138,09137, el ion $[M-C_6H_{10}O_2-H_2O-H_2O]^+$ en m/z 120,08064 y el ion $[M-C_8H_{14}O_3-H_2O-C_2H_4O]^+$ en m/z 94,06546.

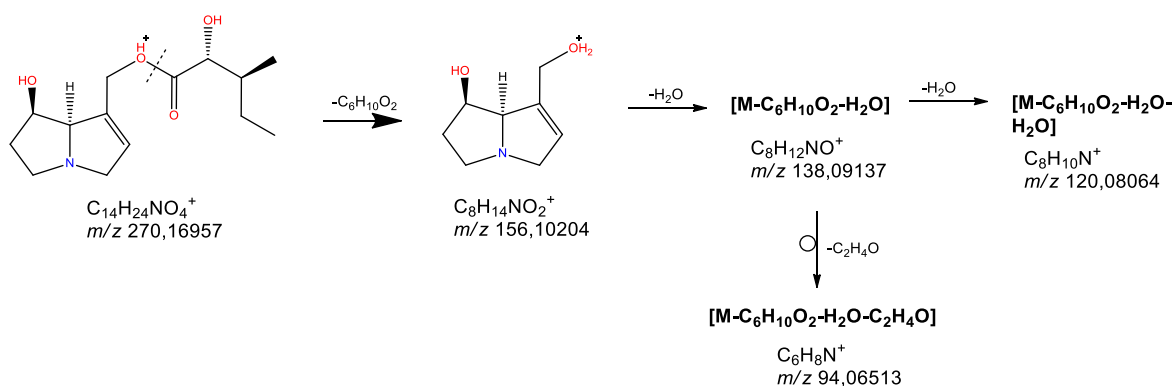
Figura 20. Espectro de masas de la creatonotina B obtenido por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS (modo *step scan*), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).



En la **Figura 21** se muestra el patrón de fragmentación propuesta para la creatonotina B, basado en (63, 64). El ion $[M-C_6H_{10}O_2]^+$ en m/z 156,10204 (estructura de la retronecina), surge a partir de una transferencia de un protón, y ruptura en (a) (Véase **Figura 21**). Los iones $[M-C_6H_{10}O_2-H_2O]^+$ en m/z 138,09137 y $[M-C_6H_{10}O_2-H_2O-H_2O]^+$ en m/z 120,08064 resultan de las pérdidas sucesivas de agua, lo que indica la presencia de grupos OH en la molécula. El fragmento $[M-C_6H_{10}O_2-H_2O-C_2H_4O]^+$ en m/z 94,06546, surge del ion $[M-C_6H_{10}O_2]^+$ en m/z 156,10204 mediante una ruptura, seguida de un reordenamiento del ciclo. Los

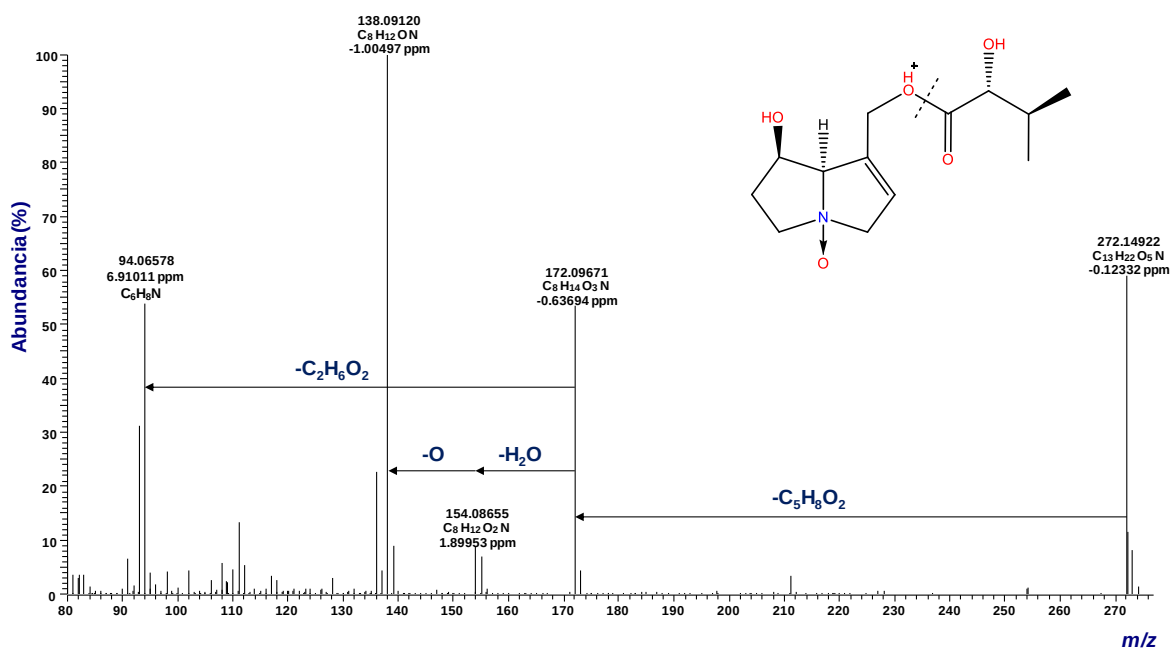
iones $[M-C_6H_{10}O_2-H_2O-C_2H_4O]^+$ en m/z 94,06546 y $[M-C_6H_{10}O_2-H_2O-H_2O]^+$ m/z 120,08064, son fragmentos típicos en los espectros de masas de los PA.

Figura 21. Posible ruta de fragmentación en el espectro de masas de la creatonotina B LC-ESI(+)-Orbitrap-MS (modo step scan), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).



Creatonotina A N-óxido. La creatonotina A N-óxido es un PA que hasta ahora no se había reportado en la *U. ornatrix*, sin embargo, su identificación es tentativa, ya que no se cuenta con una sustancia de referencia. En la **Figura 22**, se muestra el espectro de masas de LC-ESI(+)-Orbitrap-MS de la creatonotina A N-óxido. Los picos significativos son la molécula protonada $[M+H]^+$ en m/z 272,14922, y los iones $[M-C_5H_8O_2]^+$ en m/z 172,09671, $[M-C_5H_8O_2-H_2O]^+$ en m/z 154,08655, $[M-C_5H_8O_2-H_2O-O]^+$ en m/z 138,09120 y $[M-C_5H_8O_2-H_2O-O-C_2H_4O]^+$ en m/z 94,06546.

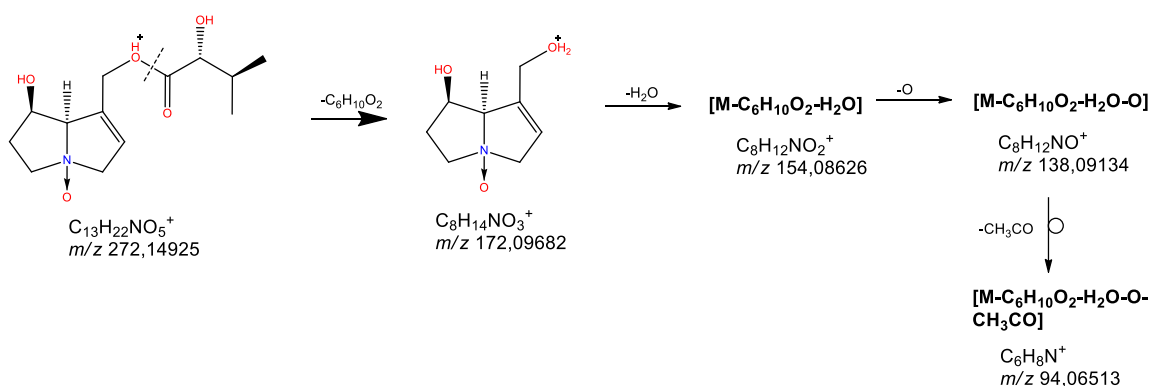
Figura 22. Espectro de masas de la creatonotina A *N*-óxido obtenido por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS (modo *step scan*), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).



En la **Figura 23** se presenta la ruta de fragmentación propuesta para la creatonotina A *N*-óxido. Los iones fragmento de la creatonotina A *N*-óxido son los mismos de la creatonotina B *N*-óxido y la *iso*-creatonotina B *N*-óxido. El ion $[M-C_5H_8O_2]^+$ en m/z 172,09671 (ion de *N*-óxido de retronecina), se forma a partir del ion molecular mediante un reordenamiento con una transferencia de protón. El ion $[M-C_5H_8O_2-H_2O]^+$ en m/z 154,08655 surge a partir de una deshidratación, en la posición del carbono 7 o 9 lo que indica la presencia de grupos OH. El ion $[M-C_5H_{10}O_4-H_2O-O]^+$ en m/z 138,09120, es producto de liberación del oxígeno atómico. Finalmente, el ion $[M-C_5H_{10}O_4-H_2O-O-CH_3CO]^+$ en m/z 94,06546 surge a

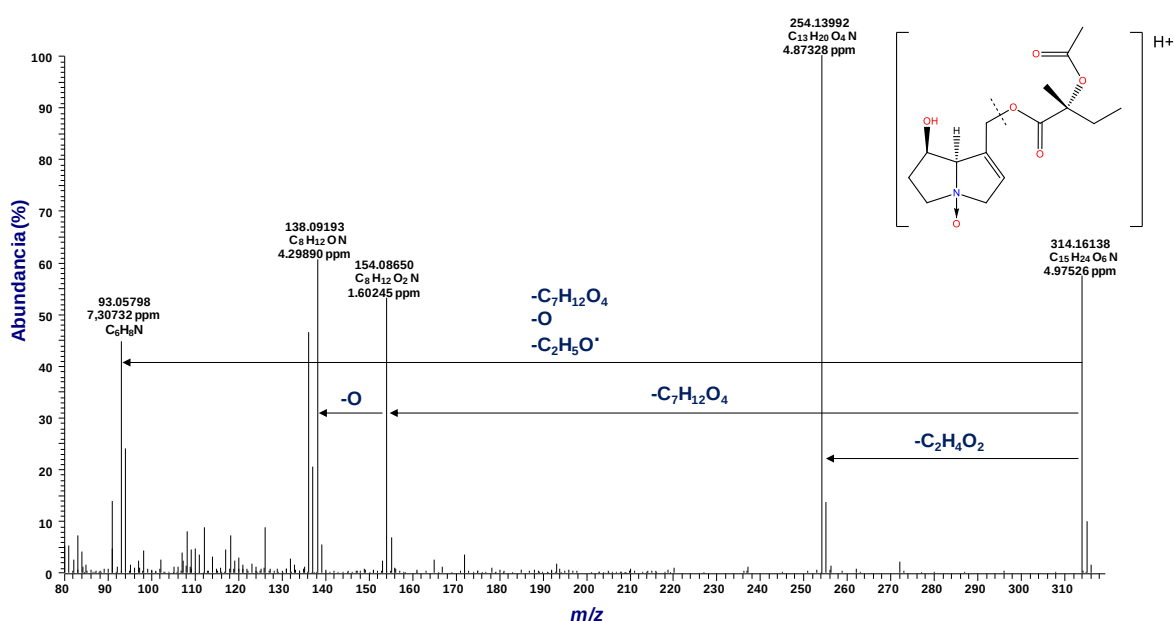
partir de una ruptura simple en el ion $[M-C_5H_{10}O_4]^+$ en m/z 138,09120, seguido de un reordenamiento a un ciclo más estable.

Figura 23. Posible ruta de fragmentación en el espectro de masas de la creatonotina A *N*-óxido obtenido por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS (modo *step scan*), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).



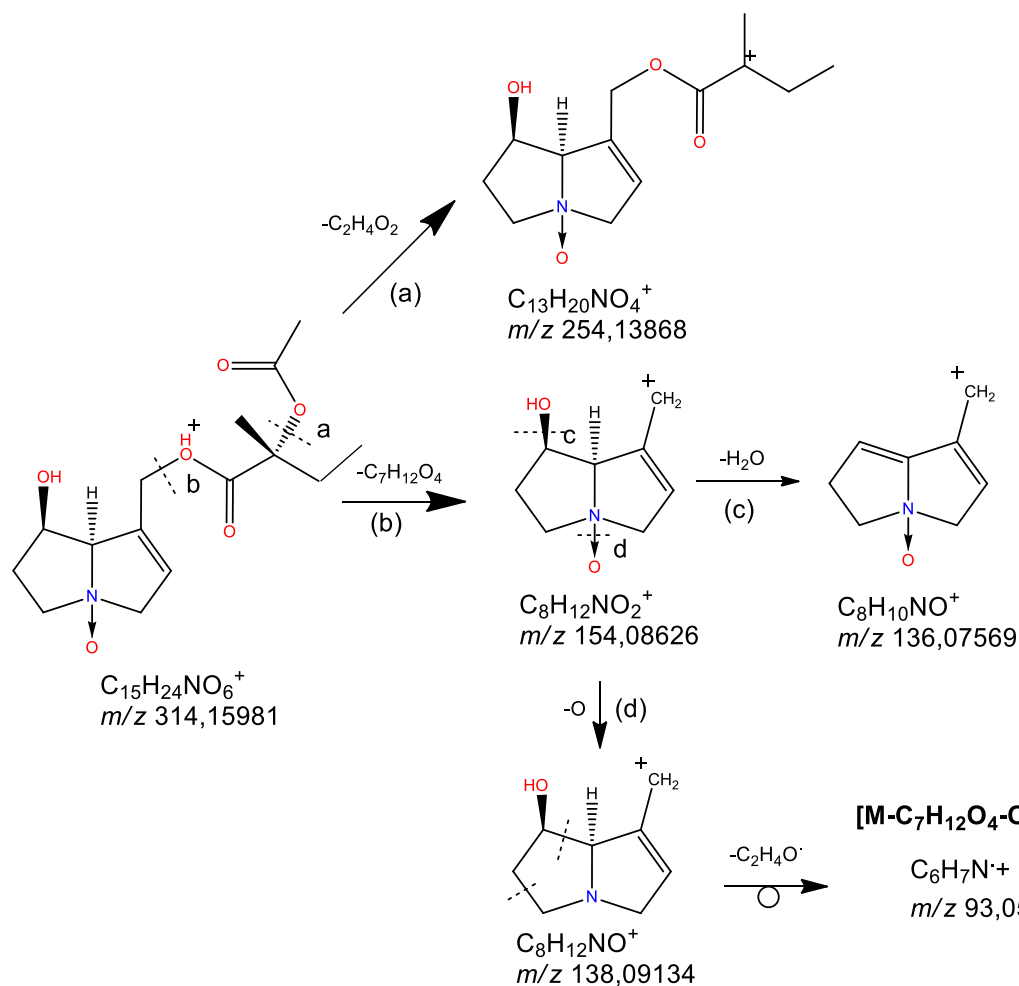
Callimorfina *N*-óxido. La callimorfina *N*-óxido tampoco se había detectado en *U. ornatrix*, se encontró en pequeñas cantidades en los huevos. En la **Figura 24** se muestra el espectro de masas de la callimorfina *N*-óxido obtenido por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS. Los picos significativos son la molécula protonada $[M+H]^+$ en m/z 272,14922, y los iones $[M-C_2H_4O_2]^+$ en m/z 254,13992, $[M-C_7H_{11}O_4]^+$ en m/z 154,08650, $[M-C_7H_{12}O_4-O]^+$ en m/z 138,09193, $[M-C_7H_{12}O_4-O-C_2H_4O]^+$ en m/z 93,05798.

Figura 24. Espectro de masas de la callimorfina *N*-óxido obtenido por LC-ESI(+)-Orbitrap-MS (modo step scan), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).



En la **Figura 25**, se muestra la ruta de fragmentación propuesta de la callimorfina *N*-óxido. El ion $[M-C_2H_4O_2]^+$ en m/z 254,13992, se forma del ion molecular mediante una ruptura y liberación de ácido acético. Los iones $[M-C_7H_{12}O_4]^+$ en m/z 154,08650, $[M-C_7H_{12}O_4-O]^+$ en m/z 138,09193, se explicaron previamente con la creatonotina A *N*-óxido. Por último, el ion $[M-C_7H_{12}O_4-O-C_2H_4O]^+$ en m/z 93,05798, surge a partir del ion $[M-C_7H_{12}O_4]^+$ en m/z 154,08650, por la pérdida de oxígeno atómico, seguido de una ruptura en el ciclo de la base necínica.

Figura 25. Posible ruta de fragmentación en el espectro de masas de la callimorfina *N*-óxido LC-Orbitrap-MS (modo *step scan*), usando una celda de colisiones activadas HCD (30 eV).



4.3. ACUMULACIÓN DE PA EN *U. ornatix* (ORUGA, POLILLA, HUEVOS, EXCREMENTO) ALIMENTADAS CON HOJAS O SEMILLAS DE *Crotalaria* spp.

La cuantificación de los PA y PANO se realizó en *U. ornatix* en sus diferentes estados de las orugas alimentadas con hojas o semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. pallida* y *C. incana*. La cuantificación se realizó mediante el método de estándar

externo (monocrotalina). En la **Figura 26**, se presenta la curva de calibración de la monocrotalina empleada para la cuantificación. Se asumió el mismo factor de respuesta para todos los PA y PANO presentes en las muestras.

Figura 26. Curva de calibración de la monocrotalina (estándar analítico, *Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

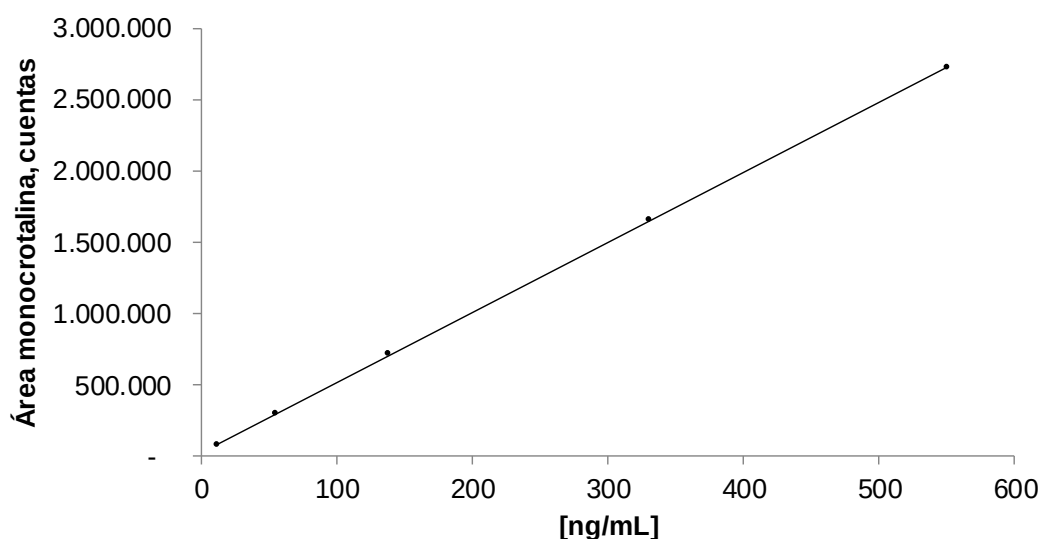


Tabla 7. Figuras de mérito para la monocrotalina para la cuantificación de PA y PANO en *Crotalaria* spp. y *U. ornatix* usando LC-ESI(+)-Orbitrap-MS.

