

Determinación de alcaloides pirrolizidínicos y sus *N*-óxidos en diferentes tejidos de seis especies del género *Crotalaria*.

Julián Camilo Lozano Quintero

Trabajo de investigación como requisito parcial para optar por el título de Químico

Directora:

Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Co-directores:

Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.

Fausto Prada Chaparro, Químico.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

DEDICATORIA

A Jorge, por todos estos años llenos de amor y a John por fastidiar por todo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Samuel y Myrian por su apoyo en todo este proceso. A mis hermanas Laura y María por su compañía a lo largo de la vida.

A la doctora Elena E. Stashenko y el doctor Jairo René Martínez, por sus enseñanzas paciencia y colaboración.

A Fausto a quiero mucho, gracias por sus enseñanzas y amistad incondicional.

A mi alma gemela Mariana.

A mis amigos Yuli, Lady, Camila y Sam por todos esos momentos que marcaron cada etapa de mi camino universitario.

A mi compañera Jessy por ser mi hermana en el laboratorio.

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.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	22
1. Objetivos	25
1.1 General	25
1.2 Específicos	25
2. Marco Referencial	25
2.1 Cienciometría	25
2.2 Datos generales sobre las especies del género <i>Crotalaria</i>	29
2.3 Descripción de las especies de <i>Crotalaria</i>	29
2.4 Usos de algunas especies de <i>Crotalaria</i>	33
2.5 Alcaloides pirrolizidínicos	34
2.6 Biosíntesis de los alcaloides pirrolizidínicos.....	35
2.7 Toxicidad de los alcaloides pirrolizidínicos	36
2.8 Regulaciones	38
2.9 Métodos de extracción.....	40
2.10 Dispersión de la matriz en fase sólida	40
2.11 Cromatografía.....	41
2.12 Espectrometría de masas	42
2.13 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	43
2.14 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	44
3 Materiales y Métodos	47
3.1 Reactivos, solventes, materiales y equipos.....	47
3.2 Recolección e identificación del material vegetal.	48
3.3 Implementación del método de extracción de los PA y PANO en hojas de <i>Crotalaria</i>	48
3.4 Identificación tentativa de los PA y PANO en <i>Crotalaria</i> spp.	52
4 Resultados y análisis	60
4.4 Identificación de los PA reducidos con Zn usando GC-MS.....	65

5 Recomendaciones	91
6. Conclusiones	92
Referencias Bibliográficas	93
Apéndices	103

Lista de Figuras

- Figura 1.** Número de publicaciones durante el periodo de 1957-2017, en intervalos de diez años. Fecha de búsqueda: 3 de noviembre de 2017. Fuente: *Scopus* (*Elsevier*). Ecuación de búsqueda: ARTICLE TITLE-ABSTRACT-KEYWORDS (“*Crotalaria* pyrrolizidine alkaloids”)...... 277
- Figura 2.** *Crotalaria nitens*. Fuente: Julián Camilo Lozano Quintero, Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, UIS, 19 de octubre de 2017..... 299
- Figura 3.** Ejemplares del género *Crotalaria* que se estudiaron en el presente trabajo: a. *C. spectabilis*; b. *C. nitens*; c. *C. incana*; d. *C. retusa*; e. *C. pallida*; f. *C. maypurensis*. Fuente: Julián Camilo Lozano Quintero, Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, UIS, 17 de mayo de 2016. 31
- Figura 4.** Estructura básica de los PA y PANO de tipo retronecina..... 34
- Figura 5.** Ejemplos de los cuatro tipos de PA. 35
- Figura 6.** Esquema general de la biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos (senecionina)..... 36
- Figura 7.** Ruta de transformación de los alcaloides pirrolizidínicos a compuestos tóxicos en el hígado [49]. 38
- Figura 8.** Esquema del detector *Orbitrap* y ejemplo de una trayectoria de iones estable..... 46
- Figura 9.** Cromatógrafo líquido AT 1200 Series con analizador de tiempo de vuelo AT TOF-MS 6210 Series. Laboratorio: Análisis instrumental, CROM-MASS. Fuente: Fausto Prada, 17 de diciembre de 2016..... 52

- Figura 10.** Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC) acoplado a un detector de masas (*Orbitrap*), por medio de una interfaz HESI. Foto tomada por Dra. Elena Stashenko. Lugar: Laboratorio Makarov, CENIVAM-UIS, Bucaramanga. 56
- Figura 11.** Cromatógrafo de AT 6890 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas AT 5973 *Network*. Fuente: Julián Lozano, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de julio de 2017. 57
- Figura 12.** Curva de calibración de la retrorsina ($C_{18}H_{25}NO_7$, $[M+H]^+$: m/z 352.17546) obtenida por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS, operado en modo *full scan*. 63
- Figura 13.** Porcentaje de recuperación de la retrorsina en el método de extracción por MSPD, con tres tipos de soportes solidos (arena, C_{18} y florisil) y con metanol o metanol acidificado. ANOVA, prueba de comparación de medias usando diferencias mínimas significativas (DMS), $p < 0,05$, misma letra no hay diferencias significativas. Los datos fueron obtenidos por Fausto Prada, Jessica Bautista y el autor 64
- Figura 14.** Espectro de masas experimental (EI, 70 eV). de la 7-angeloilretronecina, obtenido por GC-MS. La sustancia está presente en el extracto MSPD de raíces de *C.nitens*, que fue sometido al proceso de reducción con Zn. 68
- Figura 15.** Ruta de fragmentación (EI,70 eV) de la 7-angeloilretronecina. 68
- Figura 16.** Espectro de masas experimental de la monocrotalina obtenido por GC-MS. EI (70 eV). 69
- Figura 17.** esquema de fragmentación de la monocrotalina propuesto por Neuner-Jehle (EI, 70 eV) 70

Figura 18. Generación del ion m/z 220 (16%), en el espectro obtenido por GC-MS (EI, 70 eV).	71
Figura 19. Perfil cromatográfico GC-MS de los PA, después de someter los PANO al proceso de reducción con Zn/H^+ . Extractos MSPD de semillas de <i>C. incana</i> . Columna DB-5MS, 60 m. Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).	71
Figura 20. Compuestos identificados en los extractos MSPD de las especies de <i>Crotalaria</i> spp. estudiadas.	72
Figura 21. Esquema de iones-fragmento característicos de los PA, obtenidos por UHPLC-ESI ⁺ -Q-Orbitrap-MS. Tomado con algunas modificaciones del artículo publicado por Zhang <i>et al.</i>	73
Figura 22. Esquema de fragmentación propuesto para la monocrotalina, según el espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-MS en modo <i>step scan</i> (HCD, 40 eV).	74
Figura 23. Fragmentograma de masas, obtenido por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-MS en modo <i>full scan</i> , basado en las corrientes iónicas extraídas para los alcaloides protonados $[M+H]^+$: monocrotalina ($C_{16}H_{24}NO_6$, m/z 326,15981), monocrotalina <i>N</i> -óxido ($C_{16}H_{24}NO_7$, m/z 342,15473), crispatina ($C_{16}H_{24}NO_5$, m/z 310,16490), crispatina <i>N</i> -óxido ($C_{16}H_{24}NO_6$, m/z 326,15981), intergerrimina ($C_{18}H_{26}NO_5$, m/z 336,18055) e intergerrimina <i>N</i> -óxido ($C_{18}H_{26}NO_5$, m/z 336,18055). Presentes en los extractos MSPD de hojas de <i>C. nitens</i> . A. Extracto crudo, B. Extracto sometido al proceso de reducción de los PANO con Zn/H^+	76

- Figura 24.** Espectros de masas de: A. Monocrotalina; B. Monocrotalina *N*-óxido; C. Intergerrimina; D. Intergerrimina *N*-óxido, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS operado en modo *full scan*. 77
- Figura 25.** Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la ursaramina *N*-óxido, [M+H]⁺ C₁₈H₂₆NO₇, *m/z* 368.17038. 78
- Figura 26.** Ruta de fragmentación propuesta por Ruan *et al.* para la monocrotalina *N*-óxido en el espectro obtenido por HPLC-MS/MS 79
- Figura 27.** Curva de calibración de la monocrotalina (C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 368,17038) obtenida por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS, operado en modo *full scan*. 85
- Figura 28.** Contenido de alcaloides pirrolizidínicos y sus *N*-óxidos en los diferentes partes de las seis especies de *Crotalaria* spp. estudiadas. 87
- Figura 29.** Cromatogramas basados en las corrientes iónicas extraídas [M+H]⁺, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS de los extractos MSPD aislados de las diferentes partes de: A. Semillas; B. Flores; C. Hojas y D. Raíces. 90

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Comparación de toxicidad entre algunos PA	37
Tabla 2. Reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados en este trabajo de investigación	47
Tabla 3. Condiciones de los seis experimentos realizados, con sus respectivas réplicas para la evaluación del método de extracción.	50
Tabla 4. Número de muestras recolectadas para las diferentes partes de <i>Crotalaria</i> spp. estudiadas.	61
Tabla 5. Identificación taxonómica de las especies de <i>Crotalaria</i> spp. recolectadas cerca a Bucaramanga, Santander.	61
Tabla 6. Iones característicos de los espectros de masas (EI, 70 eV), índices de retención lineales de los PA encontrados en los extractos obtenidos por MSPD, de las seis especies de <i>Crotalaria</i> estudiadas	66
Tabla 7. Porcentajes de conversión (%) de los PANO a los respectivos PA, después de someter los extractos MSPD al proceso de reducción con Zn/H+.	75
Tabla 8. Masa exactas y iones-fragmento de los PA y los PANO determinados por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS, operado en modo step scan, a diferentes voltajes HCD, presentes en los extractos aislados por MSPD de plantas de <i>Crotalaria</i> spp	81

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Porcentaje de recuperación (%) de retrorsina en el método de extracción de dispersión de la matriz en fase sólida, MSPD, usando de tres tipos de soportes solidos: Arena, C ₁₈ y florisil.	103
Apéndice 2. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-MS de los extractos de semillas de <i>C. spectabilis</i> aislados por MSPD y el mix de hidrocarburos C ₆ -C ₂₅ para el cálculo de los índices de retención lineal. Columna DB-5MS, 60 m. <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV).....	104
Apéndice 3. Iones característicos en los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (70 eV), de los alcaloides pirrolizidínicos de cadena abierta.	105
Apéndice 4. Iones característicos en los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (70 eV), de los alcaloides pirrolizidínicos macrocíclicos de diez miembros.....	106
Apéndice 5. Iones característicos en los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (70 eV), de los alcaloides pirrolizidínicos macrocíclicos de once miembros.....	106
Apéndice 6. Contenido de los PA y PANO [mg/g] en los diferentes tejidos de las especies de <i>Crotalaria</i> estudiadas.	107
Apéndice 7. Espectro de masas UHPLC-ESI ⁺ - <i>Obitrap</i> -MS operado en modo <i>step scan</i> (HCD, 30 eV) de la retronecina, C ₈ H ₁₃ NO ₂ , [M+H] ⁺ : <i>m/z</i> 156,10191 (<i>t_R</i> : 0,97 min).....	111
Apéndice 8. Espectro de masas UHPLC-ESI ⁺ - <i>Obitrap</i> -MS operado en modo <i>step scan</i> (HCD, 30 eV) del PA no identificado C ₇ H ₇ NO ₂ , [M+H] ⁺ : <i>m/z</i> 138,05496, <i>t_R</i> : 1,02 min.	111
Apéndice 9. Espectro de masas UHPLC-ESI ⁺ - <i>Obitrap</i> -MS operado en modo <i>step scan</i> (HCD, 50 eV) del PA no identificado C ₆ H ₁₅ NO ₂ , [M+H] ⁺ : <i>m/z</i> 158,11756, <i>t_R</i> : 1,04 min.	111
Apéndice 10. Espectro de masas UHPLC-ESI ⁺ - <i>Obitrap</i> -MS operado en modo <i>step scan</i> (HCD, 30 eV) de la retronecina <i>N</i> -óxido, C ₈ H ₁₃ NO ₃ , [M+H] ⁺ : <i>m/z</i> 172,09683, <i>t_R</i> : 1,20 min.	111