Alcaloide	Rango concentración, ng/mL	Pendiente $\pm$ desviación estándar	Intercepto $\pm$ desviación estándar	R^2	LOD, ng/mL (S/N)	LOQ, ng/mL
Monocrotalina	5,5-550	$9,71 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^1$	$2,8 \times 10^4 \pm 5,4 \times 10^3$	0,998	0,4 (4,1)	1,2

Los valores de contenido de PA y PANO se expresan como equivalentes de monocrotalina. En la **Tabla 7**, se puede observar algunas figuras de mérito del

patrón de monocrotalina para la cuantificación de PA y PANO en *Crotalaria* spp. y *U. ornatix*. El nivel mínimo de cuantificación se encontró en 0,4 ng/mL.

4.3.1. Acumulación de PA en *U. ornatix* alimentada con hojas o semillas de *C. nitens*. Se detectaron un total de 14 PA en las hojas, semillas, orugas, polillas y huevos cuando *U. ornatix* se alimentó con hojas o semillas de *C. nitens*. Los huevos y las polillas jóvenes (2 días después de salir de crisálida) y adultas (>10 días) fueron los que presentaron mayor concentración de PA con respecto a la oruga, hojas y heces. Las **Figuras 27 y 28** muestran un aumento en la concentración de PA a lo largo de la vida de la *U. ornatix* con respecto a la concentración de PA en el alimento suministrado. Se evaluaron las polillas de 2 días (antes de poner los huevos) y mayores de 10 días (después de la postura) para determinar posibles cambios, tanto en concentración como en composición de PA, por el efecto del apareamiento y postura de los huevos. En las **Tablas 8 y 9** se presentan los PA y PANO individuales y sus concentraciones, en equivalentes de monocrotalina, presentes en las partes de *C. nitens* usadas como alimento y en *U. ornatix* en diferentes estados.

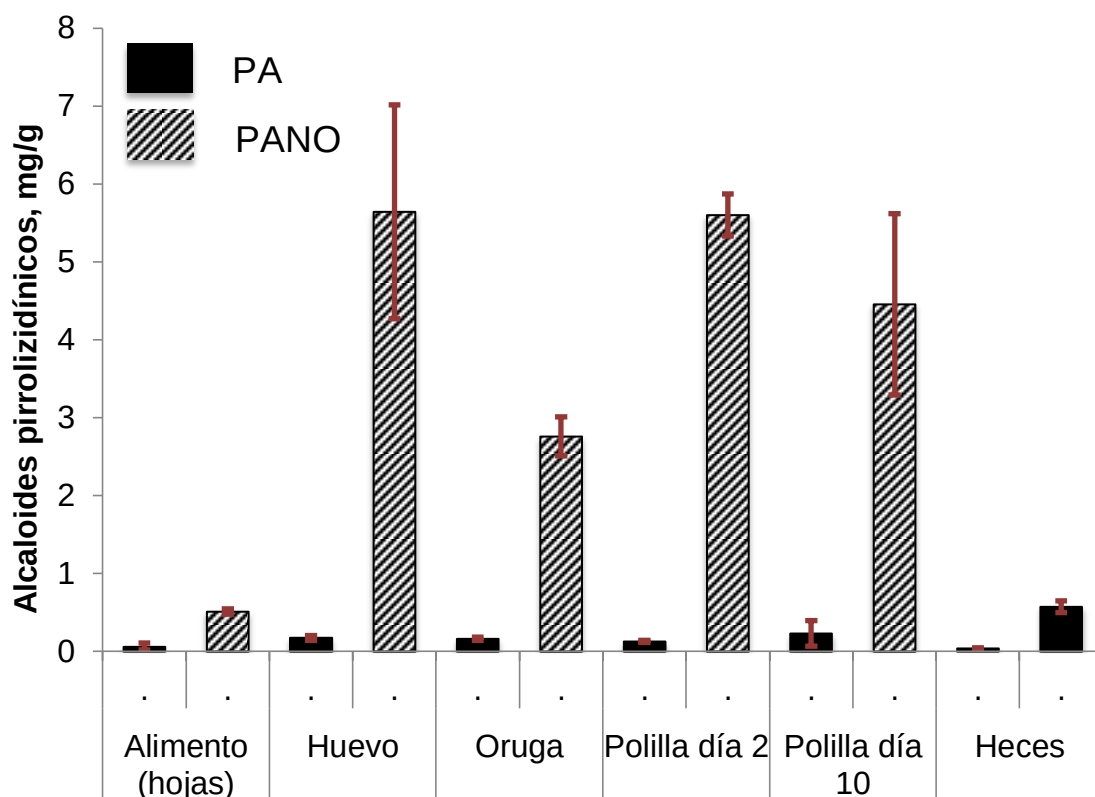


Figura 27. Contenido en equivalentes de monocrotalina de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y *N*-óxido (PANO) en hojas de *C. nitens* y *U. ornatrix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 8**).

Se encontró que los *N*-óxidos de monocrotalina, integerrimina y crispatina fueron los alcaloides principales en el alimento (hojas o semillas de *C. nitens*) y en las orugas, polillas, huevos y excremento de *U. ornatrix*. Se detectó el *N*-óxido de la creatonotina B en las orugas, polillas y huevos, mientras que el *N*-óxido de callimorfina se detectó únicamente en las polillas y los huevos.

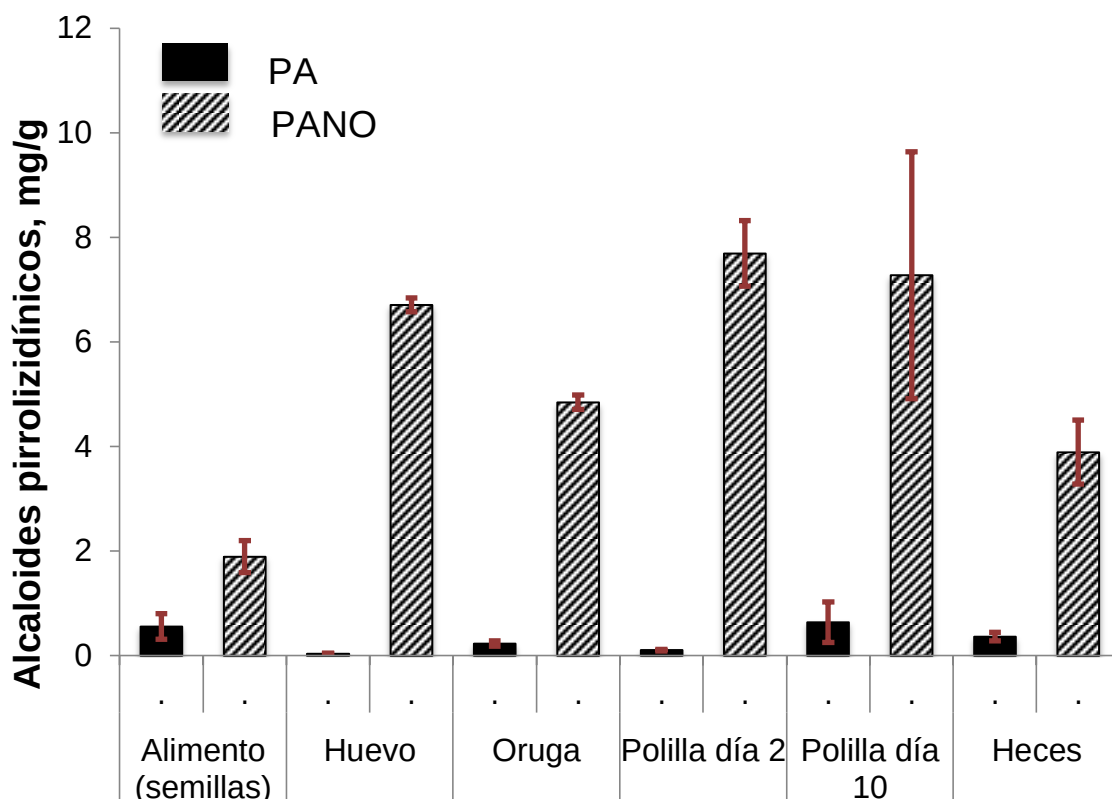


Figura 28. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en equivalentes de monocrotalina en forma de base libre (PA) y *N*-óxido (PANO) en semillas de *C. nitens* y en *U. ornatrix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 9**).

Se detectó un PA, no identificado, con $[M+H]^+$ en m/z 138,05478; además, se detectaron, la creatonotina A y B, *iso*-creatonotina B y la callimorfina, cuatro derivados sintetizados por *U. ornatrix*, cuando el insecto (oruga) se alimentó con hojas o semillas de *C. nitens* (Véanse **Tablas 8 y 9**).

Tabla 8. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatix* alimentadas con hojas *C. nitens*.

N°*	t _R (min)	Alcaloide	µg/g de tejido seco					
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla 2 días (n=3)	Polilla 10 días (n=3)	Excremento (n=3)
1	1,0	Retronecina	N.D.	56±1	30±3	5±4	40±28	N.D.
2	1,0	PA N.-I.	13±1	8±2	64±6	23±2	120±58	20±6
4	1,2	Retronecina N- óxido	0,2±0,1	17±4	40±20	1,3±0,6	50±31	10±1
6	3,0	Monocrotalina	50±32	8±2	77±8	100±98	110±58	36±7
7	3,2	Creatonotina A N-óxido	N.D.	38±9	35±5	32±2	20±12	N.D.
8	3,2	Monocrotalina N- óxido	39±6	3300±798	1500±155	3800±163	2400±520	400±66
9	3,4	iso-Creatonotina B N-óxido	N.D.	43±9,6	20±2	8,4±0,3	24±8	N.D.
10	3,5	Creatonotina B	N.D.	0,8±0,4	6±2	4±2	9±7	N.D.
12	3,7	Crispatina	5±3	5±1	9±1	11±2	20±14	32±6
13	3,7	Creatonotina B N-óxido	n.d.	500±101	260±23	270±21	300±137	N.D.
17	3,9	Crispatina N- óxido	30±11	500±126	270±26	520±24	500±124	45±4
18	3,9	Integerrimina	20±11	29±4	40±10	14±5	70±60	27,6±0,3
19	4,1	Integerrimina N- óxido	70±25	910±69	580±46	910±69	1000±255	44±3

Tabla 9. Continuación.

20	4,2	Callimorfina N- óxido	N.D.	14±4	N.D.	4,5±0,5	4±3	N.D.
Total de PA			600±101	5800±140	2900±260	5700±278	5000±1323	610±81
PA, %			11,0	3,0	5,5	2,3	4,9	6,8
PANO, %			89,0	97,0	94,5	97,7	95,1	93,2

*N° de pico cromatográfico identificado en la Tabla 6.

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

Tabla 9. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatix*, alimentadas con semillas *C. nitens*

N°	t _R (min)	Alcaloide	µg/g de tejido seco					
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla día 2 (n=3)	Polilla día 10 (n=3)	Excremento (n=3)
1	1,0	Retronecina	9±6	12,4±0,4	60±53	46±3	7±3	7±1
2	1,0	PA N.I.	4±2	20±4	10±1	140±8	40±10	40±12
4	1,2	Retronecina N- óxido	11±9	30±4	7±3	13±1	3±1	22±2
6	3,0	Monocrotalina	40±21	21±5	101,8±0,8	40±12	300±200	240±58
7	3,2	Cretonotina A N-óxido	N.D.	111,3±0,2	23±7	92±4	11±7	N.D.
8	3,2	Monocrotalina N- óxido	1200±265	4300±103	2920±72	4000±199	4000±1117	2600±417

Tabla 10. Continuación.

9	3,4	iso-Creatonotina B N-óxido	N.D.	12,3±0,1	9±1	24±3	4±1	N.D.
10	3,5	Creatonotina B	N.D.	0,27±0,03	2,2±0,7	1,1±0,3	1,9±0,8	N.D.
12	3,7	Crispatina	60±42	4,3±0,6	15,6±0,6	11±1	130±96	40±12
13	3,7	Creatonotina B N-óxido	N.D.	176±9	12±25	410±79	50±12	N.D.
17	3,9	Crispatina N-óxido	280±44	1310±11	1060±33	1700±364	1600±650	800±138
18	3,9	Integerrimina	90±44	3,2±0,7	4,9±0,9	6,2±0,3	130±96	19±3
19	4,1	Integerrimina N-óxido	340±53	678±3	490±19	1100±182	1300±531	360±45
20	4,2	Callimorfina N-óxido	N.D.	102±2	N.D	1,7±0,3	0,4±0,3	N.D.
Total de PA			2400±299	6700±124	5100±124	7800±626	8000±1980	4200±678
PA, %			22,8	0,6	4,6	1,4	8,1	8,6
PANO, %			77,2	99,4	95,4	98,6	91,9	91,4

* N° de pico cromatográfico identificado en la **Tabla 6.**

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

4.3.2. Acumulación de PA en *U. ornatrix* alimentada hojas o semillas de *C. retusa*. Se detectaron en total 13 PA en hojas, semillas de *C. retusa* (alimento), orugas, polillas, huevos y heces de *U. ornatrix*. Los huevos y las polillas (de 2 y > 10 días) fueron los que presentaron mayor concentración de PA con respecto a la oruga, hojas y heces. Se observó un aumento en la concentración de PA a lo largo de la vida de la *U. ornatrix* desde los huevos hasta su fallecimiento, véanse **Figuras 29 y 30** cuando se alimentaba con hojas y semillas de *C. retusa*, respectivamente.

Figura 29 Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y *N*-óxido (PANO) en hojas de *C. retusa* y en *U. ornatrix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 10**).

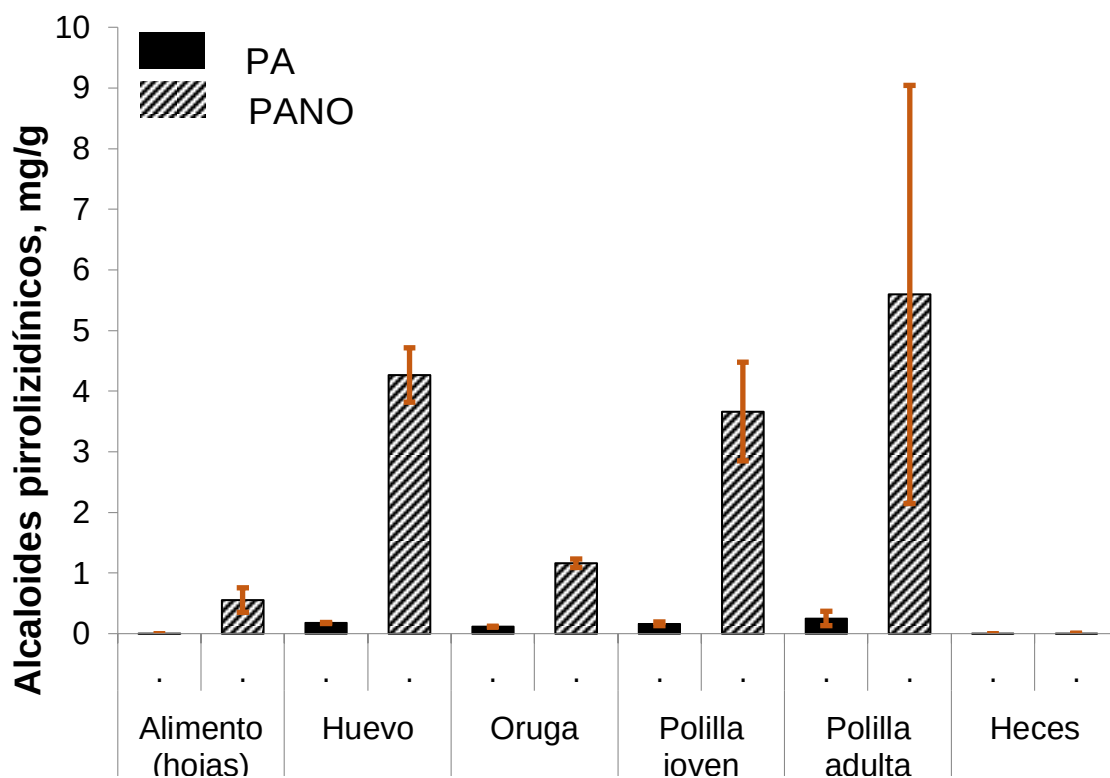
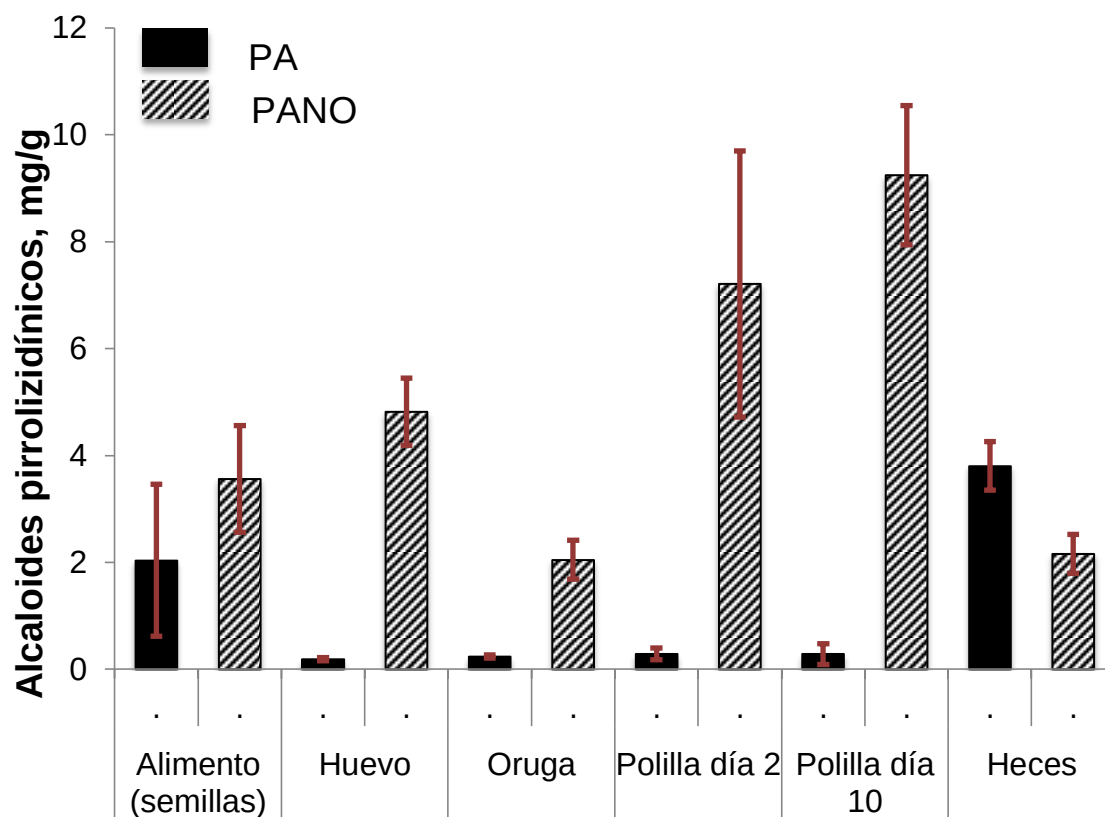


Figura 30. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y *N*-óxido (PANO) en semillas de *C. retusa* y en *U. ornatrix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 11**).