- Apéndice 11.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) del PANO no identificado, C₈H₁₆NO₃, [M+H]⁺: *m/z* 174,11247, t_R: 1,36 min. 112
- Apéndice 12.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado, C₈H₁₅NO, [M+H]⁺: *m/z* 142,12264, t_R: 1,37 min. 112
- Apéndice 13.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) de la monocrotalina, C₁₆H₂₃NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 326,15981, t_R: 3,30 min. 112
- Apéndice 14.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₇H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 340,17546, t_R: 3,30 min. 112
- Apéndice 15.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo monocrotalina, C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 368,17038, t_R: 3,53 min. 113
- Apéndice 16.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) de la monocrotalina *N*-óxido, C₁₆H₂₃NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 342,15373, t_R: 3,55 min. 113
- Apéndice 17.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no indentificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 368,17038, t_R: 3,57 min. 113
- Apéndice 18.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PANO no identificado, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17546, t_R: 3,61 min. 113
- Apéndice 19.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la retusina, C₁₆H₂₅NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 312,18055, t_R: 3,76 min. 114

- Apéndice 20.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo monocrotalina, C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 368,17038, t_R: 3,79 min. 114
- Apéndice 21.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo crispatina, C₁₆H₂₃NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 310,16490, t_R: 3,80 min 114
- Apéndice 22.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la usaramina, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17546, t_R: 3,86 min..... 114
- Apéndice 23.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo usaramina, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17546, t_R: 3,92 min 115
- Apéndice 24.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PANO no identificado, C₁₈H₂₅NO₈, [M+H]⁺: *m/z* 384,16529 t_R: 3,92 min. 115
- Apéndice 25.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 7-angeloilretronecina, C₁₃H₁₉NO₃, [M+H]⁺: *m/z* 238,14377, t_R: 3,93 min. 115
- Apéndice 26.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la usaramina *N*-óxido, C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 368,17038, t_R: 3,94 min..... 115
- Apéndice 27.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 7-angeloilretronecina *N*-óxido, C₁₃H₁₉NO₄, [M+H]⁺: *m/z* 254,13868, t_R: 3,95 min. 116
- Apéndice 28.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la crispatina, C₁₆H₂₃NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 310,16490, t_R: 3,97 min..... 116
- Apéndice 29.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la retusina *N*-óxido, C₁₆H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 310,16582, t_R: 3,97 min. 116
- Apéndice 30.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la crispatina *N*-óxido, C₁₆H₂₃NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 310,16490, t_R: 4,00 min..... 116

- Apéndice 31.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 9-tigloilretronecina, C₁₃H₁₉NO₃, [M+H]⁺: *m/z* 238,14377, t_R: 4,01 min. 117
- Apéndice 32.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado, C₁₆H₂₃NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 310,16490, t_R: 4,07 min. 117
- Apéndice 33.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 9-angeloilretronecina, C₁₃H₁₉NO₃, [M+H]⁺: *m/z* 238,14377, t_R: 4,09 min. 117
- Apéndice 34.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado, C₁₈H₂₇NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 370,18063, t_R: 4,14 min. 117
- Apéndice 35.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado, C₁₃H₂₀NO₃, [M+H]⁺: *m/z* 240,15942, t_R: 4,16 min. 118
- Apéndice 36.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la 9-tigloilretronecina *N*-óxido, C₁₃H₁₉NO₄, [M+H]⁺: *m/z* 254,13868, t_R: 4,23 min. 118
- Apéndice 37.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PANO no identificado, C₁₆H₂₃NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 326,15981, t_R: 4,24 min. 118
- Apéndice 38.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la 9-angeloilretronecina *N*-óxido, C₁₃H₁₉NO₄, [M+H]⁺: *m/z* 254,13868, t_R: 4,27 min. 118
- Apéndice 39.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) de la intergerrimina, C₁₈H₂₅NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 336,18055, t_R: 4,27 min. 119
- Apéndice 40.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la intergerrimina *N*-óxido, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17546, t_R: 4,38 min. 119
- Apéndice 41.** Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PANO no identificado, C₁₃H₂₂NO₄, [M+H]⁺: *m/z* 256,15433, t_R: 4,40 min. 119

Apéndice 42. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo platinecina, C₁₈H₂₇NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 354,19111, t_R: 4,48 min.

..... 119

Apéndice 43. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₇NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 338,19620, t_R: 4,58 min.

..... 120

Apéndice 44. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₇NO₆, [M+H]⁺: *m/z*354,19111, t_R: 4,71 min.

..... 120

Apéndice 45. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17422, t_R: 4,88 min.

..... 120

Siglas, abreviaturas y acrónimos

AF	Ácido fórmico
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> (Ionización a presión atmosférica).
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i> (Ionización química a presión atmosférica).
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
GC-MS	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
HCD	<i>High-Energy Collisional Dissociation</i> . (Disociación por colisiones de alta energía).

LC-MS	<i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas).
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).
LRI	<i>Linear Retention Indices</i> (Índices de retención lineales).
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida).
NMD	Nivel mínimo de detección.
NMC	Nivel mínimo de cuantificación.
<i>m/z</i>	Relación masa carga.
PA	<i>Pyrrolizidine Alkaloids</i> (Alcaloides pirrolizidínicos).
PANO	<i>Pyrrolizidine Alkaloids N-Oxides</i> (<i>N</i> -óxidos de alcaloides pirrolizidínicos).
UHPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
<i>Orbitrap-MS</i>	<i>Orbitrap-Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas con detector <i>Orbitrap</i>).
VIE	Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Resumen

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS Y SUS N-OXIDOS EN DIFERENTES TEJIDOS DE SEIS ESPECIES DE *Crotalaria* spp.*

AUTOR: Julián Camilo Lozano Quintero**

Palabras clave: *Crotalaria*, alcaloides pirrolizidínicos, dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), GC-MS, UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS.

Las especies de *Crotalaria*, pertenecientes a la familia Fabaceae, continen alcaloides pirrolizidínicos (PA) y sus N-óxidos (PANO). Estos alcaloides se conocen por sus efectos hepatotóxicos y neumotóxicos. Las plantas del género *Crotalaria* crecen como malezas en los bordes de carreteras y en los sistemas de producción agrícola, y hay pruebas de que los alcaloides tóxicos que contienen pueden contaminar los alimentos, por ejemplo, cereales, leche, carne, huevos o miel.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el contenido de PA y PANO en raíces, tallos, hojas, flores y semillas de *Crotalaria nitens*, *C. retusa*, *C. pallida*, *C. incana*, *C. maypurensis* y *C. spectabilis*, recolectadas en el departamento de Santander-Colombia. Las plantas de *Crotalaria* spp. se recolectaron, se secaron y molieron para la extracción y análisis de los PA y PANO. Los alcaloides se extrajeron usando dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y su análisis se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con detector *Orbitrap* (UHPLC-*Orbitrap*-MS).

La monocrotalina, intergerrimina, usaramina y crispatina con sus correspondientes N-óxidos fueron los principales alcaloides encontrados. Los tejidos reproductivos, flores y, especialmente, semillas tuvieron una mayor cantidad de PA y PANO, comparados con raíces, tallos y hojas. Los rangos de concentraciones de PA y PANO totales en las semillas fueron los siguientes: *C. nitens*, 4-11 mg/g; *C. retusa*, 9-23 mg/g; *C. pallida*, 0,7-6 mg/g; *C. incana*, 23-44 mg/g; *C. maypurensis*, 0,9-41 mg/g y *C. spectabilis*, 4-20 mg/g.

*Proyecto de Grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Elena E. Stashenko, Química Ph.D. Jairo R. Martínez, Químico Ph.D.

Co-director: Fausto Prada Chaparro, Químico.

Abstract

TITLE: DETERMINATION OF PIRROLIZIDINE ALKALOIDS AND THEIR *N*-OXIDES IN DIFFERENT TISSUES OF SIX SPECIES OF *Crotalaria* spp. *

AUTHOR: Julián Camilo Lozano Quintero **

Keywords: *Crotalaria*, pyrrolizidine alkaloids, matrix solid-phase dispersion (MSPD), GC-MS, UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS.

Plants of The *Crotalaria* species (family Fabaceae) contain pyrrolizidine alkaloids (PA) and their *N*-oxides (PANO). These alkaloids are known for their hepatotoxic and pneumotoxic effects. *Crotalaria* species grow as weeds on roadsides and in agricultural production systems. These alkaloids may contaminate food, for example, cereals, milk, meat, eggs or honey.

The aim of this work was to evaluate the content of PAs and PANOs in roots, stems, leaves, flowers, and seeds of *Crotalaria nitens*, *C. retusa*, *C. pallida*, *C. incana*, *C. maypurensis* and *C. spectabilis*, collected in Santander-Colombia. The plants of *Crotalaria* spp. were collected, dried and milled for the PAs and PANOs extraction and analysis. The alkaloids were extracted using matrix solid-phase dispersion (MSPD) and their analysis was performed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to a high-resolution Orbitrap mass spectrometer (UHPLC-Orbitrap-MS).

Monocrotaline, intergerrimine, usaramine and crispatine with their corresponding *N*-oxides were the main alkaloids detected. The reproductive tissues, such as flowers and seeds, contained greater amounts of PAs and PANOs, compared to those in roots, stems and leaves. The total concentration of PAs and PANOs in seeds ranged between 4-11 mg/g for *C. nitens*, 9-23 mg/g in *C. retusa*, 0.7-6 mg/g for *C. pallida*, 23-44 mg/g in *C. incana*, 0.9-41 mg/g for *C. maypurensis*, and 4-20 mg/g for *C. spectabilis*.

* Undergraduate final project

** Faculty of Sciences, School of Chemistry. Supervisors: Elena E. Stashenko, Ph.D. Jairo R. Martínez, Ph.D.

Co-supervisor: Fausto Prada Chaparro, Chemist.

Introducción

Colombia es uno de los países con mayor diversidad vegetal en el planeta con alrededor de 26.000 plantas vasculares (Bernal, Grandstein y Celis, 2016; Rangel-ch, 2005). Esta exuberancia de especies le brinda a nuestro territorio una ventaja competitiva, ya que posee plantas con propiedades únicas para el uso humano, las cuales hay que conservar y aprovechar sosteniblemente. La diversidad vegetal y su conservación representa una responsabilidad y, para esto, se requiere un conocimiento detallado de cada especie.

El género *Crotalaria* (fam. Fabaceae o Leguminosae) posee especies tóxicas, con aproximadamente unas 600 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Roger M Polhill, 1982), los centros de diversidad en los que se encuentra, son el Este y Sur de África tropical y la India, con presencia desde México hasta Brasil (Flores, Tozzi, & Trigo, 2009; Palomino & Vázquez, 1991). El género fue subdividido en ocho secciones basadas en la morfología floral de las especies africanas por Bisby & Polhill, (1973). En Colombia, hay presencia de 20 especies de *Crotalaria* de las 89 distribuidas en toda América (Bernal, 1986). Las especies del género *Crotalaria* se utilizan a nivel agronómico para la fijación de nitrógeno en los suelos, ya que presentan nódulos en sus raíces, que acumulan bacterias (especie de *Rhizobium*) capaces de tomar el nitrógeno atmosférico y convertirlo a compuestos nitrogenados solubles, que pueden utilizar otras plantas (Lloret & Martínez-Romero, 2005), además, protegen el suelo de la erosión y generan una gran cantidad de biomasa que se puede utilizar como abono verde (Graham & Vance, 2003).

El género *Crotalaria* contiene alcaloides pirrolizidínicos (PA). Ensayos realizados en laboratorio han mostrado que los PA son hepatotóxicos, neumotóxicos y poseen actividades carcinogénicas y mutagénicas en humanos y rumiantes (Boppré, 1990; Brown & Trigo, 1995; Culvenor, 1978; Thomas Hartmann, 1999; Thomas Hartmann & Witte, 1995; Helmut Wiedenfeld & Edgar, 2010). Los PA han llegado a contaminar diferentes productos de consumo agroindustrial ocasionando problemas hepáticos y muertes en caballos (Knight, Kimberling, Stermitz, & Roby, 1984), cerdos (Hooper & Scanlan, 1977), ganado (Molyneux, Gardner, Colegate, & Edgar, 2011), aves de corral (Diaz, Almeida, & Gardner, 2014) y humanos (Wiedenfeld & Edgar, 2010). Debido a la gran cantidad de propiedades que presentan, estas estructuras son de gran interés en muchas disciplinas, incluyendo la botánica, química de alimentos, química ambiental, toxicología, taxonomía y química ecológica (Crews, Berthiller, & Krska, 2010). Se han reportado numerosas intoxicaciones por PA en humanos, por ejemplo, en Afganistán (Mohabbat *et al.*, 1976; Molyneux *et al.*, 2011) y la India (Tandon, Tandon, Tandon, Narndranathan, & Joshi, 1976; Tandon, Tandon, Tandon, Nayaks, 1977) hasta 6000 personas fueron víctimas de intoxicación masiva. Además, se ha reportado que los PA producen enfermedades veno-oclusivas en fetos (Rasenack, Müller, Kleinschmidt, Rasenack, & Wiedenfeld, 2003), hepatomegalias, hipertensión portal y enfermedades hepáticas terminales en niños (Grases & Simon Beker, 1972), daños hepáticos en adultos y carcinomas hepáticos (Bull, 1955). En Santander, se reportó un caso de intoxicación por PA en aves de corral, al contaminar su alimento accidentalmente con semillas de *C. retusa*, lo cual representó millonarias pérdidas al sector avícola de la región (Stashenko, 2011).

Este trabajo tuvo como finalidad determinar el contenido de PA y sus *N*-óxidos (PANO) en plantas de *Crotalaria* spp., utilizando extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), junto con cromatografía de gases y cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, UHPLC-*Orbitrap*-MS). Se usaron diferentes criterios de identificación (t_R , índices de retención lineales, compuestos de referencia, masas exactas, patrones de fragmentación y bases de datos). Finalmente, se cuantificaron los PA y PANO, en raíces, hojas, flores y semillas de las especies recolectadas en el departamento de Santander.

La fase de prospección fue 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 tuvo co-financiación de la Universidad Industrial de Santander–VIE, Proyecto 1786.

El libro consta de cuatro capítulos a saber: el primero, una revisión bibliográfica sobre los alcaloides pirrolizidínicos, su contenido en especies de *Crotalaria* en diferentes partes del mundo, seguido de un marco de teórico con las generalidades de las especies estudiadas y las técnicas analíticas utilizadas en la investigación, y finalmente el análisis de resultados y conclusiones de los datos obtenidos. Algunos resultados de esta investigación fueron divulgados en modalidad de presentación oral en el *Gordon Research Conference-2018*,

Plant Volatiles: The Role of Plant Volatiles in Communication, en Lucca, Barga, Italia y en el Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales (COLAPLAMED-2016) realizado en Barranquilla, Colombia.

1. Objetivos

1.1 General

Determinar los alcaloides pirrolizidínicos y sus N-óxidos en las diferentes partes de seis especies del género *Crotalaria* presentes en Santander.

1.2 Específicos

Determinar los alcaloides pirrolizidínicos presentes en plantas del género *Crotalaria* que crecen en Santander con ayuda de la combinación de CG-MS y LC-MS, usando diferentes criterios de identificación como tiempos de retención, índices de retención lineales, patrones certificados, masas exactas, patrones de fragmentación y bases de datos.

Cuantificar los alcaloides pirrolizidínicos y sus N-óxidos en raíces, hojas, flores y semillas de seis especies del género *Crotalaria* usando dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y UHPLC-ESI⁺-orbitrap-MS.

2. Marco Rerencial

2.1 Cienciometría

Se realizó un estudio cienciométrico con el fin de hacer un análisis de la actividad científica existente por medio de indicadores numéricos y estadísticos de las diferentes fuentes bibliográficas, además de comparar la producción científica, evaluar su utilidad y facilitar su comunicación en el ámbito científico.

El número de publicaciones sobre el tema de estudio se encontró a través el buscador *Scopus (Elsevier)*, usando la ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“*Crotalaria pyrrolizidine alkaloids*”). En total, se encontraron 217 documentos desde el año 1957, cuya distribución se puede observar en la **Figura 1**. Los años cuando más publicaciones aparecieron fueron desde 2007 a 2017, con 73, en total. Las publicaciones sobre el área de estudio se encuentran concentradas principalmente, en los campos de farmacología, toxicología y farmacéutica, con un 23%, la agricultura y ciencias médicas (18%), seguidas de genética y biología molecular (18%), medicina (15%) y química (12%).

Entre las publicaciones más relevantes sobre las especies del género *Crotalaria*, se encuentran las de Polhill (1982), quien estudió las especies de *Crotalaria* en África y Madagascar, describió y clasificó cerca de 57 especies de las más de 500 conocidas en el mundo, de una forma muy detallada. Este artículo, es el texto base de referencia en la mayoría de trabajos relacionados con la identificación de la especie.

Bernal (1986), en su trabajo para el Museo de la Historia Natural de la Universidad Nacional de Colombia, recolectó, identificó y realizó una descripción completa de las especies del género *Crotalaria* presentes en el territorio colombiano.

Dos investigaciones, en las que se abordó el mismo tema, son las de Flores *et al.* (2009) y Fletcher, McKenzie, Blaney, & Reichmann (2009). Flores *et al.* (2009), en su trabajo, analizó los PA presentes en 28 especies de *Crotalaria* spp. recolectadas en Brasil, el análisis se llevó a cabo por GC-MS, el autor reportó 39 PA, cuya identificación se basó en índices de retención y espectros de masas; adicionalmente, se resaltó la importancia de estos alcaloides como marcadores quimiotaxonómicos a nivel infragenérico de las diferentes especies. Fletcher *et*

al. (2009) enfocó su trabajo en el estudio de 24 especies de *Crotalaria* spp. presentes en Australia.

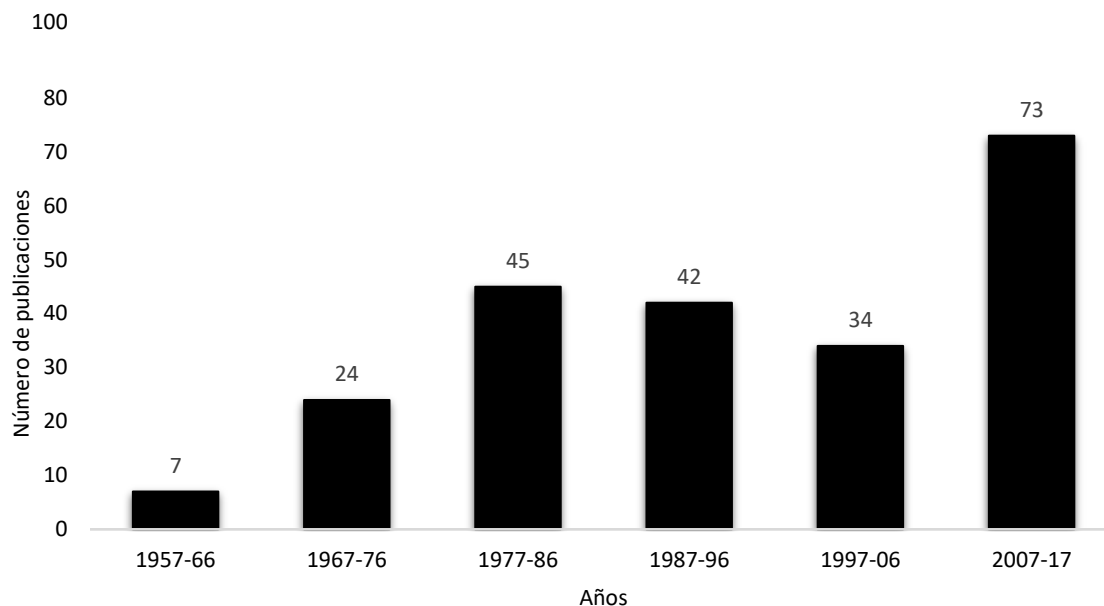


Figura 1. Número de publicaciones durante el periodo de 1957-2017, en intervalos de diez años. Fecha de búsqueda: 3 de noviembre de 2017. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: *ARTICLE TITLE-ABSTRACT-KEYWORDS ("Crotalaria pyrrolizidine alkaloids")*.

Wiedenfeld & Edgar, (2010) evaluó la toxicidad de los PA en humanos y rumiantes.. Kim, Stermitz, & Coulombe (1995), demostró la carcinogenicidad de los PA en varias especies de animales, incluyendo primates, y resaltó la relevancia del tema de los PA asociados a esta enfermedad.

Crews *et al.* (2010), describieron los aspectos importantes para determinar los PA en plantas y alimentos, entre ellos, la técnica de extracción, limpieza, eficiencia de diferentes

solventes, procedimientos para la reducción química de los PANO a sus PA y su análisis por GC-MS y LC-MS.

Avula *et al.*(2015) realizaron el análisis por la técnica UHPLC-Q-ToF-MS de PA en 37 especies botánicas y siete productos derivados. Lograron identificar PA y PANO, simultáneamente, con base en sus tiempos de retención, espectros de masas y masas exactas, además, utilizaron 25 patrones certificados.

Hartman (Hartmann, 1999; Hartmann, Ehmke, Eilert, von Borstel, & Theuring, 1989), determinó los PA y PANO en diferentes tejidos de *Senecio vulgaris* L. El autor describió el papel que cumplen estos alcaloides en la defensa química de la planta y cómo se pueden afectar por factores externos como herbívora, el suelo o el clima, entre otros.

Entre los artículos más recientes, Zhang *et al.* (2017), usó UHPLC-Q-Orbitrap-MS para determinar simultáneamente cinco PA en *C. sessiliflora*, sin la necesidad de los estándares correspondientes. Alvarez, (2004) aisló e identificó los PA de las semillas de *C. retusa*, *C. nitidula* y en alimento para aves de corral contaminado. Encontró que el compuesto mayoritario fue la monocrotalina.