Los *N*-óxidos de monocrotalina y retusina fueron los compuestos mayoritarios en la hojas y semillas de *C. retusa* así como en *U. ornatrix* en sus diferentes estados. Además, el *N*-óxido de la creatonotina B se encontró en las orugas, polillas jóvenes y adultas, de 2 y 10 días, repectivamente, y huevos. En el caso de las orugas y polillas, la concentración del *N*-óxido creatonotina B fue mayor que la del *N*-óxido de monocrotalina cuando el insecto (oruga) se alimentaba con hojas de *C. retusa*. El *N*-óxido de callimorfina se detectó únicamente en los huevos (para la

alimentación con hojas y semillas de *C. retusa*) y polillas (solo cuando se alimentaba con semillas de *C. retusa*). Al igual que cuando se alimentaba la oruga con hojas o semillas de *C. nitens*, las orugas alimentadas con hojas o semillas de *C. retusa*, mostraron dos PA desconocidos y los cuatro productos transformación de la *U. ornatix*, creatonotina A y B, *iso*-creatonotina B y la callimorfina (Véanse **Tablas 10 y 11**).

Tabla 10. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatix*, alimentadas con hojas de *C. retusa*.

N°	t _R (min)	Alcaloide	µg/g de tejido seco					Excremento (n=3)
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla día 2 (n=3)	Polilla día 10 (n=3)	
1	1,0	Retronecina	N.D.	57±2	21±4	13±2	60±32	N.D.
2	1,0	PA N.I.	4±3	41±6	14±1	60±12	100±22	4±1
4	1,2	Retronecina <i>N</i> -óxido	4±3	17,92±0,05	80±35	90±15	600±380	1,0±0,1
6	3,0	Monocrotalina	2±1	12±9	72±2	140±28	136±63	30±5
7	3,2	Creatonotina A <i>N</i> -óxido	N.D.	12±2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8	3,2	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	500±306	3200±388	360±31	1400±310	3000±2000	1,0±3
9	3,4	iso-Creatonotina B <i>N</i> -óxido	N.D.	94±5	43±4	130±26	160±74	N.D.
10	3,5	Creatonotina B	N.D.	1,0±0,2	20±12	8±3	40±25	N.D.
11	3,5	PA N.I.	2±1	17,8±0,1	0,19±0,04	9±3	30±23	N.D.
13	3,7	Creatonotina B <i>N</i> -óxido	N.D.	0,74±0,03	0,66±0,04	2,0±0,4	1,8±0,9	N.D.
16	3,9	Retusina <i>N</i> -óxido	3±1	110±18	39,9±0,4	11±4	30±21	0,09±0,01
19	4,1	PA N.I.	0,16±0,05	2,1±0,3	3,2±0,5	6±3	4±3	0,2±0,1
20	4,2	Callimorfina <i>N</i> -óxido	N.D.	21,5±0,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total de PA			500±308	4400±460	1300±79	3800±845	6000±3566	9±1
PA, %			0,4	4,0	9,2	4,2	4,3	34,1
PANO, %			99,6	96,0	90,8	95,8	95,7	65,9

* N° de pico cromatográfico identificado en la **Tabla 6.**

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

Tabla 11. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatix*, alimentadas con semillas de *C. retusa*.

N°	t _R (min)	Alcaloide	µg/g de tejido seco					Excremento (n=3)
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla día 2 (n=3)	Polilla día 10 (n=3)	
1	1,0	Retronecina	9±4	40±31	130±15	100±22	80±50	790±56
2	1,0	Retronecina <i>N</i> -óxido	28±9	5,3±0,8	80±23	40±16	380±72	170±40
4	1,2	PA N.I.	24±7	51±3	30±24	140±62	150±26	65,1±0,9
6	3,0	Monocrotalina	2±1	150±18	100±13	190±88	200±1147	3000±435
7	3,2	Creatonotina A <i>N</i> -óxido	N.D.	19,0±0,6	4±1	20±10	3±2	N.D.
8	3,2	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	3000±1230	4000±564	1600±305	6000±1953	8000±1302	1900±333
9	3,4	iso-Creatonotina B <i>N</i> -óxido	N.D.	58±6	97±2	30±15	40±10	N.D.
10	3,5	Creatonotina B	N.D.	0,7±0,5	1,4±0,4	3±1	4±2	N.D.
11	3,5	PA N.I.	16±9	130±15	60±11	300±133	500±103	8±1
13	3,7	Retusina <i>N</i> -óxido	70±41	12±2	40±8	9±3	9±3	31±5
16	3,9	Creatonotina B <i>N</i> -óxido	N.D.	520±34	210±37	800±293	500±113	N.D.
19	4,1	PA no identificado	10,5±0,9	3±2	2,1±0,6	6±3	5±2	1,2±0,2
20	4,2	Callimorfina <i>N</i> -óxido	N.D.	52±2	N.D.	4±2	N.D.	N.D.
Total de PA			6000±1680	5000±602	2300±393	7000±2601	9000±1476	6000±809
PA, %			36,4	3,7	10,3	3,9	3,0	63,8
PANO, %			63,6	96,3	89,7	96,1	97,0	36,2

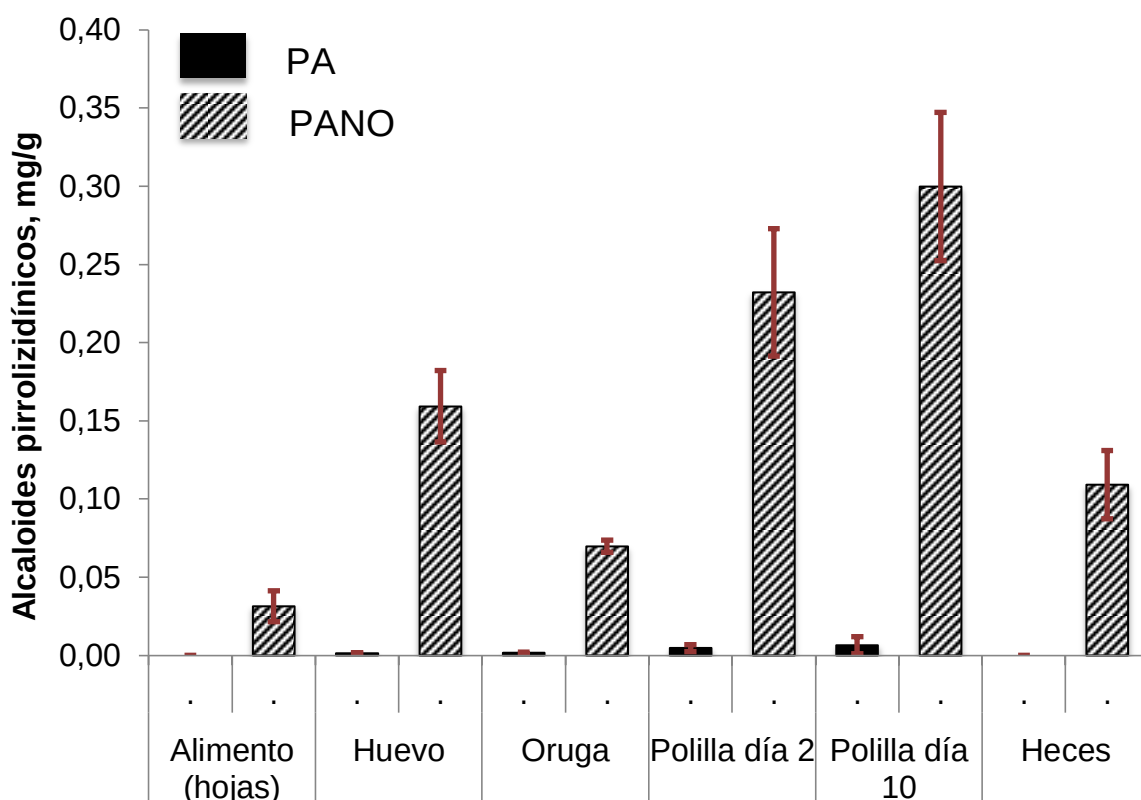
* N° de pico cromatográfico identificado en la Tabla 6..

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

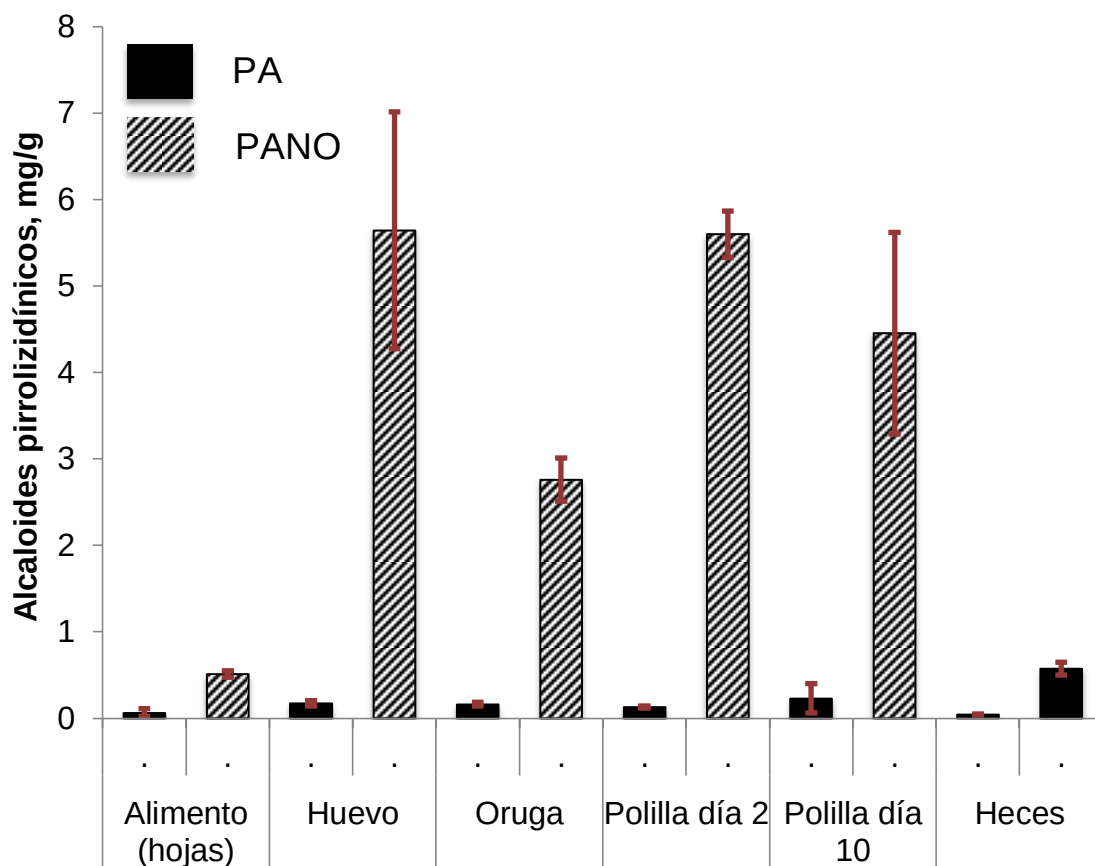
4.3.3. Acumulación de PA en *U. ornatix* alimentada hojas o semillas de *C. pallida*. Se detectaron en total cinco PA y PANO en las orugas, polillas, huevos y heces de *U. ornatix* alimentada con hojas de *C. pallida* y nueve alcaloides en las orugas, polillas, huevos y heces en *U. ornatix* alimentada con semillas de *C. pallida*. Las polillas jóvenes y adultas (de 2 y 10 días, respectivamente) presentaron mayores concentraciones de PA con respecto a las de las hojas, huevos, orugas y heces.

Figura 31. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y N-óxido (PANO) en hojas de *C. pallida* y *U. ornatix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 12**).



Se observó un aumento en la concentración de PA a lo largo de la vida de la *U. ornatix*. Véanse **Figuras 31 y 32** para el tratamiento con hojas y semillas, respectivamente.

Figura 32. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y *N*-óxido (PANO) en semillas de *C. pallida* y en *U. ornatix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 13**).



No se identificaron tres de los alcaloides pirrolizidínicos detectados en hojas o semillas de *C. pallida* y *U. ornatix* ($[M+H]^+$ en m/z 138,05478, $[M+H]^+$ en m/z 142,12264 y $[M+H]^+$ en m/z 158,11729). El alcaloide $[M+H]^+$ en m/z 138,05478 fue

el mayoritario en las hojas de *C. pallida* y en *U. ornatrix* en sus diferentes estados. El *N*-óxido de usaramina se detectó en los diferentes estados de *U. ornatrix* cuando se alimentó con hojas de *C. pallida* (Véase **Tabla 12**). El *N*-óxido de usaramina fue el compuesto mayoritario en *U. ornatrix* en sus diferentes estados cuando se alimentó con semillas de *C. pallida*. Se detectaron *iso*-creatonotina B *N*-óxido, creatonotina B, creatonotina B *N*-óxido y callimorfina *N*-óxido como compuestos biosintetizados por la *U. ornatrix* (Véase **Tabla 13**).

Tabla 12. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatatrix*, alimentadas con hojas de *C. pallida*

N°	t _R (min)	Alcaloide	µg/g de tejido seco					Excremento (n=3)
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla día 2 (n=3)	Polilla día 10 (n=3)	
3	1,0	PA N.I.	30±12	120±23	60±3	150±26	250±38	110±22
5	1,4	PA N.I.	N.D.	20±2	N.D.	14,9±0,5	14±5	N.D.
13	3,7	Cretonotina B N-óxido	N.D.	1,5±0,1	1,7±0,5	4±2	6±5	N.D.
14	3,9	Usaramina	tr.	6±1	N.D.	4±2	N.D.	N.D.
18	3,9	Usaramina N- óxido	tr.	14,0±0,9	7±1	20±4	30±13	N.D.
Total de PA			30±12	160±23	71±04	240±39	310±42	110±22
PA, %			0,0	0,9	2,4	2,0	2,1	0,0
PANO, %			100,0	99,1	97,6	98,0	97,9	100,0

* N° de pico cromatográfico identificado en la Tabla 6.

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

tr. Trazas

Tabla 13. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatix*, alimentadas con semillas de *C. pallida*

N°	t _R (min)	Alcaloide	µg/g de tejido seco					
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla día 2 (n=3)	Polilla día 10 (n=3)	Excremento (n=3)
2	1,0	PA N.I.	30±12	28,3±0,7	40±1	9±1	20±1	37±7
3	1,0	PA N.I.	30±12	113±5	43±9	103±2	20±10	47±9
5	1,2	PA N.I.	270±61	184,2±0,3	120±34	71±8	130±46	500±370
9	3,4	iso-Creatonotina B N-óxido	N.D.	N.D.	N.D.	2,8±0,6	N.D.	N.D.
10	3,5	Creatonotina B	N.D.	5±4	N.D.	18±8	10±4	N.D.
13	3,7	Creatonotina B N- óxido	N.D.	44±4	38±5	12,1±0,4	6±1	N.D.
14	3,9	Usaramina	20±15	132±6	9±1	90±44	160±66	7±1
15	3,9	Usaramina N-óxido	12±9	790,7±0,5	21±3	459±8	1000±149	0,5±0,1
20	3,9	Callimorfina N- óxido	N.D.	6,0±0,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total de PA			370±77	1308,5±0,5	420±73	760±68	1600±256	600±387
PA, %			14,0	12,7	11,7	15,2	11,7	13,3
PANO, %			86,0	87,3	88,3	84,8	88,3	86,7

* N° de pico cromatográfico identificado en la Tabla 6.

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

tr. Trazas

4.3.4. Acumulación de PA en *U. ornatrix* alimentada con hojas o semillas de *C. incana*. Se detectaron en total siete y 14 PA y PANO en las orugas, polillas, huevos y excremento de *U. ornatrix* alimentadas con hojas o semillas de *C. incana*, respectivamente. Las polillas de dos días y los huevos fueron los que presentaron mayor contenido de PA con respecto al alimento, orugas, polillas adultas y heces (**Figuras 33 y 34**).

Figura 33. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y *N*-óxido (PANO) en hojas de *C. incana* y en *U. ornatrix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 14**).