De lo mostrado en la evaluación cuantitativa, se concluye que la investigación sobre las *Crotalaria* spp. presentes en Colombia y en el departamento de Santander es deficiente. Las especies de *Crotalaria* spp. contienen alcaloides pirrolizidínicos y estos son altamente tóxicos, por lo tanto, es necesario determinar si las especies que crecen en la región también los contienen, cuáles son sus estructuras químicas y en qué concentración están presentes en sus raíces, hojas, flores y semillas. Se aplicó el método de extracción MSPD, el cual usa un soporte sólido selectivo, que ofreció ventajas en la extracción de estas moléculas, como

rapidez y limpieza del extracto. El análisis usando detectores de masas de alta resolución en la configuración UHPLC-*Orbitrap*-MS, permitió determinar las masas exactas y fórmulas moleculares de los PA y PANO de manera simultánea.

2.2 Datos generales sobre las especies del género *Crotalaria*



Familia: *Fabaceae*.

Nombres comunes: *Crotalaria*, matraca, sonajuelas, cáñamo de la India.

Nombres en inglés: *Sunn hemp*, *sun*, *Bengal hemp*, *rattlebox*, *rattlepod*, *shake-shake*.

Figura 2. *Crotalaria nitens*. Fuente: Julián Camilo Lozano

Quintero, Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, UIS, 19 de octubre de 2017.

2.3 Descripción de las especies de *Crotalaria*

Las especies del género *Crotalaria* son plantas leguminosas anuales con tallos fibrosos y erectos de 1,0 a 2,4 m de altura. Tienen una raíz corta y un sistema radical ramificado. Sus flores son grandes y amarillas. Sus semillas germinan rápidamente (de tres a cuatro días). Crecen en lugares altamente drenados con buena iluminación, por ejemplo, campos cultivados, orillas de las carreteras y lugares erosionados, son resistentes a la sequía y se adaptan fácilmente al clima cálido (Bernal, 1986).

Las siguientes son las especies, que crecen en el territorio santandereano, y de las cuales hay presencia en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM: *C. spectabilis*, *C. nitens*,

C. incana, *C. retusa*, *C. pallida* y *C. maypurensis* (Véase **Figura 3**). La especie más comúnmente distribuida en el trópico es la *C. incana* (Bernal, 1986).

C. spectabilis mide hasta 1,5 m, posee tallos estriados de color verde con hojas trifoliadas de color verde oscuro, sus flores son de color amarillo o ligeramente rosados (Véase **Figura 3 a**) (Bernal, 1986); Crece en los departamentos de Magdalena, Meta, la Comisaría de Guainía y Santander, entre 75 y 1400 m de altura sobre el nivel del mar. Es nativa de la India, también se encuentra en Suramérica, Centroamérica y Cuba (Bernal, 1986).

C. nitens se caracteriza por sus tallos fibrosos erectos de 1,8 a 2,4 m de altura, flores de color amarillo brillante, posee raíces cortas de un radio que va de 20 a 30 cm (Véase **Figura 3 b**) (Bernal, 1986). Está distribuida en el Centro y el Norte de América del Sur. En Colombia, se ha encontrado en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Chocó, Huila, Meta, Nariño, Santander, Tolima y Valle, entre 50 y 3400 m de altura sobre el nivel del mar (Bernal, 1986).

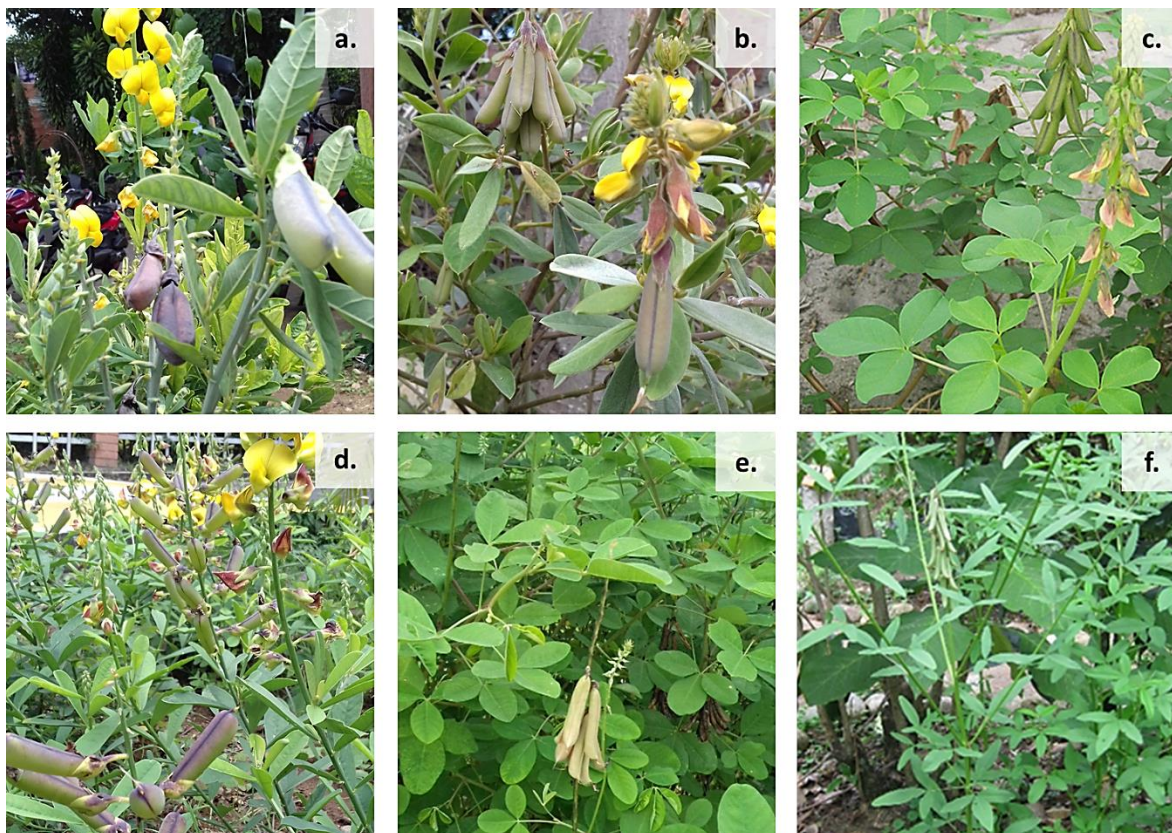


Figura 3. Ejemplares del género *Crotalaria* que se estudiaron en el presente trabajo: **a.** *C. spectabilis*; **b.** *C. nitens*; **c.** *C. incana*; **d.** *C. retusa*; **e.** *C. pallida*; **f.** *C. maypurensis*.

Fuente: Julián Camilo Lozano Quintero, Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, UIS, 17 de mayo de 2016.

C. incana llega hasta los 2 m de altura, sus tallos son de color verde limón con hojas trifoliadas, de color verde oscuro a marrón, sus flores son medianas de color amarillo brillante y posee raíces que pueden alcanzar hasta un radio de 30 cm (Véase **Figura 3c**) (Bernal, 1986). Es una especie pantropical, de amplia distribución en los trópicos americanos; probablemente, es originaria de América, de donde fue introducida al Viejo Mundo. En Colombia, es la única representante de la subsección *Incanae*, que incluye dos especies, principalmente, de África y Suramérica (Flores & Azevedo., 2015).

La especie *C. incana* está ampliamente distribuida en Colombia, en los departamentos de Antioquia, Atlántico, Bolívar, Boyacá, Caldas, Caquetá, Córdoba, Cundinamarca, Guajira, Huila, Magdalena, Norte de Santander, Sucre, Tolima y Valle del Cauca, entre 0 y 2130 m de altura sobre el nivel del mar(H. Y. Bernal, 1986).

C. retusa mide hasta 1,6 m, sus tallos son estriados de color verde, sus hojas son unifoliadas de color verde oscuro, sus flores son de color amarillo con manchas moradas, vinosas o rojo violáceo (Véase **Figura 3d**) (Bernal, 1986). *C. retusa* se ha encontrado en los departamentos de Antioquia, Atlántico, Bolívar, Chocó, Córdoba, Guajira, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, Tolima, Santander, entre 0 y 1560 m de altura sobre el nivel del mar(H. Y. Bernal, 1986). Es una especie originaria del Viejo Mundo, en donde se encuentra ampliamente distribuida; fue introducida a América, y, en Colombia, está esparcida por el piso cálido, es común en las playas, ya que prefiere los suelos arenosos.

La especie *C. pallida* alcanza hasta los 1,5 m, sus tallos son estriados de color verde con hojas trifoliadas de color verde oscuro, sus flores son de color amarillo con rayas moradas, rojas, marrón o púrpura oscuro y sus raíces pueden alcanzar hasta un radio de 40 cm (Véase **Figura 3e**) (Bernal, 1986). Es una especie originaria de África y se ha coleccionado en Colombia en los departamentos de Antioquia, Caldas, Caquetá, Cundinamarca, Chocó, Meta, Santander, Tolima y Valle, entre los 5 y 1650 m de altura sobre el nivel del mar(H. Y. Bernal, 1986).

C. maypurensis crece hasta los 1,5 m, sus tallos son estriados de color verde, sus hojas son trifoliadas de color verde oscuro, sus flores de 0,5 a 1 cm de longitud, de color amarillo o ligeramente rosados, y sus raíces pueden alcanzar un radio de 30 cm (Véase **Figura 3f**) (Bernal, 1986). Se ha encontrado en los departamentos de Magdalena, Meta, la Comisaría de

Guainía y Santander, entre 75 y 1400 m de altura sobre el nivel del mar. Es nativa de Suramérica, también, se encuentra en Centroamérica y Cuba (Bernal, 1986).

2.4 Usos de algunas especies de *Crotalaria*

Algunas especies del género *Crotalaria* se usan en la agricultura como fuente de fibra, cobertura para fijación de nitrógeno e incorporación de materia orgánica en el suelo y como forraje para animales de granja (Brunner, Martínez, & Flores, 2009). La fibra resiste los hongos y la humedad, se usa para elaborar cordones, alfombras, papel, redes de pesca y sacos (Brunner *et al.*, 2009). Las plantas del género *Crotalaria* son excelentes cultivos de cobertura, ya que germinan y se desarrollan rápidamente, tienen un hábito de crecimiento denso, que suprime las malezas, reducen la población de nematodos en el suelo, fijan nitrógeno atmosférico y producen abundante materia orgánica (Germani & Plenchette, 2005; Samba *et al.*, 2002). Muchas especies del género *Crotalaria* contienen monocrotalina, un alcaloide pirrolizidínico tóxico para muchas especies de nemátodos, por ende, la planta ayuda a controlar su población en el suelo (Germani & Plenchette, 2005).

Desde el punto de vista medicinal, *C. incana* y *C. pilosa* se utilizaban ampliamente en Colombia en la medicina popular, para curar la blenorragia, en forma de baño y como desinfectante de llagas y heridas (García, 1974); *C. verrucosa* se usa para disminuir la salivación, el impétigo y la sarna, *C. micans* se cultiva como medicinal en el Mitú y sus alrededores (Comisaría del Vaupés). Las especies que tienen uso ornamental son *C. agatiflora*, *C. micans*, *C. paulina* y *C. spectabilis* (Bernal, 1986).