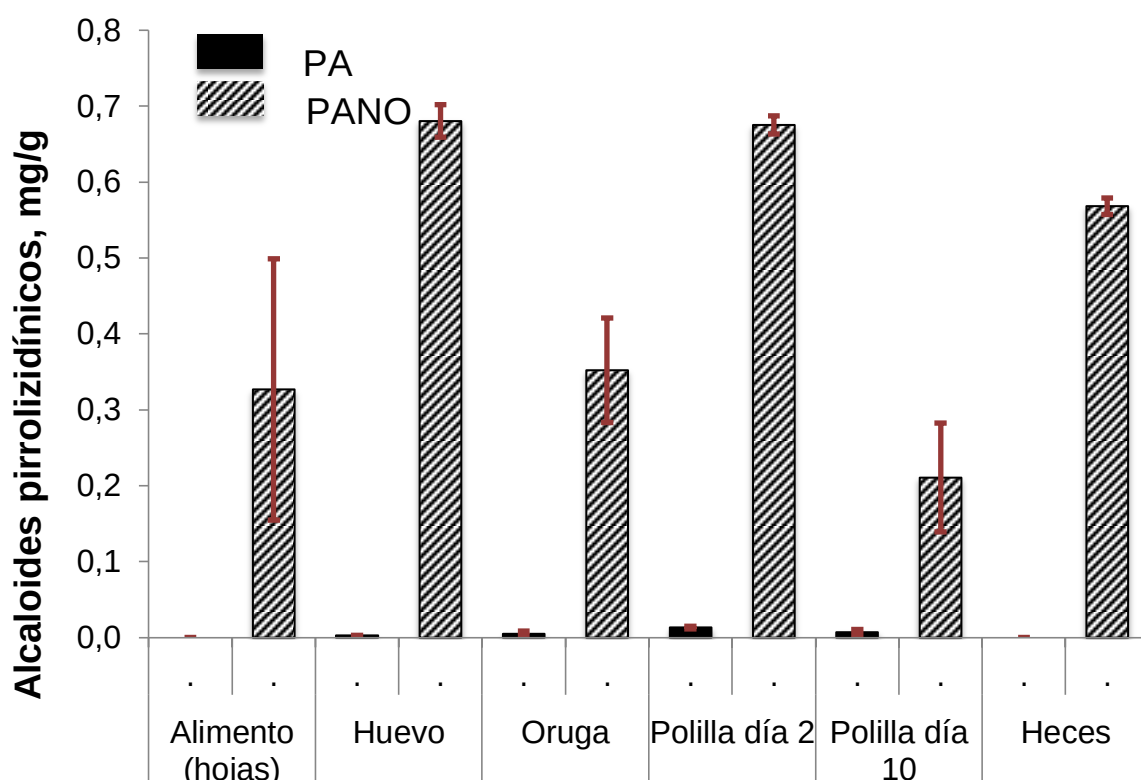
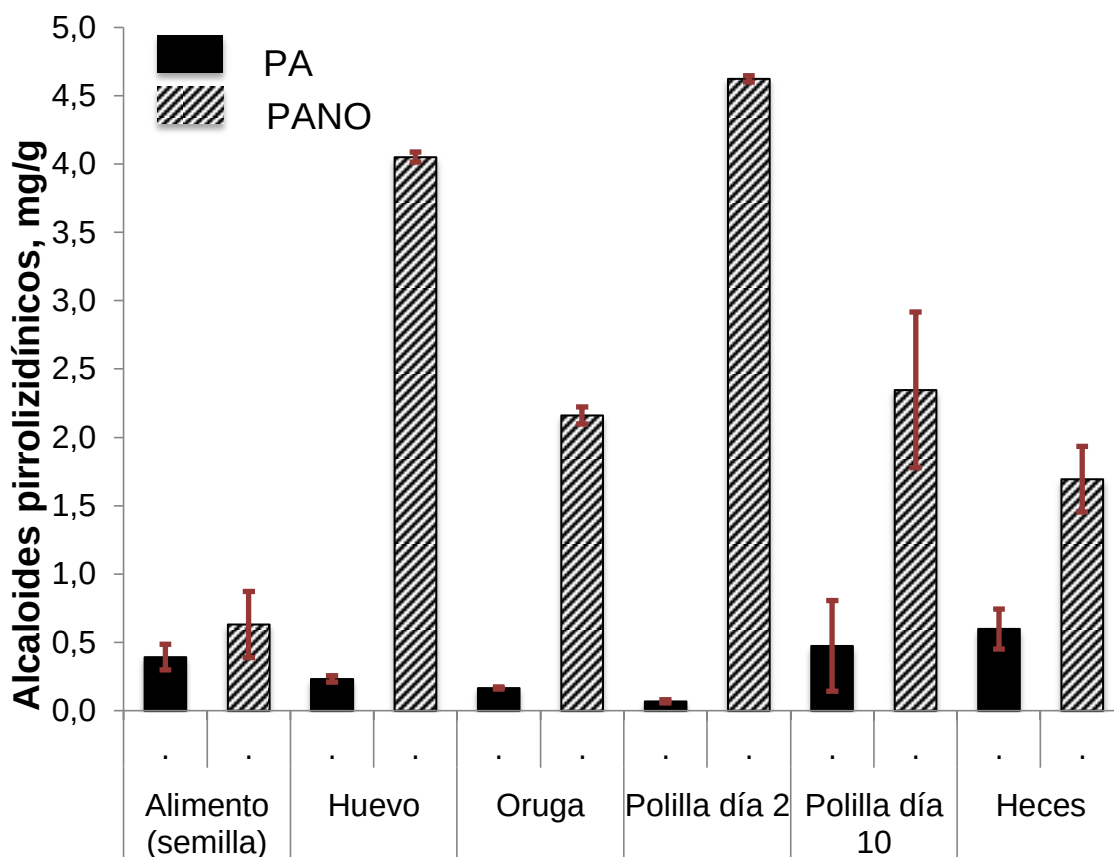


Figura 34. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en forma de base libre (PA) y *N*-óxido (PANO) en semillas de *C. incana* y *U. ornatrix* en sus diferentes estados (Véase **Tabla 15**).



No se identificaron los dos PA detectados en hojas de *C. incana*. Sin embargo, corresponden a $[M+H]^+$ en m/z 138,05478 y $[M+H]^+$ en m/z 158,11729. El alcaloide $[M+H]^+$ en m/z 138,05478 presentó una mayor concentración en las hojas de *C. incana* y en *U. ornatrix* en sus diferentes estados. En *U. ornatrix* se detectó el *N*-óxido de usaramina y el *N*-óxido de creatonotina B (Véase **Tabla 14**). Los *N*-óxidos de integerrimina y de usaramina fueron los compuestos principales en las

semillas de *C. incana*, pero la creatonotina B *N*-óxido y la integerrimina *N*-óxido fueron los compuestos mayoritarios en orugas, polillas y huevos. El *N*-óxido de callimorfina se detectó únicamente en las polillas y los huevos. En los huevos se encontró la mayor concentración de PA (Véase **Tabla 15**).

Tabla 14. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatatrix* alimentadas con hojas de *C. incana*.

N°	Tr	Alcaloide	µg/g de tejido seco					Excremento (n=3)
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla día 2 (n=3)	Polilla día 10 (n=3)	
3	1,0	PA N.I	300±134	237±9	120±18	341±7	60±11	400±20
5	1,2	PA N.I.	30±28	308±8	170±36	159±8	70±11	170±26
13	3,7	Cretonotina B N- óxido	N.D.	205±06	4±2	16±1	2±1	N.D.
14	3,9	Usaramina	tr	1,71±0,06	2±1	8±2	4±3	N.D.
15	3,9	Usaramina N- óxido	Tr	16±2	10±3	29±2	13±8	N.D.
18	4,0	Integerrimina	Tr	1,2±0,1	3±2	1,1±0,3	3±2	N.D.
19	4,1	Integerrimina N- óxido	Tr	61,8±0,7	19±6	52±3	20±15	N.D.
Total de PA			300±136	680±22	360±66	690±13	220±75	570±11
PA, %			0,0	0,4	1,5	1,9	3,3	0,0
PANO, %			100,0	99,6	98,5	98,1	96,7	100,0

* N° de pico cromatográfico identificado en la **Tabla 6**.

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

tr. Trazas

Tabla 15. Contenido de PA y PANO en diferentes estados de *U. ornatrix* alimentadas con semillas de *C. incana*.

N°	t _R (min)	Alcaloide	µg/g de tejido seco					
			Alimento (n=9)	Huevo (n=2)	Oruga (n=3)	Polilla día 2 (n=3)	Polilla día 10 (n=3)	Excremento (n=3)
1	1,0	Retronecina	120±74	190±21	107±9	34±4	110±21	180±41
2	1,0	PA N.I.	22±5	87±8	70±1	160±6	200±104	10±2
4	1,2	Retronecina N- óxido	30±28	42,5±0,9	70±21	210±46	50±19	21±2
5	1,4	PA N.I.	500±298	150±0,6	20±3	1,6±0,3	2±1	1210±84
7	3,2	Creatonotina A N- óxido	N.D.	51±4	20±3	29,3±0,4	8±4	N.D.
9	3,4	iso-Creatonotina B N-óxido	N.D.	76±3	28±2	36±1	31±2	N.D.
10	3,5	Creatonotina B	N.D.	1,6±0,3	8±3	2,1±0,2	30±0,023	N.D.
11	3,5	PA no identificado	3±2	66,7±0,2	53±3	124±1	100±31	28±9

Tabla 13. Continuación

12	3,7	Creatonotina B N- óxido	N.D.	1120±26	560±34	1130±11	432±31	N.D.
15	3,9	Usaramina N- óxido	8±2	60±3	37±2	114±4	60±21	24±6
18	4,0	Integerrimina	200±104	39±3	51±7	31±15	400±293	400±106
19	4,1	Integerrimina N- óxido	70±63	2180±12	1310±38	2810±31	1500±448	400±178
20	4,2	Callimorfina N- óxido	N.D.	353±8	N.D.	10±1	1,4±0,8	N.D.
Total de PA			1000±417	4280±60	2330±67	4690±29	2800±878	2300±386
% PA			14,0	12,7	11,7	15,2	11,7	13,3
% PANO			86,0	87,3	88,3	84,8	88,3	86,7

* N° de pico cromatográfico identificado en la **Tabla 6**.

N. I. No identificado.

N.D. No detectado

tr. Trazas

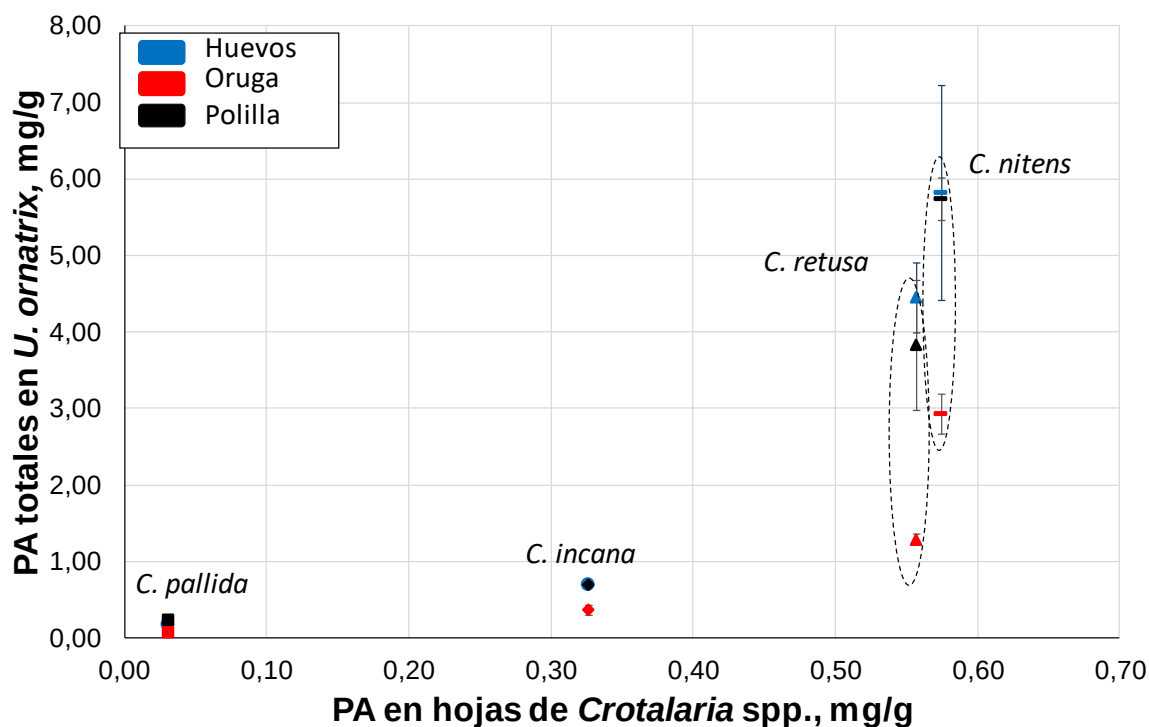
4.4. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE PA DE HOJAS Y SEMILLAS DE *Crotalaria* spp. Y SU ACUMULACIÓN Y TRANSFORMACIÓN EN *U. ornatrix*.

Las orugas *U. ornatrix* se alimentaron con cuatro especies de *Crotalaria*. Dos de las especies, *C. nitens* y *C. retusa*, con mayor contenido de PA y PANO en hojas y semillas que *C. pallida* y *C. incana*. En todos los casos, las orugas contenían más alcaloids en mg/g que la fuente de alimento, pero las polillas y los huevos mostraron mayor contenido de alcaloides que las orugas. Cuando las orugas se alimentaron con partes de plantas con baja concentración de PA, el producto de transformación que se detectó en la *U. ornatrix* fue el *N*-óxido de creatonotina B (hojas de *C. pallida* y hojas de *C. incana*, véanse las **Tablas 12 y 14**). Cuando se alimentaron las orugas con partes de plantas con mayor concentración de PA (hojas y semillas de *C. nitens* y *C. retusa*), se detectaron creatonotina A *N*-óxido, iso-creatonotina B *N*-óxido, creatonotina B, creatonotina B *N*-óxido y callimorfina *N*-óxido como productos de transformación en la *U. ornatrix* (Véase **Tablas 8 - 11, 13 y 15**). Las semillas de *C. incana* tuvieron mayor concentración de retronecina y en este caso, *U. ornatrix* generó mayor contenido de productos de transformación (Vease **Tabla 15**).

En la **Figura 35**, se ilustra la relación entre la concentración de los PA totales en las hojas de *Crotalaria* spp. y la concentración de los PA totales en los diferentes estados de la *U. ornatrix*. Los huevos (puntos azules), las orugas (puntos rojos) y las polillas (puntos negros), en donde la oruga se alimentó con hojas de *C. pallida* y *C. incana*, con concentración baja de PA, poseen menor concentración de PA

que los huevos, orugas y polillas, en donde la oruga se alimentaba con hojas de *C. nitens* y *C. retusa*, con concentración alta de PA.

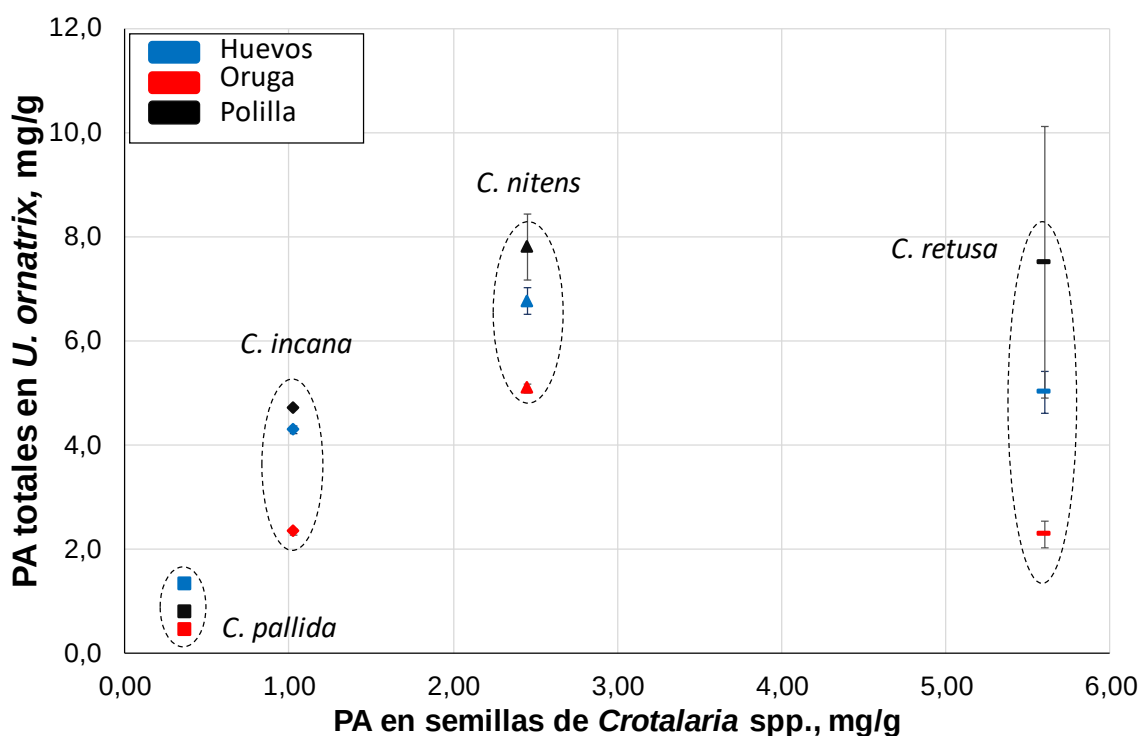
Figura 35. Relación entre la concentración de PA totales en las hojas de *Crotalaria* spp. y la concentración de PA totales de los diferentes estados de *U. ornatrix*.



En la **Figura 36**, se muestra la relación entre los PA totales de las semillas *Crotalaria* spp. y los presentes en la *U. ornatrix* en sus diferentes estados. Cuando la orugas se alimentaron con semillas de *C. pallida* y *C. incana*, con concentración baja de PA, se observó menor concentración PA en la *U. ornatrix* en comparación a cuando se alimentaron con semillas de *C. nitens*, con mayor contenido de PA. Sin embargo, la concentración de PA en *U. ornatrix* no incrementó cuando se

alimentó con semillas *C. retusa*, el contenido de PA tiende a ser constante, lo que posiblemente indicaría que *U. ornatix* acumula una cantidad máxima de PA en su organismo.

Figura 36. Relación entre la concentración de PA totales en las hojas de *Crotalaria* spp. y la concentración de PA totales de los diferentes estados de *U. ornatix*.



En la **Tabla 16**, se muestran los pesos de huevos, orugas y polillas de *U. ornatix* cuando se alimentaron con hojas o semillas de *Crotalaria* spp.. No se observó ninguna relación entre el peso de las orugas o polillas de *U. ornatix* y su contenido total de PA. Sin embargo, se registró mayor peso en los huevos, orugas y polillas cuando las orugas se alimentaban con semillas, en comparación con las

orugas alimentadas con hojas de *Crotalaria* spp. En general, los huevos pesaron entre 133 y 165 µg, las orugas entre 153 y 336 mg y las polillas entre 58 y 116 mg. Las orugas y polillas que se alimentaron con semillas de *C. pallida* pesaron más, mientras que las orugas y polillas que menos pesaron, fueron las que se alimentaron con hojas de *C. retusa*.

Tabla 16. Peso de la *U. ornatix* de sus diferentes estados, cuando se alimentaba con hojas o semillas de *Crotalaria* spp.

Especie	Tratamiento	Peso promedio (mg)		
		Huevo	Oruga	Polilla
<i>C. nitens</i>	Hojas	0,159	167	64
	Semillas	0,164	169	73
<i>C. retusa</i>	Hoja	0,145	153	58
	Semilla	0,160	231	74
<i>C. pallida</i>	Hojas	0,133	198	64
	Semilla	0,146	336	116
<i>C. incana</i>	Hoja	0,148	204	89
	Semilla	0,165	213	89

Martins y colaboradores [23] determinaron que *U. ornatix* debe tener al menos de 3 mg/g de PA para evitar a depredadores como la araña *Nephila clavipes*. Sin embargo, el contenido de PA en la *U. ornatix* puede llegar a ser mucho mayor (8 mg/g). De forma similar ocurre en la mariposa monarca *Danaus plexippus*, cuando sus orugas acumulan los cardenólidos de las especies de *Asclepias*. Cuando las *Asclepias* aumentan la concentración de cardenolidos, en las mariposas monarca su contenido crece tres o cuatro veces más, en comparación de la planta huésped,

hasta que se llega a un límite de acumulación (65). Estudios han reportado(66–68), que la acumulación de sustancias tóxicas en algunas polillas del género *Erebidae* y otros insectos(69–72), no genera un efecto negativo en la salud de los mismos. Sin embargo, otros estudios (73–77), evidencian lo contrario. Cogni y colaboradores [9] encontraron que *U. ornatix* se afecta por la ingesta de PA, solamente teniendo menor tiempo de vida de la oruga, pero que a concentraciones más altas de PA en la oruga, le confieren mejor defensa ante sus depredadores.

Martins y colaboradores [23] demostraron que el tipo de PA, senecionina o monocrotalina, no influye en incrementar o disminuir la defensa de *U. ornatix* contra su principal depredador, la araña *N. clavipes*. Sin embargo, cuando las orugas se alimentan de PA como la retronecina (78), pueden compensar la ingesta de alcaloides macrocíclicos, fabricando sus propios PA, que son igualmente eficientes en defender a la polilla, como sucede con los PA de tipo monocrotalina o integerrimina (23). Esto explicaría el contenido elevado de compuestos biosintetizados por *U. ornatix*, del presente trabajo, en el tratamiento con semillas de *C. incana*, cuya concentración de retronecina es mayor que en las otras especies estudiadas. Es un comportamiento similar a lo reportado en otras polillas del género *Erebidae*(79). Las polillas y los huevos provenientes de orugas *U. ornatix* alimentadas con semillas de *Crotalaria* spp. mostraron la presencia de callimorfina y creatonotina A, hasta ahora no reportados en *U. ornatix*. Estos PA son precursores de las feromonas empleadas para el cortejo (24). La callimorfina se reportó por primera vez en *T. jacobea* en 1980, por Edgar y colaboradores(18).

Se han detectado isómeros de la callimorfina, tales como, la homocallimorfina y deacetylcalimorfina(15) y solo hasta en 2007 (80), se determinó la configuración absoluta de la callimorfina y las creatonotinas.

Desde el punto de vista evolutivo, pueden ocurrir algunas mutaciones aleatorias en el ADN de las plantas, generar la producción de nuevas sustancias y favorecer su selección a través de los herbívoros especializados. Los cardenólidos, que son secuestrados por la mariposa monarca o *Danaus plexippus* (un herbívoro especializado), muestran una disminución filogénica en las *Asclepias*, mientras que los compuestos fenólicos muestran un aumento (81, 82). Las especies derivadas de las *Aristolochia*, han disminuido su cantidad de ácidos aristolóquicos y, en su lugar, producen ácidos labdanoicos(83). En este caso, las mariposas especializadas *Troidini* acumulan los ácidos aristolóquicos, pero se ven afectadas por los ácidos labdanoicos (84). Por otra parte, la falta de un herbívoro especializado en los campos de la *Senecio jacobea*, dio como resultado la evolución de niveles más altos de PA; en consecuencia, la planta obtuvo una mayor resistencia hacia los herbívoros generalistas (85). El balance entre la presión selectiva de los herbívoros especialistas y generalistas se considera un factor importante para mantener la variación genética de las plantas en su medio natural (86).

El presente trabajo y otros estudios con herbívoros especializados que acumulan sustancias tóxicas, como los alcaloides pirrolizidínicos, cardenolidos y ácidos aristolóquicos, permiten comprender algunas interacciones específicas entre

plantas e insectos. La relación entre los compuestos de defensa química de las plantas y su interacción con los herbívoros, tiene implicaciones importantes para la comprensión de la evolución de las interacciones ecológicas y sus posibles aplicaciones en el control de plagas en cultivos de interés comercial.

5. CONCLUSIONES.

20 alcaloides pirrolizidínicos (PA) se identificaron tentativamente en hojas y semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana*, *C. pallida* y en *U. ornatix* (orugas, polillas y huevos), dentro de los cuales se encuentran la creatonotina A, creatonotina B, *iso*-creatonotina B y callimorfina, producto de la biosíntesis en *U. ornatix*. El uso de técnicas analíticas sensibles permitió detectar por primera vez la creatonotina A y la callimorfina en *U. ornatix*.

Las orugas de *U. ornatix* incrementaron el contenido de PA en relación al contenido del alimento y los acumuló principalmente en forma de *N*-óxidos. El contenido más alto de PA se encontró en polillas y huevos. De manera general, al incrementar la concentración de PA en el alimento, también incrementó el contenido en las orugas y polillas y se incrementó la concentración de compuestos biosintetizados por *U. ornatix*, como la creatonotina B. Existe una posible relación entre la alta concentración de retronecina de las semillas de *C. incana* y el contenido alto de creatonotina B en las orugas alimentadas con éstas semillas.

Las orugas que se alimentaron con semillas de *Crotalaria* spp., generaron orugas, polillas y huevos con mayor peso. No se encontró ninguna relación entre el peso de la oruga *U. ornatix* y el contenido de PA en el alimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. BOURGAUD, F., et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. En: Plant Science. 2001. Vol. 161, no. 5, p. 839–851.
2. LI, J. Arabidopsis Flavonoid Mutants are Hypersensitive to UV-B Irradiation. En: the Plant Cell Online. 1993. Vol. 5, no. 2, p. 171–179.
3. HARBORNE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. En : . Inglaterra : Academic Press: Londres, 2014. p. 71–101.
4. HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products from plants. En : Chemicals from plants. En: Imperial College Press: Londres, 1999. p. 1–27.
5. JONES, Bob B. Buchanan; GRUISSEM, Wilhelm y L., Russell. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. 2da. Berkeley : Wiley, 2015.
6. HARTMANN, T. y ZIMMER, M. Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual Senecio species. En: Journal of Plant Physiology. 1986. Vol. 122, no. 1, p. 67–80.
7. HARTMANN, T., et al. Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. En: Planta. 1989. Vol. 177, no. 1, p. 98–107.
8. WITTE, L.; EHMKE, A. y HARTMANN, T. Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids. En: Naturwissenschaften. 1990. Vol. 77, no. 11, p. 540–543.

9. COGNI, R.; TRIGO, J. R. y FUTUYMA, D. J. A free lunch no cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth. En: Molecular Ecology. 2012. Vol. 21, no. 24, p. 6152–6162.
10. HARTMANN, T. y WITTE, L. Pyrrolizidine alkaloids: chemical, biological and chemoecological aspects. En: Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. 1995. Vol. 9, no. 1, p. 155–233.
11. TRIGO, J. R. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. En: Phytochemistry Reviews. 2011. Vol. 10, no. 1, p. 83–98.
12. BOPPRÉ, M. Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (Pyrrolizidine alkaloids). En: Naturwissenschaften. 1986. Vol. 73, no. 1, p. 17–26.
13. SCHNEIDER, D. Perspectives in chemoreception and behavior. En : The strange fate of pyrrolizidine alkaloids. 1a Edición. New York : Springer, 1987. p. 123–142.
14. KRASNOFF, S. B. y ROELOFS, W. L. Quantitative and qualitative effects of larval diet on male scent secretions of *Estigmene acrea*. En: Journal of Chemical Ecology. 1989. Vol. 15, no. 3, p. 1077–1093.
15. HARTMANN, T., et al. Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. En: Insect biochemistry and molecular biology. 2005. Vol. 35, no. 10, p. 1083–1099.

16. EHMKE, A., et al. Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae*. En: Zeitschrift Naturforschung C. 1990. Vol. 45, no. 11–12, p. 1185–1192.
17. APLIN, R. T. y ROTHSCILD, M.. Poisonous alkaloids in the body tissues of the garden tiger moth (*Arctia caja* L.) and the cinnabar moth (*Tyria jacobaeae* L.)(Lepidoptera). En: Toxins of Animal and Plant Origin. 1972. Vol. 2, p. 579–595.
18. EDGAR, J. A., et al. Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth “metabolite.” En: Tetrahedron Letters. 1980. Vol. 21, no. 14, p. 1383–1384.
19. CLARKE, C. A., et al. Mating attempts between the Scarlet Tiger Moth, *Callimorpha dominula* L., and the Cinnabar Moth, *Tyria jacobaeae* L. (Lepidoptera: Arctiidae), involve a common sex pheromone composition. En: Cellular and Molecular Life Sciences. 1996. Vol. 52, no. 6, p. 636–638.
20. L'EMPEREUR, et al. Pyrrolizidine alkaloids from *Hackelia californica* and *Gnophaela latipennis*, an *H. californica*-hosted arctiid moth. En: Journal of Natural Products. 1989. Vol. 52, no. 2, p. 360–366.
21. TRIGO, J. R., et al. Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. En: Journal of Chemical Ecology. 1993. Vol. 19, no. 4, p. 669–679.
22. HARTMANN, T., et al. Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). En: Biochemical

Systematics and Ecology. 1990. Vol. 18, no. 7–8, p. 549–554.

23. MARTINS, C. H., et al. Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a specialist herbivore. En: PLOS ONE. 2015. Vol. 10, p. 2017.
24. SCHULZ, S., et al. Insect pheromone biosynthesis: stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens*. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993. Vol. 90, no. 14, p. 6834–6838.
25. SCHULZ, S., et al. Insect pheromone biosynthesis: Stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens* (Lepidoptera, Arctiidae). En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993. Vol. 64, no. 14, p. 6834–6838.
26. HOINA, A., et al. Preference for high concentrations of plant pyrrolizidine alkaloids in the specialist arctiid moth *Utetheisa ornatrix* depends on previous experience. En: Arthropod-Plant Interactions. 2013. Vol. 7, no. 2, p. 169–175.
27. HARTMANN, T. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. En: Planta. 1999. Vol. 209, no. 4, p. 483–495.
28. WANG, Linzhu, et al. Independent recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for safe accumulation of sequestered pyrrolizidine alkaloids

- in grasshoppers and moths. En: PLOS ONE. 2012. Vol. 7, no. 2, p. 1–10.
29. NAUMANN, C.; HARTMANN, T. y OBER, D. Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. Vol. 99, no. 9, p. 6085–6090.
30. HARTMANN, T., et al. Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. En: Insect biochemistry and molecular biology. 2001. Vol. 31, no. 11, p. 1041–1056.
31. HARTMANN, T., et al. Acquired and partially de novo synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. En: Journal of Chemical Ecology. 2004. Vol. 30, no. 2, p. 229–254.
32. HARTMANN, T., et al. Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. En: Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2003. Vol. 33, no. 5, p. 515–523.
33. HARTMANN, T., et al. Phenological fate of plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. En: Chemoecology. 2004. Vol. 14, no. 3–4, p. 207–216.
34. MEINWALD, J. y MEINWALD, Y. C. Structure and synthesis of the major

- components in the hairpencil secretion of a male butterfly, *Lycorea ceres* ceres (Cramer). En: Journal of the American Chemical Society. 1966. Vol. 88, no. 6, p. 1305–1310.
35. APLIN, R. T.; BENN, M. H. y ROTHSCHILD, M. Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). En: Nature. 1968. Vol. 219, p. 747–748.
36. BILLER, A., et al. Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemical and chemoecological aspects. En: Phytochemistry. 1994. Vol. 35, no. 3, p. 615–619.
37. LOAIZA, J. C. M. N., et al. *Ceroplastes albolineatus*, the first scale insect shown to sequester pyrrolizidine alkaloids from its host-plant *Pittocaulon praecox*. En: Chemoecology. 2007. Vol. 17, no. 2, p. 109.
38. MCLAIN, D. K. Coevolution: müllerian mimicry between a plant bug (Miridae) and a seed bug (Lygaeidae) and the relationship between host plant choice and unpalatability. En: Oikos. 1984. P. 143–148.
39. MCLAIN, D. K. y SHURE, D. J. Host plant toxins and unpalatability of *Neacoryphus bicrucis* (Hemiptera: Lygaeidae). En: Ecological Entomology. 1985. Vol. 10, no. 3, p. 291–298.
40. KLITZKE, C. F. y TRIGO, J. R. New records of pyrrolizidine alkaloid-feeding insects. Hemiptera and Coleoptera on *Senecio brasiliensis*. En: Biochemical Systematics and Ecology. 2000. Vol. 28, no. 4, p. 313–318.

41. MARTINS, C. H. y TRIGO, J. R. Pyrrolizidine Alkaloids in the Pericopine Moth *Scearctia figulina* (Erebidae: Arctiinae): Metabolism and Chemical Defense. En: Journal of the Brazilian Chemical Society. 2016. Vol. 27, no. 8, p. 1437–1443.
42. CONNER, W. E., et al. Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): role of a pheromone derived from dietary alkaloids. En: Behavioral Ecology and Sociobiology. 1981. Vol. 9, no. 3, p. 227–235.
43. CONNER, W. E., et al. Courtship pheromone production and body size as correlates of larval diet in males of the arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. En: Journal of Chemical Ecology. 1990. Vol. 16, no. 2, p. 543–552.
44. BELL, T. W., et al. Stereochemical course of pheromone biosynthesis in the arctiid moth, *Cretonotos transiens*. En: Cellular and Molecular Life Sciences. 1984. Vol. 40, no. 7, p. 713–714.
45. BEZZERIDES, A., et al.. Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinae*). En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004. Vol. 101, no. 24, p. 9029–9032.
46. BEZZERIDES, A. y EISENER, T. Apportionment of nuptial alkaloidal gifts by a multiply-mated female moth (*Utetheisa ornatrix*): eggs individually receive alkaloid from more than one male source. En: Chemoecology. 2002. Vol. 12, no. 4, p. 213–218.

47. BEZZERIDES, A. L.; IYENGAR, V. K. y EISNER, T. Female promiscuity does not lead to increased fertility or fecundity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). En: Journal of Insect Behavior. 2008. Vol. 21, no. 4, p. 213–221.
48. FRANCO, M. S. y COGNI, R. Common-garden experiments reveal geographical variation in the interaction among *Crotalaria pallida* (Leguminosae: Papilionideae), *Utetheisa ornatrix* L. (Lepidoptera: Arctiidae), and extrafloral nectary visiting ants. En: Neotropical Entomology. 2013. Vol. 42, no. 3, p. 223–229.
49. WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. En: Phytochemistry. 2003. Vol. 64, no. 1, p. 3–19.
50. RIZK, A. F. Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. En : FLORIDA, CRC press: (ed.). EE.UU., 1990. p. 1–91.
51. HALL, D. W. Bella Moth, Rattlebox Moth, Inornate Moth or Calico Moth, *Utetheisa ornatrix* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Arctiidae: Arctiinae). Document EENY-358 (IN644), Series of Featured Creatures. Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 2008. P. 1–6.
52. BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. En: Journal of Chromatography A. 2000. Vol. 885, no. 1, p. 115–127.

53. BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). En: Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 2007. Vol. 70, no. 2, p. 151–162.
54. SALVATORE FANALI, HADDAD, Paul R.; POOLE, Colin y LLOYD, David. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. In : Elsevier. Canada : Elsevier: Toronto, 2013. p. 520.
55. ETTRE, L. S. Chromatography: The separation technique of the 20th century. En: Chromatographia. 2000. Vol. 51, no. 1–2, p. 7–17.
56. MARTIN, A. J. P. y SYNGE, R. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. En: Biochemical Journal. 1941. Vol. 35, no. 12, p. 1358.
57. KINGDON, K. H. A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. En: Physical Review. 1923. Vol. 21, no. 4, p. 408.
58. MAKAROV, A. A. U.S. Patent N°. 5,886,346. 1999. Washington, DC: U.S.
59. MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. En: Analytical Chemistry. 2000. Vol. 72, no. 6, p. 1156–1162.
60. ELIUK, S. y MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation. En: Annual Review of Analytical Chemistry. 2015. Vol. 8, p. 61–80.

61. MIKAIA, Anzor, et al.. NIST Standard Reference Database 1A. . 2008.
62. NEUNER-JEHLE, N.; NESVADBA, H. y SPITELLER, G. Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt.: Pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. En: Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly. 1965. Vol. 96, no. 2, p. 321–338.
63. AVULA, B., et al.. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. En: Food chemistry. 2015. Vol. 178, p. 136–148.
64. ZHANG, Wei, et al.. Ultra-Performance Liquid Chromatography Hyphenated with Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Necine-Core-Structure Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria sessiliflora* L. without all Corresponding Standards. En: Phytochemical Analysis. 2017. Vol. 28, p. 365–373.
65. MALCOLM, S. B. Milkweeds, monarch butterflies and the ecological significance of cardenolides. En: Chemoecology. 1994. Vol. 5, no. 3–4, p. 101–117.
66. KELLEY, K. C., JOHNSON, K. S. y MURRAY, M. Temporal modulation of pyrrolizidine alkaloid intake and genetic variation in performance of *Utetheisa ornatix* caterpillars. En: Journal of chemical ecology. 2002. Vol. 28, no. 4, p. 669–685.