2.5 Alcaloides pirrolizidínicos

Los alcaloides pirrolizidínicos son metabolitos secundarios, producidos por las plantas como defensa contra insectos herbívoros. A menudo, se encuentran en los géneros Boraginaceae, Asteraceae y Fabaceae, se estima que las especies que contienen PA suman el 3% de las plantas con flores del mundo (Wiedenfeld, 2011). Los PA y PANO tienen bases pirrolizidina, un compuesto orgánico heterocíclico que forma la estructura química central como se muestra en la **Figura 4**.

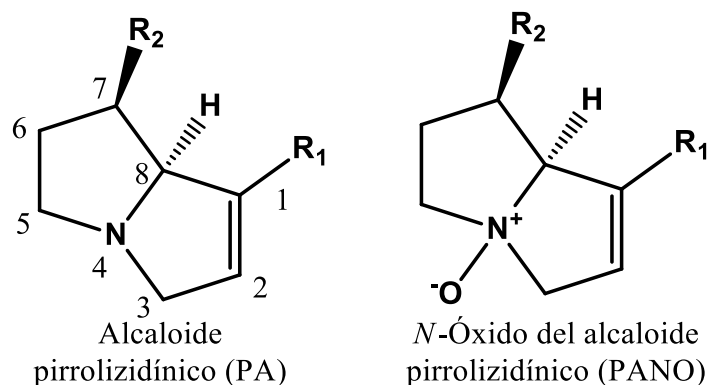


Figura 4. Estructura básica de los PA y PANO de tipo retronecina.

Los PA tienen cuatro formas básicas: heliotridina, platinecina, otonecina y retronecina (**Figura 5**). Los PA, con una insaturación en la posición 1,2, se clasifican en otonecina, retronecina y heliotridina; los saturados, son de tipo platinecina. Los alcaloides pertenecientes al tipo retronecina, son solubles en solventes orgánicos polares. En cambio, los PA de tipo otonecina, son solubles tanto en solventes orgánicos polares, como en no polares (Wiedenfeld, Roeder, Bourauel, & Edgar, 2008).

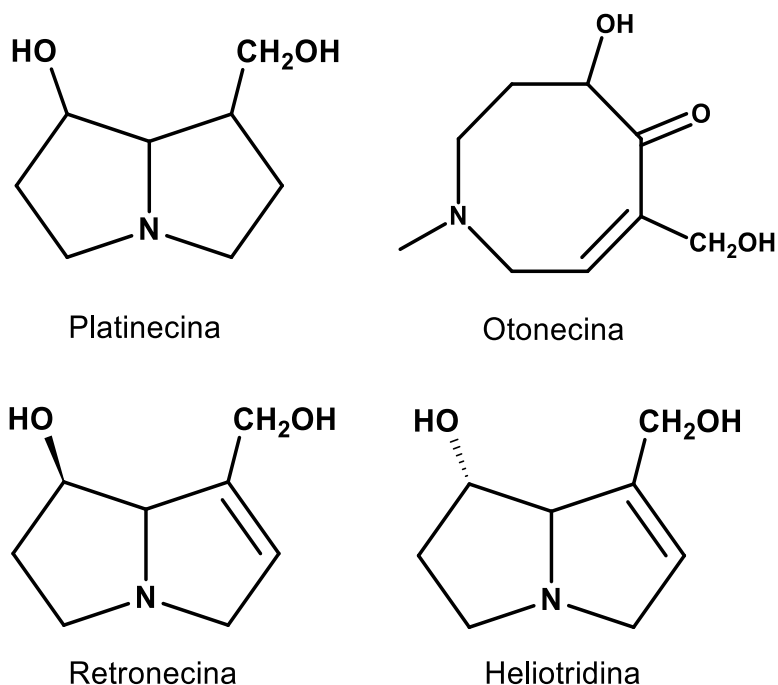


Figura 5. Ejemplos de los cuatro tipos de PA.

2.6 Biosíntesis de los alcaloides pirrolizidínicos

La biosíntesis de base necina se vincula al metabolismo primario a través de la putrescina (Véase **Figura 6**), que se deriva de la arginina. La síntesis de PA a partir de ornitina, se realiza a través de la arginina. El primer producto intermedio de síntesis es la homoespermidina (Ober & Kaltenecker, 2009). A partir de esta molécula, se sintetiza la retronecina. Los ácidos néricos de los dos grupos principales de los PA, por ejemplo, los de tipo senecionina o licopsamina, se derivan de los aminoácidos alifáticos. La senecionina se sintetiza a partir de un ácido dicarboxílico, C₁₀, derivado de dos moléculas de isoleucina que se esterifica con la retronecina (Hartmann, 1999).

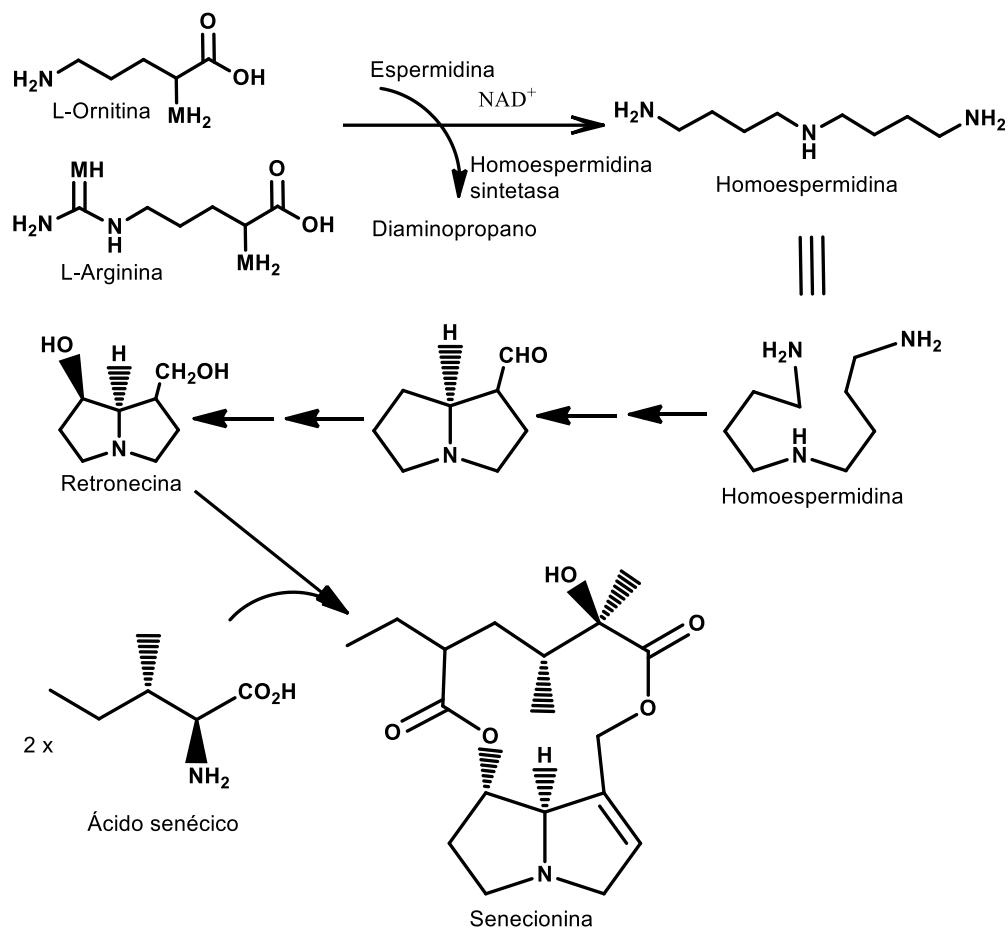


Figura 6. Esquema general de la biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos (senecionina) (Hartmann, 1999; Ober & Kaltenecker, 2009).

2.7 Toxicidad de los alcaloides pirrolizidínicos

Los PA son hepatotóxicos para la mayoría de los vertebrados (Cheeke, 1988); además, son neumotóxicos y genotóxicos (EFSA, 2011). Se han encontrado especies de insectos que los consumen en su dieta habitual y los utilizan para su supervivencia (Hartmann, Theuring, & Bernays, 2003), por ejemplo, las larvas de *Lampides boeticus*, de la polilla bella *Utetheisa ornatrix* y la del escarabajo perforador *Cerotoma ruficornis* (Brunner *et al.*, 2009).

Muchos PA son cancerígenos en animales (Williams, 1987; Wiedenfeld & Edgar, 2010). Pese a que gran parte de los datos cuantitativos sobre la toxicidad de los PA se basan en los estudios de letalidad a corto plazo, permiten, sin embargo, dar una estimación sobre la toxicidad relativa de los PA (**Tabla 1**). Por ejemplo, los alcaloides más potentes de este tipo pueden ser trichodesmina, senecionina y jacodina, con una dosis letal media (LD₅₀) de 25, 50 y 77 mg/kg, respectivamente; para la heliotrina, licopsamina y heliotrina *N*-óxido, los valores LD₅₀ son 296, >1000 y 5000 mg/kg, respectivamente. La monocrotalina está en el intervalo medio de estos compuestos tóxicos, LD₅₀=109 mg/kg (Coulombe, 2003). Estos valores permiten clasificar a los PA como altamente tóxicos, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)(EFSA, 2011).

Tabla 1.

Comparación de toxicidad entre algunos PA (Coulombe, 2003).

Alcaloide	LD₅₀, intraperitoneal [mg/kg]en ratones
Trichodesmina	25
Retrorsina	34
Senecionina	50
Jacodina	77
Lasiocarpina	77
Monocrotalina	109
Heliotrina	296
Licopsamina	>1000
Heliotrina <i>N</i> -óxido	5000

Cuando los PA y PANO se ingieren, parte de los alcaloides se excretan sin ningún cambio, pero una pequeña cantidad se metaboliza en el hígado. La toxicidad, a largo plazo, se debe a

la conversión de los PA a los derivados de pirrol, que sí son altamente reactivos y pueden alquilar el ADN y formar entrecruzamientos, que producen la interrupción de su replicación. Las mutaciones resultantes pueden causar cáncer de hígado o riñón (Kim *et al.*, 1995; Schoental, 1968).

Tras la ingestión, la activación metabólica de los PA en el hígado convierte los compuestos parentales en electrófilos muy reactivos, capaces de reaccionar con macromoléculas celulares. Por ejemplo, aductos, que pueden iniciar la toxicidad aguda o crónica (**Figura 7**). La presencia del enlace doble en el núcleo pirrolizidínico en la posición 1,2 establece su actividad carcinogénica debido a que facilita la deshidrogenación al correspondiente pirrol, el cual está sujeto a ataque nucleofílico (Kim *et al.*, 1995).