67. DEL CAMPO, M. L.; SMEDLEY, S. R. y EISNER, T. Reproductive benefits derived from defensive plant alkaloid possession in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. Vol. 102, no. 38, p. 13508–13512.
68. HARTMANN, T., et al. Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. En: Insect biochemistry and molecular biology. 2004. Vol. 35, no. 5, p. 391–411.
69. ROWELL-RAHIER, M. y PASTEELS, J. M. Economics of chemical defense in Chrysomelinae. En: Journal of Chemical Ecology. 1986. Vol. 12, no. 5, p. 1189–1203.
70. BOWERS, M. D. Chemistry and coevolution: iridoid glycosides, plants, and herbivorous insects. En: Chemical mediation of coevolution. 1988. P. 133–165.
71. FORDYCE, J. A. The lethal plant defense paradox remains: inducible host-plant aristolochic acids and the growth and defense of the pipevine swallowtail. En: Entomologia experimentalis et applicata. 2001. Vol. 100, no. 3, p. 339–346.
72. KEARSLEY, M. J. y WHITHAM, T. G. Guns and butter: a no cost defense against predation for *Chrysomela confluenta*. En: Oecologia. 1992. Vol. 92, no. 4, p. 556–562.
73. COHEN, J. A. Differences and similarities in cardenolide contents of queen

- and monarch butterflies in Florida and their ecological and evolutionary implications. En: Journal of Chemical Ecology. 1985. Vol. 11, no. 1, p. 85–103.
74. BJÖRKMAN, C. y LARSSON, S. Pine sawfly defence and variation in host plant resin acids: a trade-off with growth. En: Ecological Entomology. 1991. Vol. 16, no. 3, p. 283–289.
75. BOWERS, M. D. y COLLINGE, S. K. Fate of iridoid glycosides in different life stages of the buckeye, *Junonia coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). En: Journal of Chemical Ecology. 1992. Vol. 18, no. 6, p. 817–831.
76. CAMARA, M. D. Physiological mechanisms underlying the costs of chemical defence in *Junonia coenia* Hu" bner (Nymphalidae): A gravimetric and quantitative genetic analysis. En: Evolutionary Ecology. 1997. Vol. 11, no. 4, p. 451.
77. FORDYCE, J. A. y NICE, C. C. Antagonistic, stage-specific selection on defensive chemical sequestration in a toxic butterfly. En: Evolution. 2008. Vol. 62, no. 7, p. 1610–1617.
78. SILVA, K. L. y TRIGO, J. R. Structure–activity relationships of pyrrolizidine alkaloids in insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. En: Journal of chemical ecology. 2002. Vol. 28, no. 4, p. 657–668.
79. EDGAR, J. A.; BOPPRÉ, M. y KAUFMANN, E. Insect-synthesised retronecine ester alkaloids: precursors of the common arctiine (Lepidoptera)

- pheromone hydroxydanaidal. En: Journal of chemical ecology. 2007. Vol. 33, no. 12, p. 2266–2280.
80. BEUERLE, T., et al. Absolute configuration of the creatonotines and callimorphines, two classes of arctiid-specific pyrrolizidine alkaloids. En: Insect biochemistry and molecular biology. 2007. Vol. 37, no. 1, p. 80–89.
81. AGRAWAL, A. A. y FISHBEIN, M. Phylogenetic escalation and decline of plant defense strategies. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. Vol. 105, no. 29, p. 10057–10060.
82. AGRAWAL, A. A.; SALMINEN, J. P. y FISHBEIN, M. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): evidence for escalation. En: Evolution. 2009. Vol. 63, no. 3, p. 663–673.
83. PRIESTAP, H. A. Minor aristolochic acids from *Aristolochia argentina* and mass spectral analysis of aristolochic acids. En: Phytochemistry. 1987. Vol. 26, no. 2, p. 518–529.
84. BROWN JR, K. S., et al.. Neotropical swallowtails: chemistry of food plant relationships, population ecology, and biosystematics. En : . Gainesville, Florida : Scientific Publishers, 1995. p. 405–446.
85. JOSHI, J. y VRIELING, K. The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. En: Ecology Letters. 2005. Vol. 8, no. 7, p. 704–714.
86. MEIJDEN, E. Plant defence, an evolutionary dilemma: contrasting effects of

(specialist and generalist) herbivores and natural enemies. En: *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1996. Vol. 80, no. 1, p. 307–310.

BIBLIOGRAFÍA

AGRAWAL, A. A.; SALMINEN, J. P. y FISHBEIN, M. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): evidence for escalation. En: *Evolution*. 2009. Vol. 63, no. 3, p. 663–673.

APLIN, R. T. y ROTHSCCHILD, M.. Poisonous alkaloids in the body tissues of the garden tiger moth (*Arctia caja* L.) and the cinnabar moth (*Tyria jacobaeae* L.)(Lepidoptera). En: *Toxins of Animal and Plant Origin*. 1972. Vol. 2, p. 579–595.

APLIN, R. T.; BENN, M. H. y ROTHSCCHILD, M. Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). En: *Nature*. 1968. Vol. 219, p. 747–748.

BELL, T. W., et al. Stereochemical course of pheromone biosynthesis in the arctiid moth, *Cretonotos transiens*. En: *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1984. Vol. 40, no. 7, p. 713–714.

BEUERLE, T., et al. Absolute configuration of the cretonotines and callimorphines, two classes of arctiid-specific pyrrolizidine alkaloids. En: *Insect biochemistry and molecular biology*. 2007. Vol. 37, no. 1, p. 80–89.

BEZZERIDES, A. L.; IYENGAR, V. K. y EISNER, T. Female promiscuity does not lead to increased fertility or fecundity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). En: *Journal of Insect Behavior*. 2008. Vol. 21, no. 4, p. 213–221.

BEZZERIDES, A. y EISENER, T. Apportionment of nuptial alkaloidal gifts by a multiply-mated female moth (*Utetheisa ornatrix*): eggs individually receive alkaloid

from more than one male source. En: Chemoecology. 2002. Vol. 12, no. 4, p. 213–218.

BEZZERIDES, A., et al.. Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinae*). En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004. Vol. 101, no. 24, p. 9029–9032.

BILLER, A., et al. Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemical and chemoecological aspects. En: Phytochemistry. 1994. Vol. 35, no. 3, p. 615–619.

BJÖRKMAN, C. y LARSSON, S. Pine sawfly defence and variation in host plant resin acids: a trade-off with growth. En: Ecological Entomology. 1991. Vol. 16, no. 3, p. 283–289.

BOPPRÉ, M. Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (Pyrrolizidine alkaloids). En: Naturwissenschaften. 1986. Vol. 73, no. 1, p. 17–26.

BOWERS, M. D. y COLLINGE, S. K. Fate of iridoid glycosides in different life stages of the buckeye, *Junonia coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). En: Journal of Chemical Ecology. 1992. Vol. 18, no. 6, p. 817–831.

CLARKE, C. A., et al. Mating attempts between the Scarlet Tiger Moth, *Callimorpha dominula* L., and the Cinnabar Moth, *Tyria jacobaeae* L. (Lepidoptera: Arctiidae), involve a common sex pheromone composition. En: Cellular and Molecular Life Sciences. 1996. Vol. 52, no. 6, p. 636–638.

COGNI, R.; TRIGO, J. R. y FUTUYMA, D. J. A free lunch no cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth. En: Molecular Ecology. 2012. Vol. 21, no. 24, p. 6152–6162.

COHEN, J. A. Differences and similarities in cardenolide contents of queen and monarch butterflies in Florida and their ecological and evolutionary implications. En: Journal of Chemical Ecology. 1985. Vol. 11, no. 1, p. 85–103.

CONNER, W. E., et al. Courtship pheromone production and body size as correlates of larval diet in males of the arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. En: Journal of Chemical Ecology. 1990. Vol. 16, no. 2, p. 543–552.

CONNER, W. E., et al. Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): role of a pheromone derived from dietary alkaloids. En: Behavioral Ecology and Sociobiology. 1981. Vol. 9, no. 3, p. 227–235.

DEL CAMPO, M. L.; SMEDLEY, S. R. y EISNER, T. Reproductive benefits derived from defensive plant alkaloid possession in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. Vol. 102, no. 38, p. 13508–13512.

EDGAR, J. A., et al. Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth “metabolite.” En: Tetrahedron Letters. 1980. Vol. 21, no. 14, p. 1383–1384.

EDGAR, J. A.; BOPPRÉ, M. y KAUFMANN, E. Insect-synthesised retronecine ester alkaloids: precursors of the common arctiine (Lepidoptera) pheromone hydroxydanaidal. En: Journal of chemical ecology. 2007. Vol. 33, no. 12, p. 2266–

2280.

EHMKE, A., et al. Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae*. En: Zeitschrift Naturforschung C. 1990. Vol. 45, no. 11–12, p. 1185–1192.

FORDYCE, J. A. y NICE, C. C. Antagonistic, stage-specific selection on defensive chemical sequestration in a toxic butterfly. En: Evolution. 2008. Vol. 62, no. 7, p. 1610–1617.

FRANCO, M. S. y COGNI, R. Common-garden experiments reveal geographical variation in the interaction among *Crotalaria pallida* (Leguminosae: Papilionideae), *Utetheisa ornatrix* L. (Lepidoptera: Arctiidae), and extrafloral nectary visiting ants. En: Neotropical Entomology. 2013. Vol. 42, no. 3, p. 223–229.

HARTMANN, T. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. En: Planta. 1999. Vol. 209, no. 4, p. 483–495.

HARTMANN, T. y WITTE, L. Pyrrolizidine alkaloids: chemical, biological and chemoecological aspects. En: Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. 1995. Vol. 9, no. 1, p. 155–233.

HARTMANN, T. y ZIMMER, M. Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. En: Journal of Plant Physiology. 1986. Vol. 122, no. 1, p. 67–80.

HARTMANN, T., et al. Acquired and partially de novo synthesized pyrrolizidine

alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. En: Journal of Chemical Ecology. 2004. Vol. 30, no. 2, p. 229–254.

HARTMANN, T., et al. Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. En: Insect biochemistry and molecular biology. 2005. Vol. 35, no. 10, p. 1083–1099.

HARTMANN, T., et al. Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. En: Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2003. Vol. 33, no. 5, p. 515–523.

HARTMANN, T., et al. Phenological fate of plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. En: Chemoecology. 2004. Vol. 14, no. 3–4, p. 207–216.

HARTMANN, T., et al. Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. En: Insect biochemistry and molecular biology. 2001. Vol. 31, no. 11, p. 1041–1056.

HARTMANN, T., et al. Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. En: Planta. 1989. Vol. 177, no. 1, p. 98–107.

HARTMANN, T., et al. Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. En: Insect biochemistry and molecular biology. 2004. Vol. 35, no. 5, p. 391–411. ROWELL-RAHIER, M. y PASTEELS, J. M. Economics of chemical defense in

Chrysomelinae. En: Journal of Chemical Ecology. 1986. Vol. 12, no. 5, p. 1189–1203.

HARTMANN, T., et al. Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). En: Biochemical Systematics and Ecology. 1990. Vol. 18, no. 7–8, p. 549–554.

HOINA, A., et al. Preference for high concentrations of plant pyrrolizidine alkaloids in the specialist arctiid moth *Utetheisa ornatrix* depends on previous experience. En: Arthropod-Plant Interactions. 2013. Vol. 7, no. 2, p. 169–175.

JOSHI, J. y VRIELING, K. The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. En: Ecology Letters. 2005. Vol. 8, no. 7, p. 704–714.

KEARSLEY, M. J. y WHITHAM, T. G. Guns and butter: a no cost defense against predation for *Chrysomela confluenta*. En: Oecologia. 1992. Vol. 92, no. 4, p. 556–562.

KELLEY, K. C., JOHNSON, K. S. y MURRAY, M. Temporal modulation of pyrrolizidine alkaloid intake and genetic variation in performance of *Utetheisa ornatrix* caterpillars. En: Journal of chemical ecology. 2002. Vol. 28, no. 4, p. 669–685.

KLITZKE, C. F. y TRIGO, J. R. New records of pyrrolizidine alkaloid-feeding insects. Hemiptera and Coleoptera on *Senecio brasiliensis*. En: Biochemical Systematics and Ecology. 2000. Vol. 28, no. 4, p. 313–318.

KRASNOFF, S. B. y ROELOFS, W. L. Quantitative and qualitative effects of larval diet on male scent secretions of *Estigmene acrea*. En: Journal of Chemical Ecology. 1989. Vol. 15, no. 3, p. 1077–1093.

L'EMPEREUR, et al. Pyrrolizidine alkaloids from *Hackelia californica* and *Gnophaela latipennis*, an *H. californica*-hosted arctiid moth. En: Journal of Natural Products. 1989. Vol. 52, no. 2, p. 360–366.

LOAIZA, J. C. M. N., et al. *Ceroplastes albolineatus*, the first scale insect shown to sequester pyrrolizidine alkaloids from its host-plant *Pittocaulon praecox*. En: Chemoecology. 2007. Vol. 17, no. 2, p. 109.

MARTINS, C. H. y TRIGO, J. R. Pyrrolizidine Alkaloids in the Pericopine Moth *Scearctia figulina* (Erebidae: Arctiinae): Metabolism and Chemical Defense. En: Journal of the Brazilian Chemical Society. 2016. Vol. 27, no. 8, p. 1437–1443.

MARTINS, C. H., et al. Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a specialist herbivore. En: PLOS ONE. 2015. Vol. 10, p. 2017.

MEINWALD, J. y MEINWALD, Y. C. Structure and synthesis of the major components in the hairpencil secretion of a male butterfly, *Lycorea ceres ceres* (Cramer). En: Journal of the American Chemical Society. 1966. Vol. 88, no. 6, p. 1305–1310.

NAUMANN, C.; HARTMANN, T. y OBER, D. Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired

pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. Vol. 99, no. 9, p. 6085–6090.

RIZK, A. F. Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. En : FLORIDA, CRC press: (ed.). EE.UU., 1990. p. 1–91.

SCHNEIDER, D. Perspectives in chemoreception and behavior. En : The strange fate of pyrrolizidine alkaloids. 1a Edición. New York : Springer, 1987. p. 123–142.

SCHULZ, S., et al. Insect pheromone biosynthesis: stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens*. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993. Vol. 90, no. 14, p. 6834–6838.

SCHULZ, S., et al. Insect pheromone biosynthesis: Stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens* (Lepidoptera, Arctiidae). En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993. Vol. 90, no. 14, p. 6834–6838.

SILVA, K. L. y TRIGO, J. R. Structure–activity relationships of pyrrolizidine alkaloids in insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. En: Journal of chemical ecology. 2002. Vol. 28, no. 4, p. 657–668.

TRIGO, J. R. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. En: Phytochemistry Reviews. 2011. Vol. 10, no. 1, p. 83–98.

TRIGO, J. R., et al. Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. En:

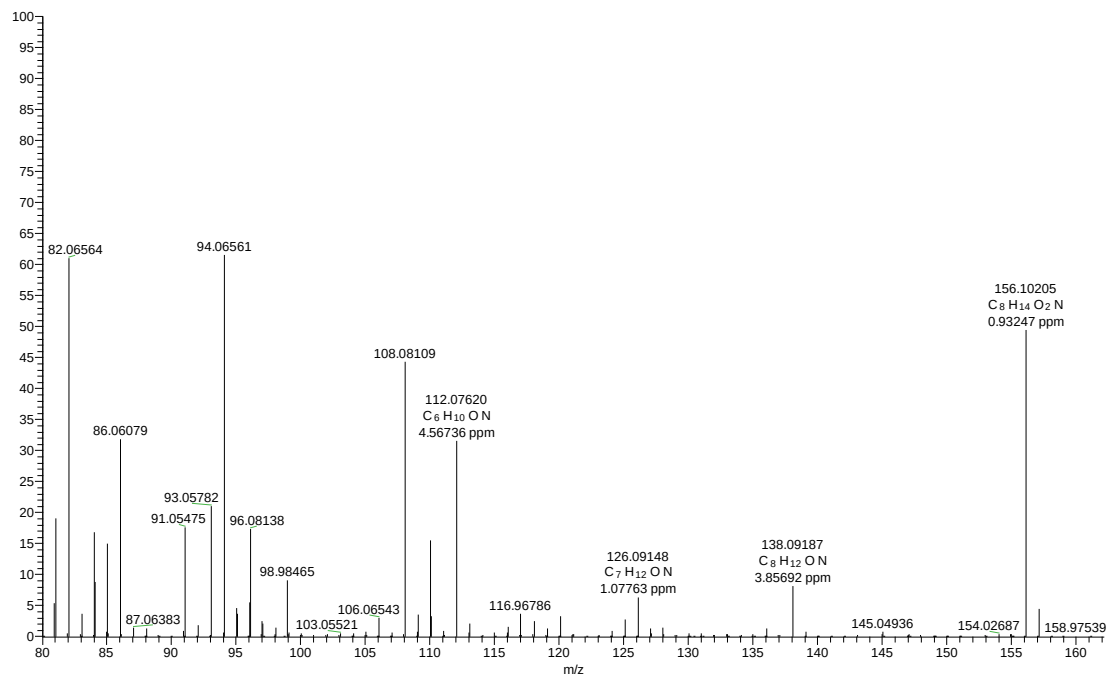
Journal of Chemical Ecology. 1993. Vol. 19, no. 4, p. 669–679.

WANG, Linzhu, et al. Independent recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for safe accumulation of sequestered pyrrolizidine alkaloids in grasshoppers and moths. En: PLOS ONE. 2012. Vol. 7, no. 2, p. 1–10.

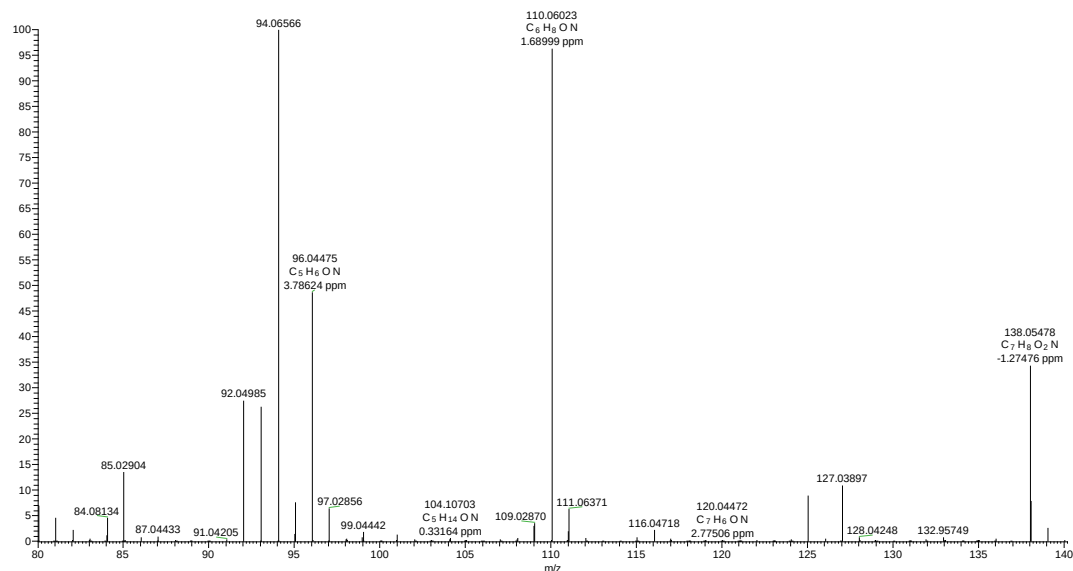
WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. En: Phytochemistry. 2003. Vol. 64, no. 1, p. 3–19.

WITTE, L.; EHMKE, A. y HARTMANN, T. Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids. En: Naturwissenschaften. 1990. Vol. 77, no. 11, p. 540–543.

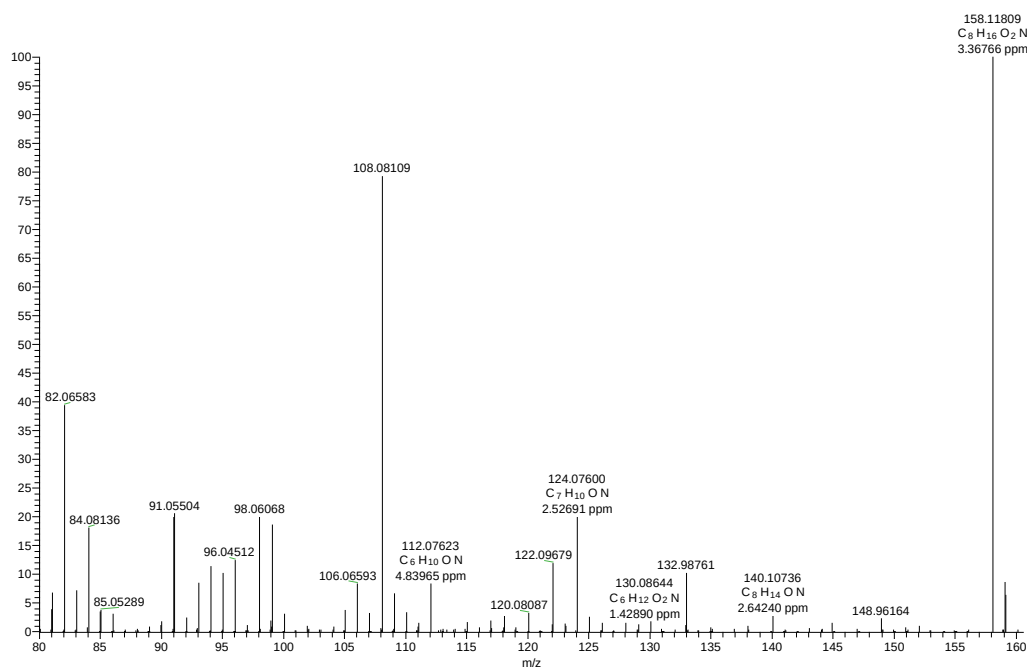
Anexos



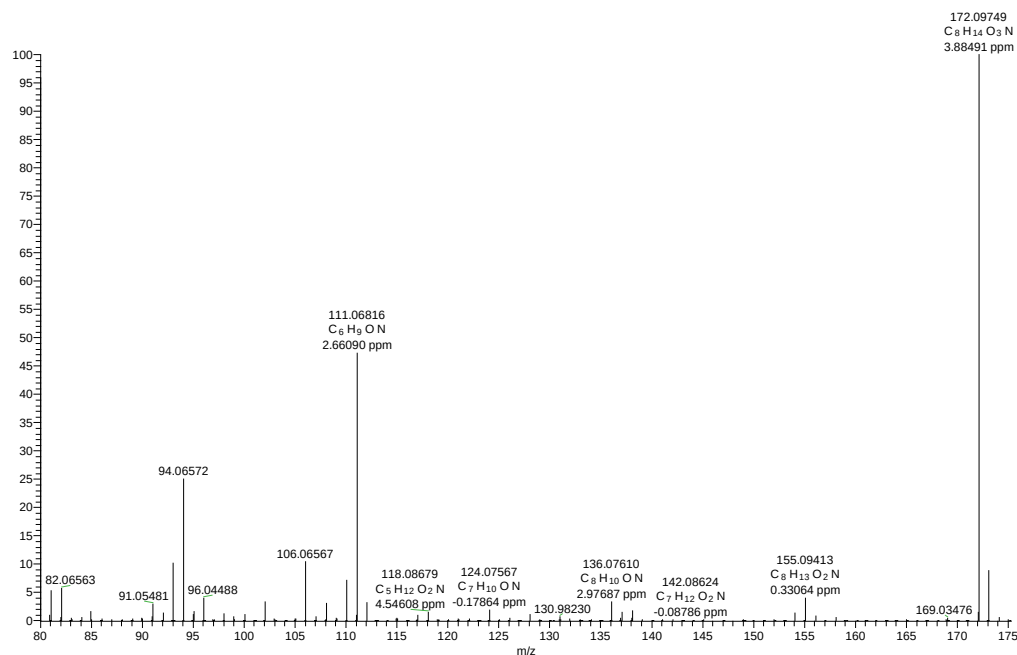
Anexo A. Espectro de masas de la retronecina, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



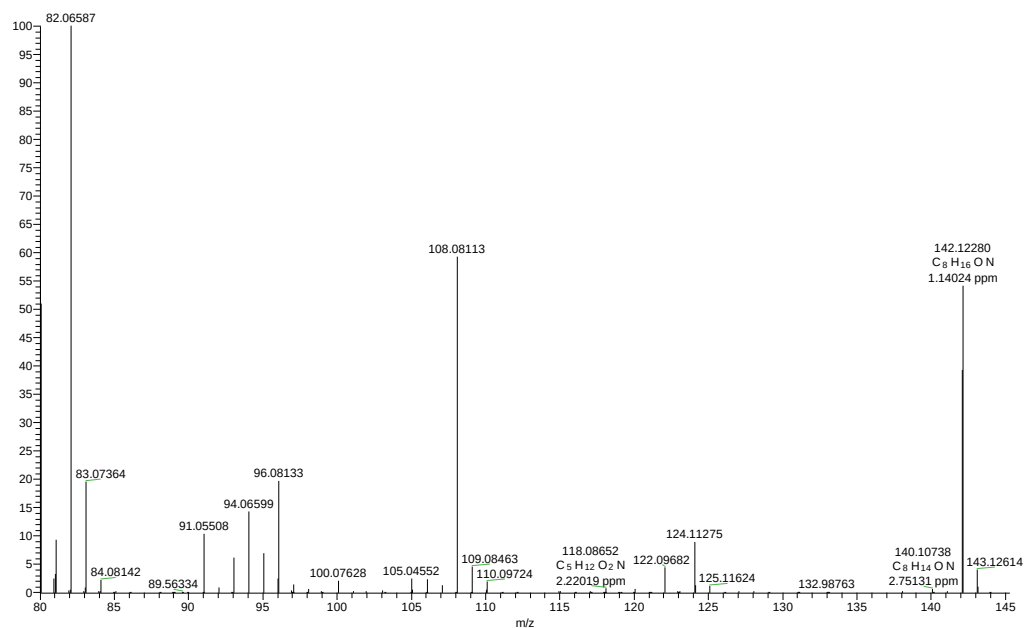
Anexo B. Espectro de masas de un PA no identificado con fórmula molecular C₇H₈O₂N, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



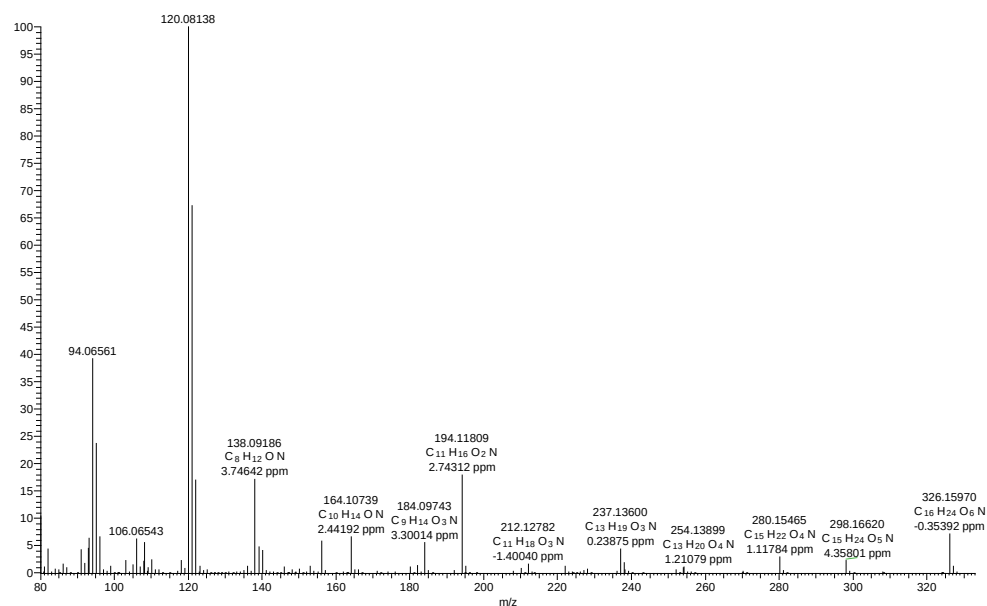
Anexo C. Espectro de masas de un PANO no identificado con fórmula molecular $C_8H_{16}O_2N$, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



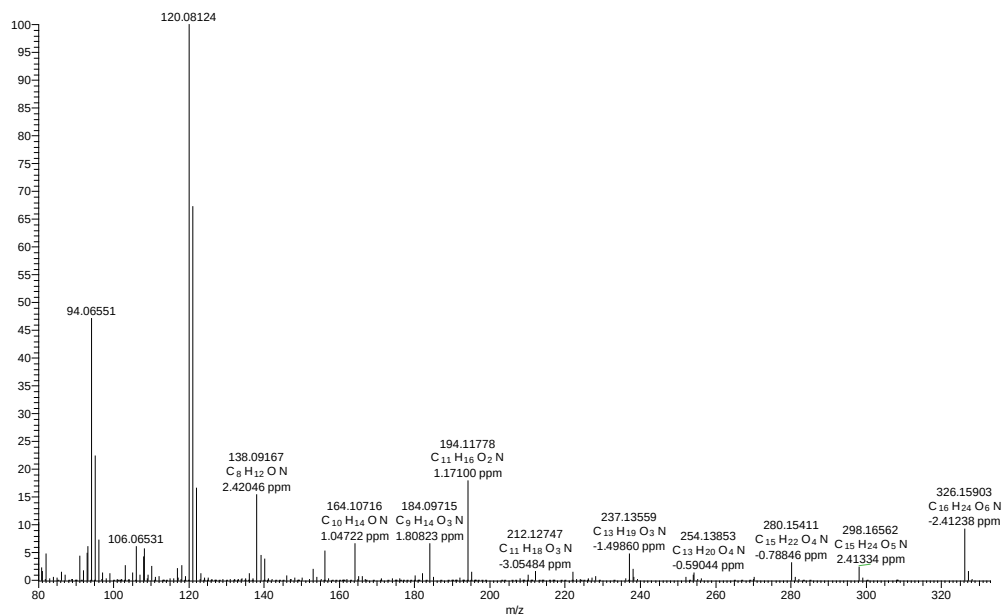
Anexo D. Espectro de masas de la retronecina N-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



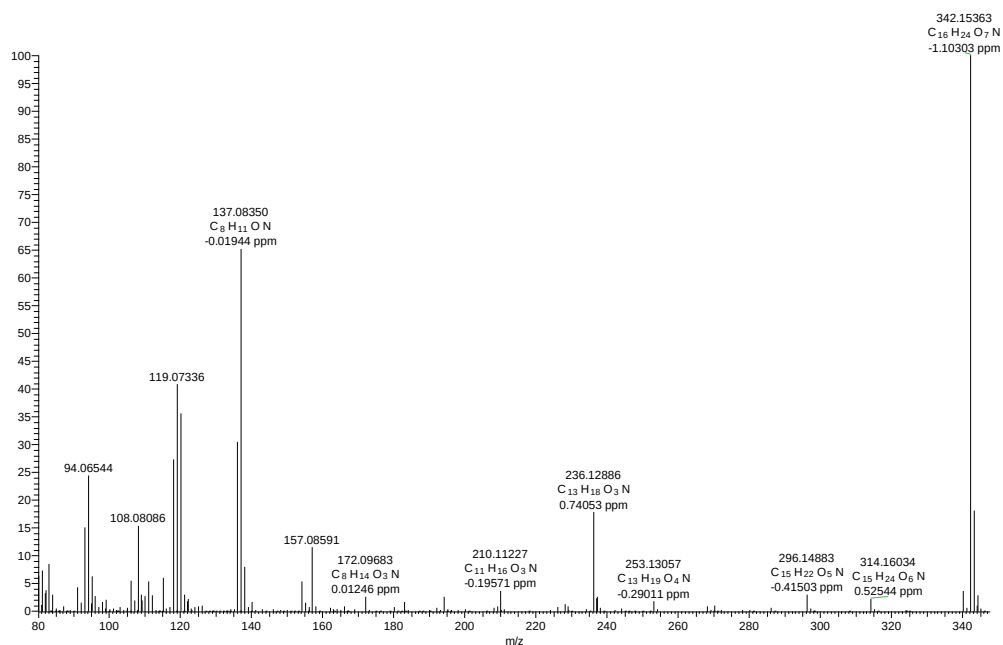
Anexo E. Espectro de masas de un PANO no identificado con fórmula molecular $C_8H_{16}ON$, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



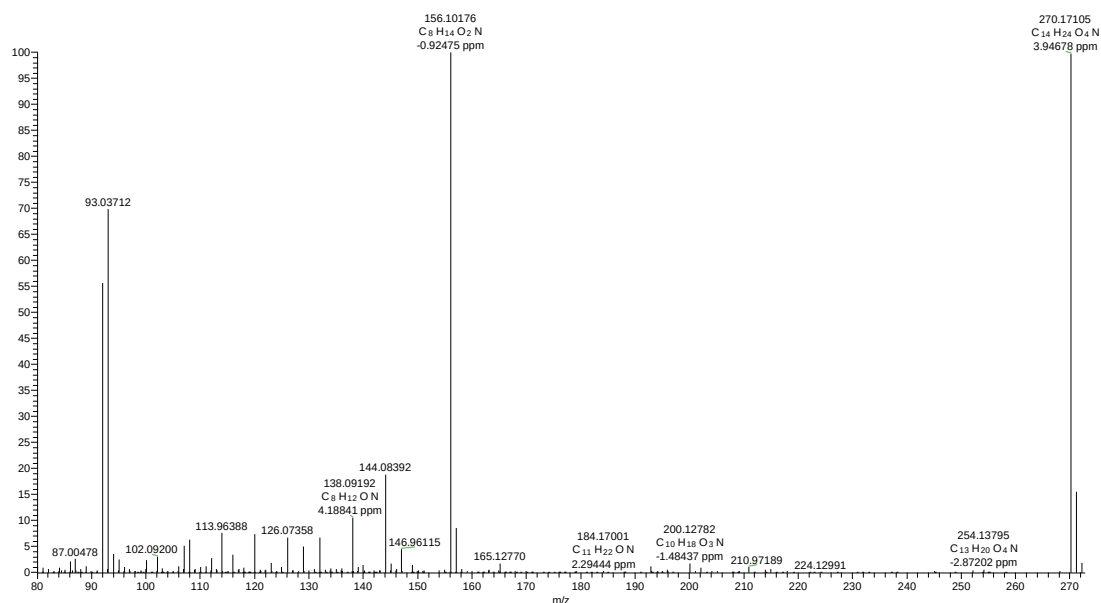
Anexo F. Espectro de masas de la monocrotalina, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 40 eV



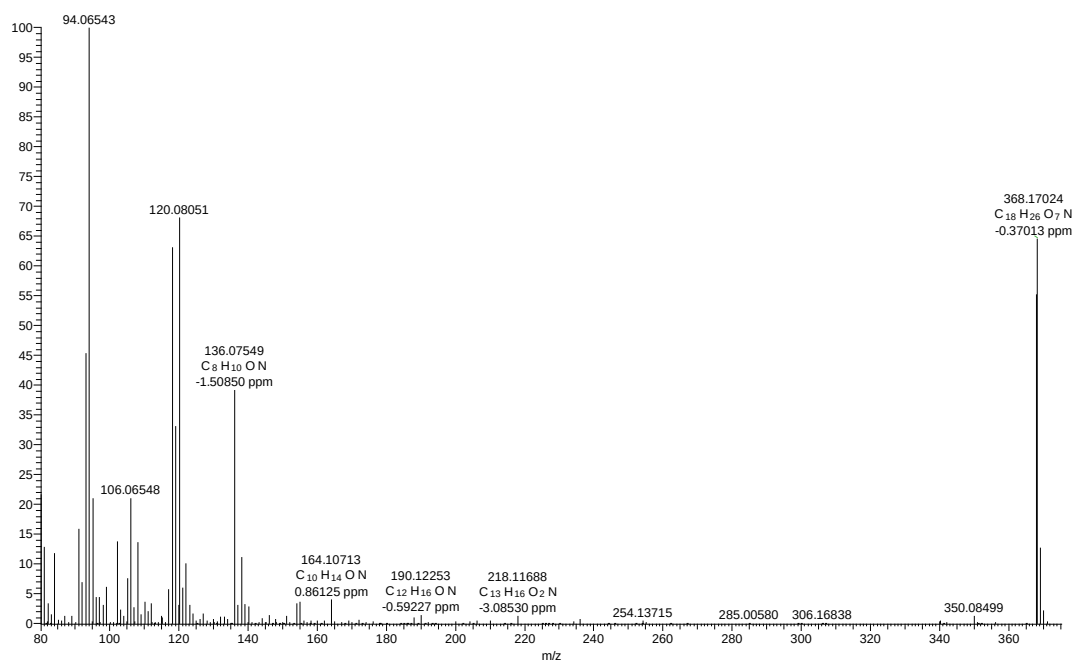
Anexo G. Espectro de masas del patrón de montocrotalina (estándar analítico, *Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EE.UU.), obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 40 eV



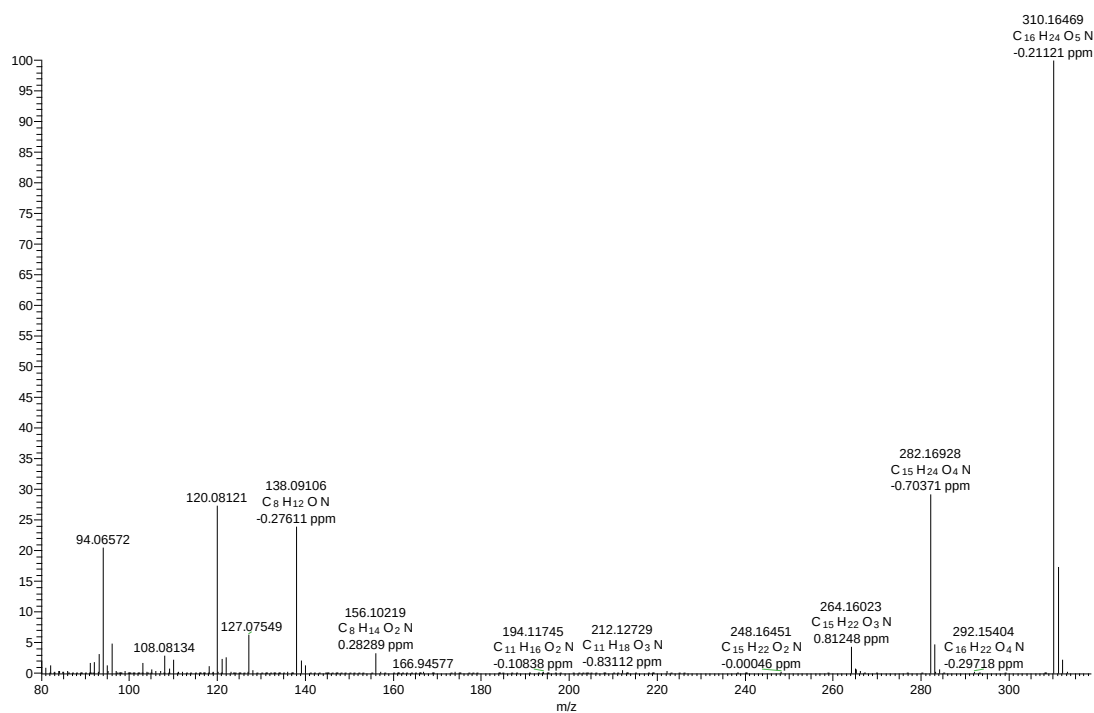
Anexo I. Espectro de masas de la monocrotalina N-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 40 eV.