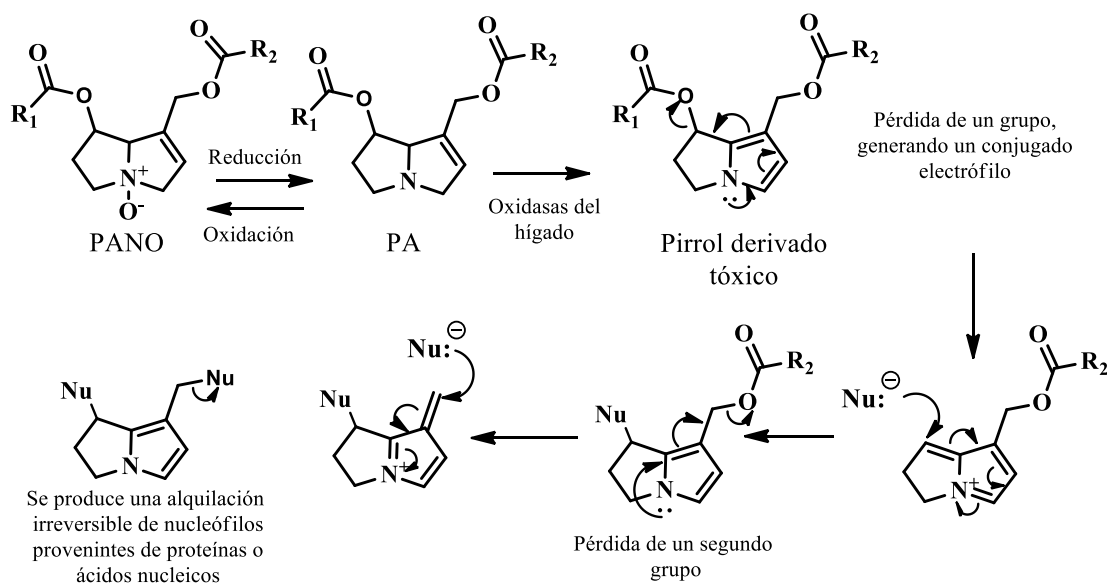


Figura 7. Ruta de transformación de los alcaloides pirrolizidínicos a compuestos tóxicos en el hígado (Dewick, 2009).

2.8 Regulaciones

Actualmente, no existe una regulación unificada en el mundo para los PA y sus *N*-óxidos. La dosis más baja conocida, que causa enfermedad veno-oclusiva en un ser humano, se estima en 15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ por día; fue estimada como el resultado de la automedicación con una preparación de *Symphytum officinale* (Ridker, Ohkuma, McDermott, Trey, & Huxtable, 1985).

Debido a los peligros que pueden surgir, el Departamento Federal de Salud de Alemania ha restringido drásticamente la venta de productos farmacéuticos que contengan PA y sus *N*-óxidos con un esqueleto de necina, insaturadas en la posición 1,2. Los fármacos que contienen PA están exentos de esta restricción, si no se supera una administración oral diaria de 0,1 μg por día y 10 μg por día, con aplicación externa (Roeder, 1995); además, establece la ingesta diaria tolerable provisional para los seres humanos en 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día y cero para las mujeres embarazadas (ANZFA, 2001). Regulaciones similares se han propuesto en otros países como Gran Bretaña y Australia (Stegelmeier *et al.*, 1999).

La EFSA realizó una evaluación de seguridad para los PA en alimentos, y recomienda que su ingesta no debe ser mayor de 0.007 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día, ya que una cantidad mayor aumentaría el riesgo de aparición de cáncer.

El Departamento de Alimentos e Higiene Ambiental del gobierno de Hong Kong solicitó a las empresas productoras de especias y hojas de té, mejorar los procesos de cultivo y cosecha para disminuir la aparición de PA en sus productos (FAO/WHO, 2017). En Colombia aún no existen regulaciones para este tipo de compuestos en productos de consumo humano o animal, seguramente por la falta de información en el tema.

2.9 Métodos de extracción

Los PA tienen un átomo de nitrógeno terciario reducido con función básica, también se presentan en forma oxidada (PANO). Ambas formas tienen poca solubilidad en solventes orgánicos apolares como hexano, pero se extraen fácilmente con solventes orgánicos polares como el metanol o con ácidos acuosos diluidos. Estos solventes extraen tanto los PA como los PANO.

Los PA se extraen tanto de material vegetal fresco como seco. Los métodos convencionales se basan en sumergir el material vegetal triturado en metanol u otro solvente orgánico acidificado, seguido de calentamiento o agitación ultrasónica, dependiendo de la finalidad de la extracción, ya que los métodos que requieren calentamiento disminuyen significativamente la extracción de PANO.

Posteriormente, el solvente se evapora del extracto y se reconstituye en una solución acuosa acidificada en la que se extraen los PA. Se hace un proceso de extracción líquido-líquido con hexano para limpiar el extracto. Los PANO presentes en la solución se reducen incorporando Zn en polvo y agitando por dos o tres horas. Finalmente, la solución se basicifica con NH_4OH y se extrae con diclorometano para el análisis del extracto por GC-MS (Crews *et al.*, 2010; Griffin, Sheehan, Danaher, & Furey, 2017; Mattocks, Rebekah, & Janet, 1989).

2.10 Dispersión de la matriz en fase sólida

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es un método de extracción y aislamiento de analitos de muestras biológicas, sólidas, semi-sólidas o altamente viscosas, introducido en 1989 por Barker (A. Barker, Long, Short, & Rouge, 1989). La técnica consiste en mezclar el

material a extraer con un dispersante, que puede variar (fluorisil, gel de sílice, arena o sílice- C_{18}); posteriormente, con ayuda de un mortero y un solvente volátil se macera la matriz hasta obtener una mezcla homogénea, que se introduce dentro del cuerpo de una jeringa compactándola levemente hasta formar una especie de columna; luego, los analitos se eluyen con un solvente apropiado. Esta técnica se ha utilizado en diferentes matrices y muestra muchas ventajas para la extracción de analitos gracias a su selectividad y rapidez (S. a Barker, 2007).

2.11 Cromatografía

La cromatografía agrupa diversos métodos, que permiten separar componentes de mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil se hace pasar en una columna a través de una fase estacionaria con la que es inmisible. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente (Skoog, West, Holler, & Couch, 2005).

2.12 Espectrometría de masas

De todas las herramientas analíticas, la espectrometría de masas es quizás la de mayor aplicación. La técnica proporciona información sobre: (1) la composición elemental de analitos, si se usan analizadores de alta resolución; (2) las estructuras de las moléculas; (3) la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas; (4) la estructura y composición de superficies sólidas; y (5) las relaciones isotópicas de átomos de las muestras (Skoog *et al.*, 2005).

En el espectrómetro de masas, la muestra se ioniza mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto de electrones, las moléculas se bombardean con electrones de una energía estándar (70 eV), lo que provoca la emisión de un electrón de las moléculas, su ionización y posterior fragmentación.

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+), también, se forman iones fragmento debido a la disociación de aquellos iones moleculares, que tienen suficiente energía para fragmentarse. El tipo y la cantidad relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante un campo eléctrico o magnético. La cantidad de movimiento de cada ion será dependiente de su relación masa/carga (m/z). La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra (suponiendo que se trate de una sustancia pura), produce el espectro de masas de la sustancia, que es único para cada compuesto químico, y constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con el de una

librería de espectros, lo que permite realizar la identificación tentativa del compuesto, inclusive de forma automática.

2.13 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de uso intensivo en muchas ramas de la ciencia, tiene gran fortaleza en el análisis de los componentes en una mezcla (Stashenko & Martínez, 2009). Sin embargo, para incrementar la capacidad de establecer confiablemente la estructura química de los compuestos separados la cromatografía, se requiere su acople con detectores de masas.

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, que es un gas inerte. En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la columna, distribuyéndose entre la fase móvil y la fase estacionaria que se fija a la pared de una columna capilar.

La columna se encuentra dentro de un horno, cuya temperatura se puede programar. La velocidad de migración de cada componente, y, en consecuencia, su tiempo de retención (t_R) en la columna es función del coeficiente de distribución, K_D , entre la fase móvil y la fase estacionaria (Skoog *et al.*, 2005). El acoplamiento de GC y MS, por sus siglas en inglés, da lugar a una técnica combinada (GC-MS), que permite la separación e identificación de componentes en mezclas complejas. La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan poca cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil, porque se utilizan columnas de pequeño diámetro y flujos de gas muy bajos (<1 mL/min). En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa

como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (*Total Ion Current*). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar, idealmente, a un pico simétrico gaussiano, cuya área es proporcional a la concentración del compuesto detectado.

2.14 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía líquida (LC) es un método físico de separación en el que la fase móvil, es un líquido, y la separación es el resultado de un proceso repetido de absorción/desorción del analito a través de la fase estacionaria de la columna. LC-MS es una técnica analítica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía líquida con la capacidad de identificación de la espectrometría de masas (MS). El sistema de LC-MS se utiliza para la identificación rápida de analitos con masas específicas en mezclas de interés en las áreas de la investigación básica, farmacéutica, agroquímica, alimentaria, entre otras áreas (Arpino, 1992; Niessen, 2006). La interfaz más usada en LC-MS es la ionización a presión atmosférica (API), hay dos tipos: (1) electronebulización o *electrospray* (ESI) y (2) la ionización química a presión atmosférica (APCI).

ESI es una técnica de ionización suave, a presión atmosférica, en la que se aplica un voltaje entre el capilar de salida de la muestra y el contraelectrodo que es otro capilar, que conduce los iones hacia el analizador. El efecto del campo eléctrico hace que la muestra salga del capilar formando un cono (cono de Taylor), a partir del cual se generan pequeñas gotas cargadas eléctricamente. A medida que estas gotas avanzan en la cámara de desolvatación, el solvente se evapora por la acción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil,

el tamaño de la gota se disminuye y se aumenta la densidad de carga eléctrica en su superficie hasta llegar a un punto crítico, cuando las fuerzas coulombicas de repulsión de los iones vencen la tensión superficial que mantiene unidas las gotas en forma esférica, causando su ruptura y evaporación de los iones que pasan a la fase gaseosa (Agilent Technologies Inc., 2011). Los iones formados atraviesan un orificio cónico de una región de vacío intermedio y, desde allí, a través de una pequeña abertura en el alto vacío, llegan al analizador de masas (Ekman, Silberring, Westman-Brinkmalm, & Kraj, 2008; Hoffmann & Stroobant, 2007).

Uno de los analizadores más comunes en la técnica LC-MS, es el analizador de tiempo de vuelo (TOF). Los iones generados en la interfaz se aceleran mediante un campo eléctrico. La separación de los iones en el analizador se hace en función de sus masas, durante su recorrido hacia el detector situado al final de un tubo. La ventaja del TOF, es la velocidad alta con la que registran los espectros de masas, hasta 500 espectros por segundo. Además, a diferencia de los demás analizadores, su precisión no depende de la estabilidad del campo magnético, sino del mantenimiento de sus circuitos eléctricos (Niessen, 2006).

El *Orbitrap* es un detector de iones, que se puede utilizar para analizar una gran variedad de compuestos químicos, acoplado a un cromatógrafo líquido o de gases. Proporciona alta resolución, precisión y un amplio rango dinámico. En *Orbitrap*, los iones se inyectan en el volumen entre los electrodos (central y externos) a lo largo de una tangente a través de una ranura, con un electrodo de compensación (un "deflector") en uno de los electrodos exteriores. El voltaje aplicado entre los electrodos central y externo hace que el campo eléctrico radial doble la trayectoria del ion hacia el electrodo central, mientras que la velocidad tangencial crea una fuerza centrífuga opuesta. Con una elección correcta de parámetros, los iones permanecen en una espiral casi circular dentro de la trampa. Al mismo

tiempo, el campo eléctrico axial causado por la forma cónica de los electrodos, empuja los iones hacia la parte más ancha de la trampa provocando que los iones tengan oscilaciones armónicas axiales (Véase **Figura 8**). Los iones con una específica relación masa-carga (m/z) se mueven en anillos que oscilan alrededor del eje central, la frecuencia de estas oscilaciones no depende de la velocidad de los iones, pero es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su relación m/z (eje Z). Los electrodos exteriores utilizan placas receptoras para la detección de la corriente de imagen de las oscilaciones. La corriente de imagen se digitaliza en el dominio del tiempo aplicando la transformada de Fourier, para luego convertirla en los espectros de masas (Zubarev & Makarov, 2013), que relacionan los m/z de cada ion con su corriente, *i.e.* cantidad (intensidad, %).