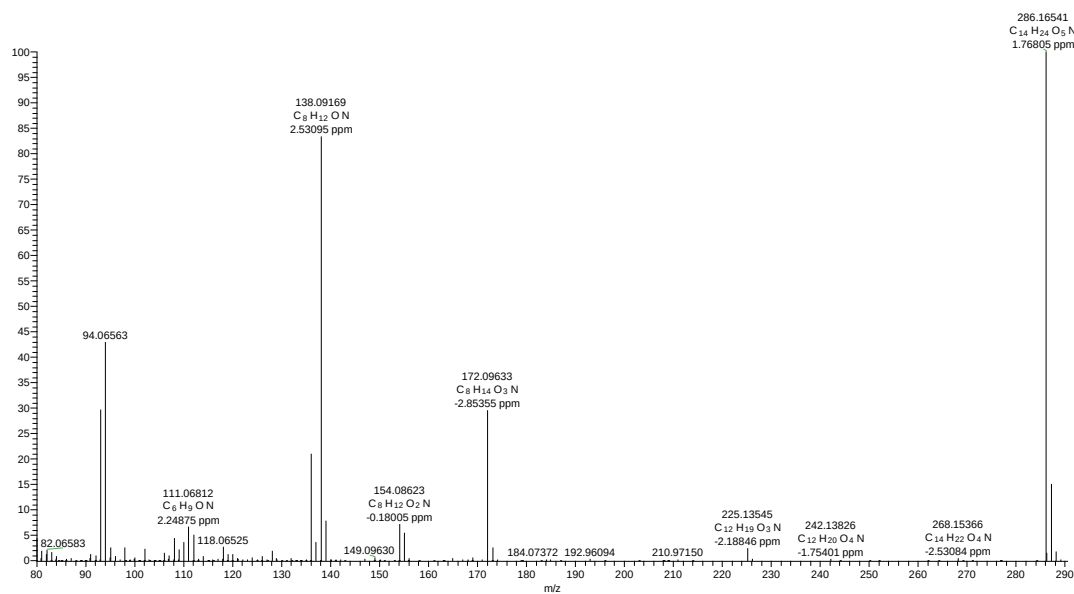
Anexo H. Espectro de masas de la *iso*-creatonotina B *N*-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 30 eV.



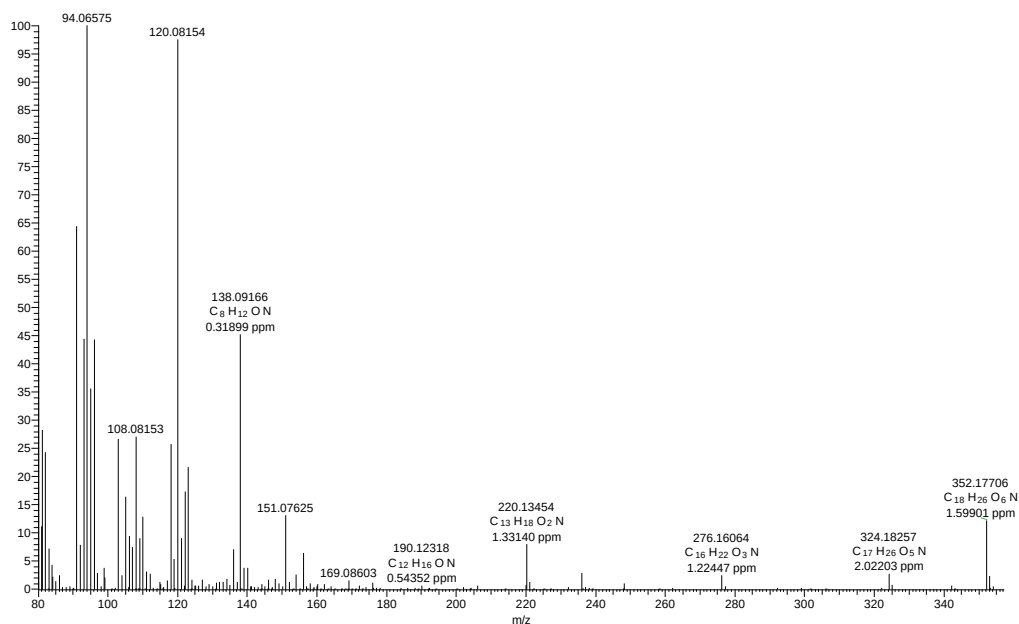
Anexo J. Espectro de masas de un PANO no identificado con fórmula molecular de C₁₈H₂₆O₇N, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



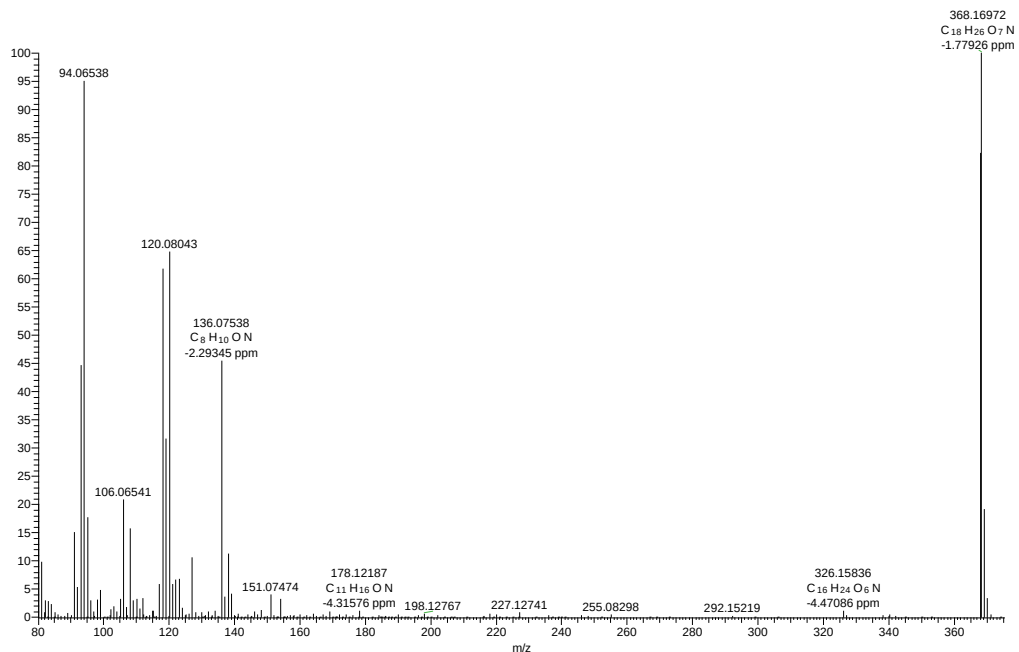
Anexo K. Espectro de masas de la crispatina, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



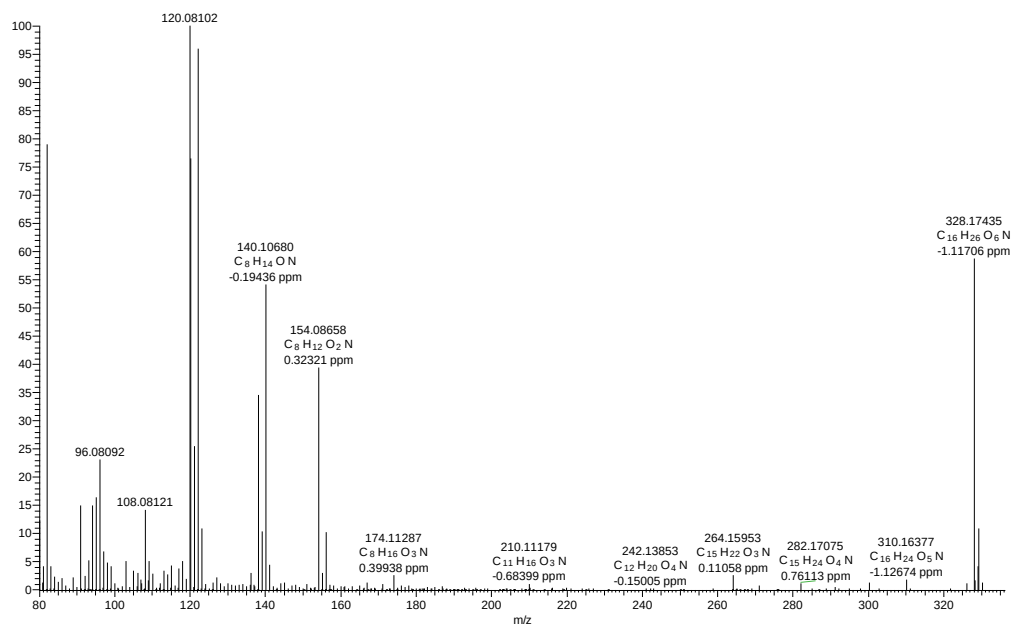
Anexo L Espectro de masas de la creatonotina B N-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 30 eV.



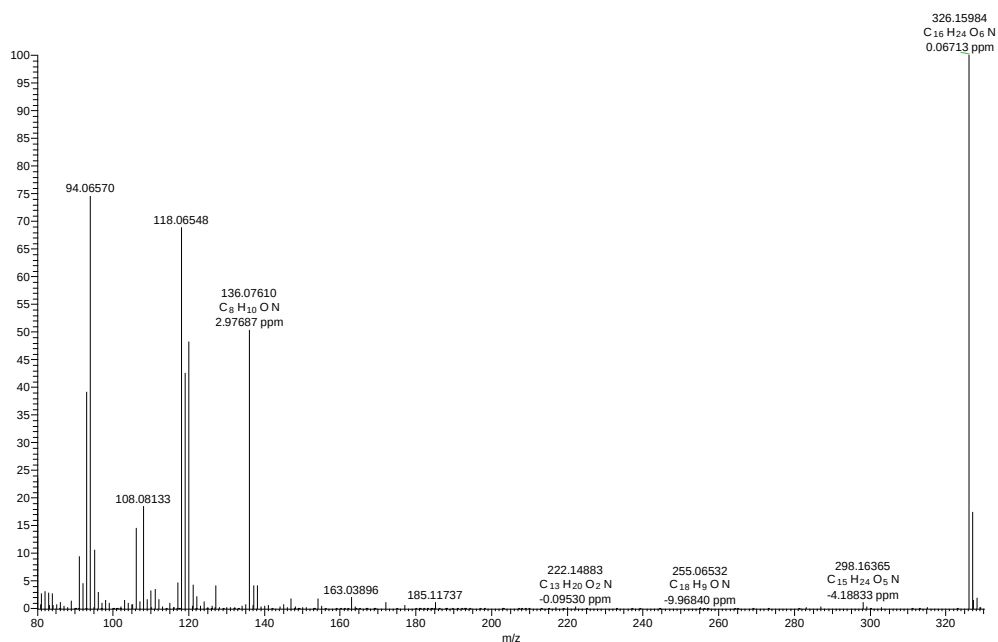
Anexo M. Espectro de masas de la usaramina, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



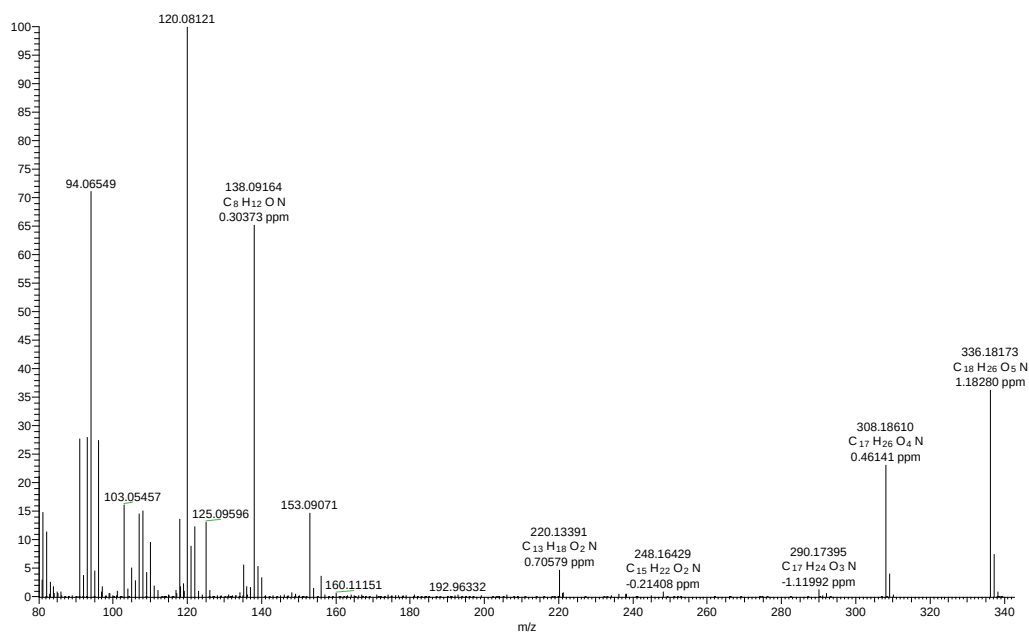
Anexo N. Espectro de masas de la usaramina N-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



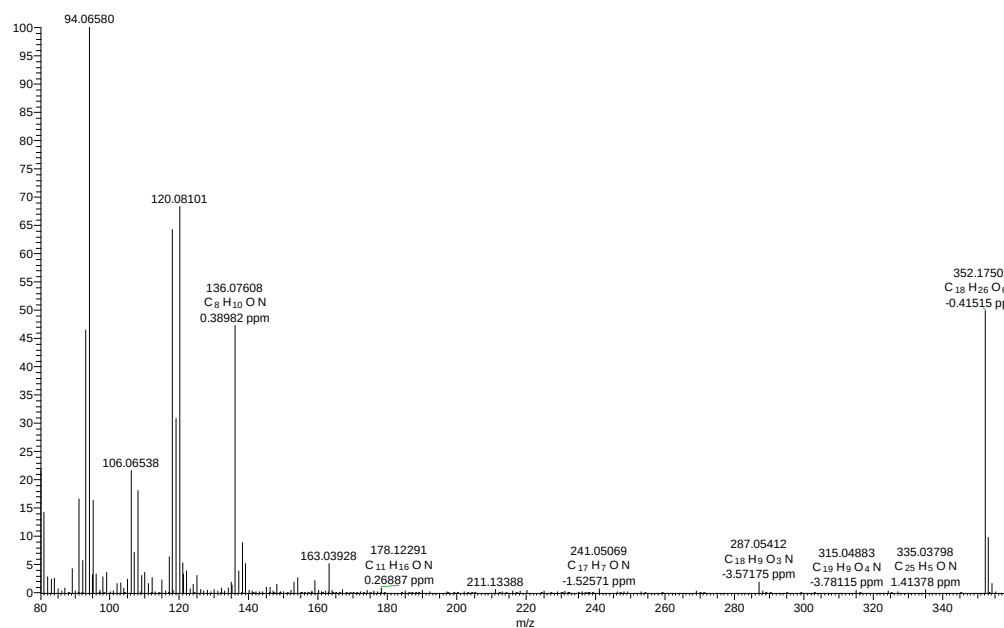
Anexo O. Espectro de masas de la retusina *N*-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



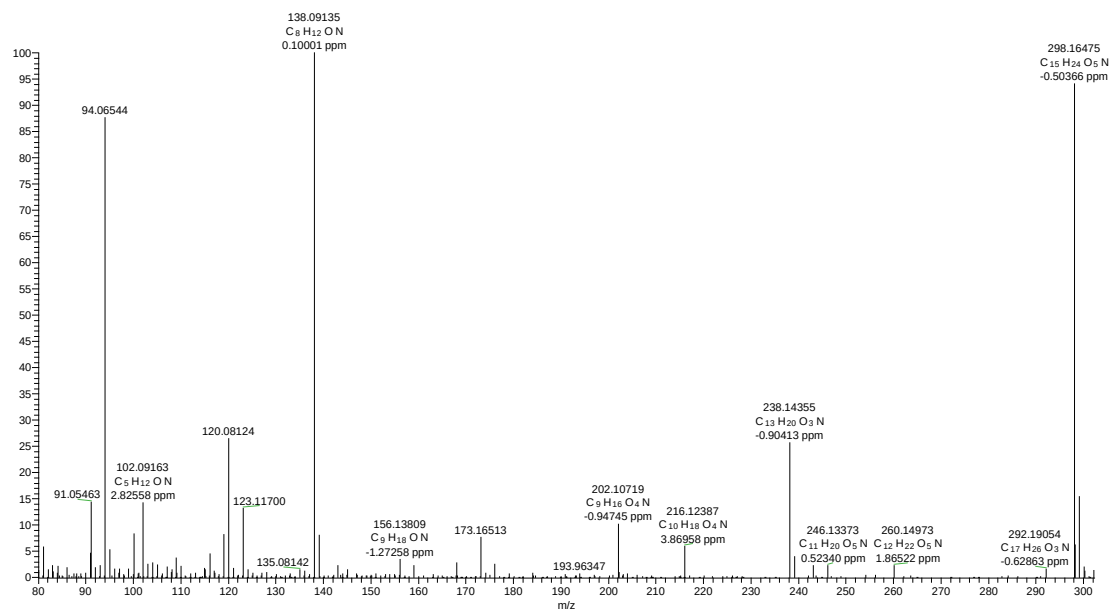
Anexo Q. Espectro de masas de la crispatina *N*-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



Anexo P. Espectro de masas de la integerrimina, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 40 eV.



Anexo R. Espectro de masas de la integerrimina N-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 50 eV.



Anexo S. Espectro de masas de la callimorfina *N*-óxido, obtenido por LC-Orbitrap-MS con una energía en la HCD de 30 eV.