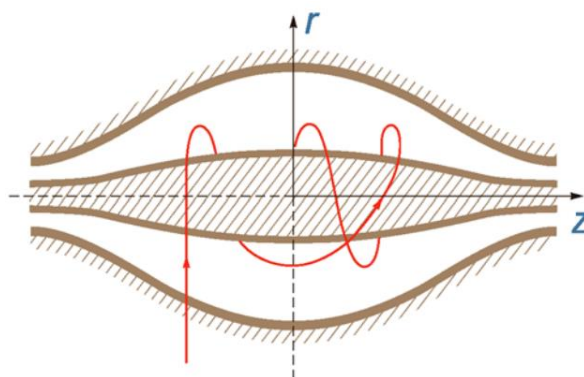


Figura 8. Esquema del detector *Orbitrap* y ejemplo de una trayectoria de iones estable. Tomado de Makarov *et al.* (2013).

3 Materiales y Métodos

3.1 Reactivos, solventes, materiales y equipos

Los reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados en este trabajo de investigación se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2.

Reactivos, solventes, materiales y equipos auxiliares de laboratorio utilizados en este trabajo de investigación.

MOMBRE	ESPECIFICACIONES
REACTIVOS	
Zinc en polvo	95-99%, Merck (Darmstadt-Alemania)
Ácido clorhídrico	37%, Merck (Darmstadt-Alemania)
Ácido fórmico	98%, Merck (Darmstadt-Alemania)
Hidróxido de amonio	28 – 30%, J.T. Baker (Phillisburg, NJ, EE. UU.)
Monocrotalina	100%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.)
Retonecina	95,7%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.)
Retrorsina	99,0% Sigma -Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.)
<i>n</i> -Hexano	99.9%, Merck, (DarmStadt-Alemania)
Metanol	99.9%, Merck, (Darmstadt-Alemania)
Diclorometano	99.9%, Merck (Darmstadt, Alemania)
Acetonitrilo	Grado analítico; Merck (Darmstadt, Alemania)
MATERIALES Y EQUIPOS AUXILIARES DE LABORATORIO	
Viales cromatográficos	2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, CA, EE. UU.)

Tabla 2. Continuación.

Micropipetas	2-20, 20-200, 100-1000 μ L; Brand (Wertheim, Alemania)
Consumibles	Jeringas plásticas 5 mL, <i>septa</i> , algodón.
Pipetas	1, 5, 10 mL
Balanza analítica	Mettler-Toledo PB1502-S (Nänicon, Suiza)
Ultrasonido	Elmasonic E30H (Elma, Alemania)
<i>Minishaker</i>	IKA (Hofheim, Alemania)
Centrífuga	Compac II Centrifuge, Clay Adams (Sparks, MD. EE.UU.)

3.2 Recolección e identificación del material vegetal.

Los especímenes de las especies de *Crotalaria*, con flores y frutos, se recolectaron en los alrededores de Bucaramanga. Se elaboraron tres *exsiccata*; dos, se enviaron al Herbario Nacional, en donde se hizo su identificación, y una, a la colección del herbario de CENIVAM. Los demás especímenes se separaron en partes (flores, semillas, raíces y hojas); posteriormente, se rotularon y se almacenaron envueltos con papel periódico en un lugar fresco y seco durante un periodo de dos meses. Una vez las muestras estuvieron secas, se llevaron al molino de aspas SM-100 (Retsch, Haan, Alemania) con malla de tamaño de poro de 1 mm². Cada muestra se rotuló, se almacenó en papel aluminio y bolsas de papel para su posterior extracción y análisis.

3.3 Implementación del método de extracción de los PA y PANO en hojas de *Crotalaria*

El método de extracción de los PA en diferentes partes de *Crotalaria* fue la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). La estandarización del método se realizó usando tres tipos de soporte sólido, *i.e.*, arena, fluorisil o gel de sílice modificada con C₁₈; se variaron los

solventes de extracción, así: metanol o metanol acidificado con ácido fórmico al 2% para determinar si la protonación de los PA mejoraba su extracción. En la

Se adicionó el soporte sólido en relación 1:4 (200 mg), se adició 2-propanol (200 µL) y se maceró la mezcla hasta la obtención de un talco fino. La mezcla se depositó en una columna MSPD que contenía en el fondo un filtro de algodón. La elución se realizó con el solvente seleccionado (5 mL). Se tomó una alícuota del extracto (50 µL) y se aforó a 1 mL con una solución 9:1 agua:acetonitrilo con 0,2% ácido fórmico; la concentración final de retrorsina fue de 199 ng/mL; la solución se pasó por un filtro de PDVF (*Polyvinylidene difluoride*) de 0,22 µm y se analizó por LC-MS.

Tabla 3, se muestran las condiciones que se manejaron para realizar cada experimento.

Para la implementación del método de extracción se tomaron hojas de *C. nitens* (200 g) de plantas cultivadas en el jardín de CENIVAM, se trituraron con nitrógeno líquido y se liofilizaron. Se molieron y homogeneizaron. Se tomó una porción de muestra (50 mg) y se colocó en un mortero. Se adicionó la retrorsina (200 µL, 99,5 µg/mL) y se homogeneizó para incorporar el estándar en la muestra. La retrorsina se preparó disolviendo 1,04 mg (95,7%, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en 10 mL de metanol.

Se adicionó el soporte sólido en relación 1:4 (200 mg), se adició 2-propanol (200 µL) y se maceró la mezcla hasta la obtención de un talco fino. La mezcla se depositó en una columna MSPD que contenía en el fondo un filtro de algodón. La elución se realizó con el solvente seleccionado (5 mL). Se tomó una alícuota del extracto (50 µL) y se aforó a 1 mL con una solución 9:1 agua:acetonitrilo con 0,2% ácido fórmico; la concentración final de retrorsina

fue de 199 ng/mL; la solución se pasó por un filtro de PDVF (*Polyvinylidene difluoride*) de 0,22 μm y se analizó por LC-MS.

Tabla 3.

Condiciones de los seis experimentos realizados, con sus respectivas réplicas para la evaluación del método de extracción.

Nº	Soporte	Peso de muestra, mg	Solvente
1	Arena	47,8	MeOH
2	Arena	46,5	MeOH
3	Arena	51,1	MeOH
4	Arena	51,4	MeOH, ácido fórmico 2%
5	Arena	62,5	MeOH, ácido fórmico 2%
6	Arena	61,7	MeOH, ácido fórmico 2%
7	C ₁₈	53,1	MeOH
8	C ₁₈	51,5	MeOH
9	C ₁₈	50,1	MeOH
10	C ₁₈	59,6	MeOH, ácido fórmico 2%
11	C ₁₈	53,4	MeOH, ácido fórmico 2%
12	C ₁₈	50,5	MeOH, ácido fórmico 2%
13	Florisil	53,6	MeOH
14	Florisil	60,3	MeOH
15	Florisil	55,5	MeOH
6	Florisil	60,9	MeOH, ácido fórmico 2%
17	Florisil	47,3	MeOH, ácido fórmico 2%
18	Florisil	45,0	MeOH, ácido fórmico 2%

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 ng/mL), así: se tomó una alícuota (200 μ L, 99,5 μ g/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 μ L) y se aforó a 1 mL con una solución 9:1 agua:acetonitrilo con 0,2% de ácido fórmico, se filtró (PDVF, 0,22 μ m) y se analizó por LC-MS, bajo las mismas condiciones que las muestras. La solución patrón se inyectó por triplicado.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC 1200 *Series* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) (Véase **Figura 9**), equipado con una unidad de desgasificación de solvente al vacío (G1379B), una bomba binaria de gradiente (G1312A), un inyector automático de muestras (G1367B) y una unidad termostada para la columna (G1316A). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Kinetex C_{18} (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.; 100 \times 4,6 mm d.i., 2.6 mm de tamaño de partícula), a 40 °C. La fase móvil A constó de una solución acuosa al 0,2% del ácido fórmico y B, acetonitrilo y ácido fórmico al 0,2%. La condición inicial de gradiente fue de 95% de A y 5% de B, cambiando linealmente hasta 10% de B en 3 min, luego, 20% de B en 5 min, y 80% de B en 10 min durante 5 min, se cambió a 100% de B en 5 min, y se mantuvo durante 5 min, el retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min; el tiempo total de la corrida fue de 40 min. El flujo de la fase móvil fue de 0,2 mL/min y el volumen de inyección de 20 mL. El acoplamiento se realizó a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (AT-TOF-MS, 6210 *Series*; AT, Palo Alto, CA, EE.UU.) a través de una interfaz de electronebulización dual (ESI), operada en modo positivo. Se usaron nitrógeno como gas secante (350 °C, 7 L/min) y también nitrógeno como gas nebulizador (40 psi). El voltaje del

capilar fue de 1000 V, fragmentador 200 V, *skimmer* 65 V y el voltaje del octopolo 1 fue de 250 V. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de masas de m/z 100-950 con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. En la interfaz de electronebulización dual se usó una solución de referencia de purina ($C_5H_5N_4$) y hexaquis (1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoruropentoxi)-osfazeno ($C_8H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$) y los dos iones en m/z 121,05087 y 922,00980 para corrección y ajuste de masas exactas en el tiempo real durante cada corrida cromatográfica.



Figura 9. Cromatógrafo líquido AT 1200 Series con analizador de tiempo de vuelo AT TOF-MS 6210 Series. Laboratorio: Análisis instrumental, CROM-MASS. Fuente: Fausto Prada, 17 de diciembre de 2016.

3.4 Identificación tentativa de los PA y PANO en *Crotalaria* spp.

Los alcaloides (PA y PANO) para identificación, se extrajeron de raíces y semillas de *Crotalaria* spp. secas, molidas y homogeneizadas, usando el MSPD con tamaño de muestra

de 3–4 g. Los PA y PANO se identificaron de manera tentativa usando información complementaria obtenida tanto por LC-ESI⁺-*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 sus espectros de masas, cuando se inyectan en la cámara de colisiones de alta energía (HCD, *High-Energy Collisional Dissociation*). Para en análisis GC-MS, los PANO se convirtieron a PA por reducción con Zn en polvo en medio ácido. Los PANO se descomponen a la temperatura del puerto de inyección de un GC. Los criterios de identificación en GC-MS fueron, la comparación de los índices de retención lineales (IRL) de los PA con los encontrados en la literatura [5,29,67], 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.

Las muestras de raíces y semillas (3–4 g) se les adicionaron sílice modificada con C₁₈ (2 g), se maceraron en un mortero hasta obtener una mezcla homogénea que se introdujo en una columna, la cual contenía un filtro de algodón en el fondo. La elución de los PA y PANO se hizo adicionando metanol acidificado con ácido fórmico al 2% (40 mL para semillas, 60 mL para raíces). Para el análisis LC-MS, se tomó una alícuota (200 µL), se llevó a sequedad y se reconstituyó con una mezcla de ACN:H₂O 1:9 (v/v) con ácido fórmico 0,2% (1 mL), la solución se filtró (PDVF, 0,22 µm) y se analizó por LC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS (extracto de los PA y PANO). Para el análisis GC-MS, los PANO se redujeron a PA con Zn metálico en polvo en medio ácido. La solución restante se rotoevaporó (400 mbar, 60 °C) hasta tener un volumen de 2 mL, aproximadamente, y se llevó hasta sequedad con la corriente de nitrógeno. El extracto se disolvió en HCl al 2,5% (10 mL) y se limpió con hexano (3 x 10

mL). Se incorporó Zn en polvo (200 mg); la mezcla se agitó durante tres horas, según la metodología propuesta por Fletcher (Fletcher *et al.*, 2009). Se adicionó NH₄OH (1 mL) al 28% y los PA se extrajeron con diclorometano (3 x 15 mL), se tomó una alícuota (100 µL), se llevó a sequedad, se disolvió en una solución ACN:H₂O 1:9 (v/v) con ácido fórmico (0,2%, 1 mL) y se filtró, para su análisis LC-*Orbitrap*-MS (extracto de los PA). El extracto restante se llevó a sequedad con ayuda del rotaevaporador y corriente de nitrógeno; se reconstituyó en metanol (1 mL) y se filtró para su análisis por CG-MS.

3.5 Análisis UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS de los extractos que contienen PA y PANO.

Para el análisis de las muestras se usó un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC) *Dionex*TM *UltiMate*TM 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) (**Figura 10**). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna *Hypersil GOLD*TM *aQ* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE. UU.; 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 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. El flujo fue de 300 µL/min y el volumen de inyección, 1 µL. El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas *Orbitrap*TM *Exactive Plus* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) a través de una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II) operada en modo de iones positivos, a 350 °C. El nitrógeno (>99%) para la HESI-II se obtuvo de un generador

NM32LA (*Peak Scientific*, Scotland, Reino Unido) (**Figura 10**). La temperatura del capilar fue de 320 °C, y el voltaje del nebulizador fue de 3,5 kV. Los flujos del nitrógeno usado como gas *sheath* y como gas auxiliar se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. La resolución del analizador *Orbitrap* para el modo de barrido completo (*full MS scan*) se ajustó a 70 000 (*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 confirmar su identificación, los compuestos protonados, fragmentaron a diferentes energías (20, 30, 40 y 50 eV) en la celda de colisiones HCD (*High-Energy Collisional Dissociation*) en el modo de barrido por pasos (*step scan*). Los espectros de masas se registraron 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. El analizador *Orbitrap* se calibró en modo de iones positivos 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* (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EE. UU.). La solución de calibración se preparó en acetonitrilo:metanol:agua con 1 % de ácido acético, 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, usando el *software* *Thermo Xcalibur* v3.1 (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE. UU.).



Figura 10. Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC) acoplado a un detector de masas (*Orbitrap*), por medio de una interfaz HESI. Foto tomada por Dra. Elena Stashenko. Lugar: Laboratorio Makarov, CENIVAM-UIS, Bucaramanga.

3.6 Análisis por GC-MS de los extractos obtenidos después de la reducción de los PANO a los PA.

La identificación tentativa de los PA en los extractos de las especies de *Crotalaria*, se realizó en un equipo GC *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, California, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies AT MSD 5973 Network* (**Figura 11**). La separación de los compuestos presentes en las mezclas 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_f ; en la que se empleó 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). 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 (EI) con energía de 70 eV. La identificación de los PA se hizo por comparación de sus espectros de masas con los de las bases de datos (NIST V.08 y WILEY) y los índices de retención lineales (IRL) experimentales y reportados en la literatura (Fletcher *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2009; Witte, Rubiolo, Bicchi, & Hartmann, 1992).



Figura 11. Cromatógrafo de AT 6890 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas AT 5973 *Network*. Fuente: Julián Lozano, Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS. UIS, Bucaramanga, 9 de julio de 2017.

Los IRL se calcularon con base en los tiempos de retención de hidrocarburos lineales, C₆-C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas que muestras, usando la siguiente ecuación:

$$IRL_x = 100n + 100 \left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

IRL_x : Índice de retención del compuesto de interés x.

n: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés x.

N: Número de átomos de carbono del N-alcano que eluye después del compuesto de interés x.

t_{Rx}: Tiempo de retención del compuesto de interés x.

t_{Rn}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés x.

t_{RN}: Tiempo de retención del N-alcano que eluye después del compuesto de interés,x.

3.7 Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida y cuantificación de los PA y PANO en *Crotalaria* spp.

La extracción y cuantificación de los PA y PANO en raíces, hojas, flores y semillas de *Crotalaria* spp. se realizó por MSPD y LC-ESI⁺-Orbitrap-MS, respectivamente. Se tomaron muestras (100 mg) de las partes de las plantas secas, molidas y homogeneizadas y se mezclaron con el soporte sólido (sílice-C₁₈, 200 mg) en una relación 1:4; se maceró y la mezcla se colocó en una columna MSPD que contenía un filtro de algodón en el fondo. La elución de los analitos se realizó con metanol acidificado con ácido fórmico al 2% (5 mL).

De cada extracto, se tomó una alícuota según la cantidad de alcaloide esperada en la muestra (100 μL para hojas, flores y raíces, o 50 μL para semillas), se completó a 1 mL con una mezcla ACN: H_2O 1:9 (v/v) con ácido fórmico 0,2%, se filtró y se analizó por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS, como se describe en la **Sección 3.5**. Para la cuantificación de los PA y PANO se usó el factor de respuesta de la curva de calibración de la monocrotalina, uno de los alcaloides más comunes en *Crotalaria* spp. Se preparó una solución patrón de 550 mg/L en metanol. Se pesaron 5,5 mg de monocrotalina (100%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se aforaron a 10 mL con 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 H_2O :ACN 9:1 (v/v) con de ácido fórmico 0,2 % para obtener cinco concentraciones de 11, 55, 110, 220 y 550 $\mu\text{g/L}$. Las soluciones de diferentes concentraciones se inyectaron 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 $\mu\text{g/L}$ 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 ANÁLISIS

4.1 Recolección e identificación del material vegetal.

La selección de los especímenes en las salidas botánicas se realizó teniendo en cuenta la descripción del género *Crotalaria* propuesta por Polhill (R M Polhill, 1968; Roger M Polhill, 1982) y reproducida en Colombia por Bernal (H. Y. Bernal, 1986) en su trabajo para el Herbario Nacional de Colombia.

En resumen, se encontraron seis especies del género de interés, *C. nitens*, *C. pallida*, *C. incana*, *C. spectabilis*, *C. maypurensis* y *C. retusa* en los cinco municipios de Santander. La **Tabla 4**, muestra el número de órganos separados de las seis especies recolectadas durante la presente investigación.

La identificación botánica de las especies bajo estudio se llevó a cabo en el Herbario Nacional de Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional, sede Bogotá, por los doctores G. Galeano, D. Giraldo y C. Parra. Los resultados de la identificación taxonómica de las especies recolectadas se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 4.

Número de muestras recolectadas para las diferentes partes de *Crotalaria* spp. estudiadas.

Especie	Número de muestras			
	Semilla	Flor	Hoja	Raíz
<i>C. maypurensis</i>	7	5	6	6
<i>C. nitens</i>	4	3	10	6
<i>C. pallida</i>	13	4	10	8
<i>C. retusa</i>	4	3	4	4
<i>C. spectabilis</i>	7	2	7	6
<i>C. incana</i>	10	2	9	7

Tabla 5.

Identificación taxonómica de las especies de *Crotalaria* spp. recolectadas cerca de Bucaramanga, Santander.

Especie	Municipio	Latitud y longitud	Altitud msnm	Voucher N° COL	Determinó
1) <i>C. incana</i> L	Bucaramanga	7°08'13.6"N 73°07'04.0"W	1009	579432	D. Giraldo
<i>C. incana</i> L.	Girón	6°58'56.4"N, 73°10'18.7"W	828	582806	O. Rivera
<i>C. incana</i> L.	Bucaramanga	7°05'30.7"N 73°06'32.6"W	927	585775	C. Parra
<i>C. incana</i> L.	Floridablanca	7°02'19.8"N 73°05'23.0"W	1201	585774	C. Parra
<i>C. incana</i> L.	Girón	7°00'20.9"N 73°10'10.9"W	758	585773	C. Parra
<i>C. incana</i> L.	Bucaramanga	7°08'26.8"N 73°07'01.1"W	993	585772	C. Parra
<i>C. incana</i> L.	Floridablanca	7°05'12.3"N 73°05'33.9"W	937	585771	C. Parra
2) <i>C. maypurensis</i> K.	Bucaramanga	7°08'26.8"N 73°07'01.1"W	993	582810	O. Rivera
<i>C. maypurensis</i> K.	Betulia	7°00'33.4"N 73°21'54.5"W	411	582805	O. Rivera
<i>C. maypurensis</i> K.	Girón	6°54'33.2"N 73°09'49.0"W	850	586229	D. Giraldo
3) <i>C. nitens</i> K.	Piedecuesta	6°56'41.5"N 73°02'05.8"W	1144	579431	D. Giraldo
<i>C. nitens</i> K.	Floridablanca	7°05'34.7"N 73°04'35.8"W	1174	586226	D. Giraldo
4) <i>C. pallida</i> A.	Floridablanca	7°02'19.8"N 73°05'23.0"W	1201	579433	D. Giraldo
<i>C. pallida</i> A.	Floridablanca	7°05'11.1"N 73°05'41.8"W	908	582807	O. Rivera
<i>C. pallida</i> A.	Bucaramanga	7°05'30.7"N 73°06'32.6"W	927	585765	C. Parra
<i>C. pallida</i> A.	Bucaramanga	7°06'05.7"N 73°06'16.4"W	961	585762	C. Parra
<i>C. pallida</i> A.	Betulia	7°01'15.5"N 73°20'55.1"W	299	585763	C. Parra

Tabla 5. Continuación

<i>C. pallida</i> A.	Girón	7°00'59.6"N 73°09'34.3"W	734	585761	C. Parra
<i>C. pallida</i> A.	Floridablanca	7°07'06.9"N 73°04'14.1"W	1675	585760	C. Parra
5) <i>C. retusa</i> L.	Girón	6°59'33.8"N, 73°10'07.3"W	809	582807	O. Rivera
6) <i>C. spectabilis</i> R.	Betulia	6°59'49.1"N 73°22'11.4"W	299	582809	O. Rivera
<i>C. spectabilis</i> R.	Betulia	7°00'42.5"N 73°21'20.8"W	405	586227	D. Giraldo
<i>C. spectabilis</i> R.	Floridablanca	7°06'45.3"N 73°04'43.1"W	1572	586228	D. Giraldo

4.2 Implementación del método de extracción

La evaluación del método de extracción se realizó estimando el porcentaje de recuperación de retrorsina, según el procedimiento descrito en la **Sección 3.3**. El cálculo del porcentaje de recuperación se hizo con base en la relación de la concentración de retrorsina extraída en la muestra con respecto a la concentración de la retrorsina inicial agregada, así:

$$\%Rec = \frac{\text{Concentración extraída de la muestra}}{\text{Concentración inicial agregada en la muestra}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

La cuantificación de la retrorsina extraída, se realizó por el método de estándar externo. Se construyó una curva de calibración con el patrón certificado de retrorsina. El rango de concentraciones fue de 5-507 ng/mL, (Véase **Figura 12**).

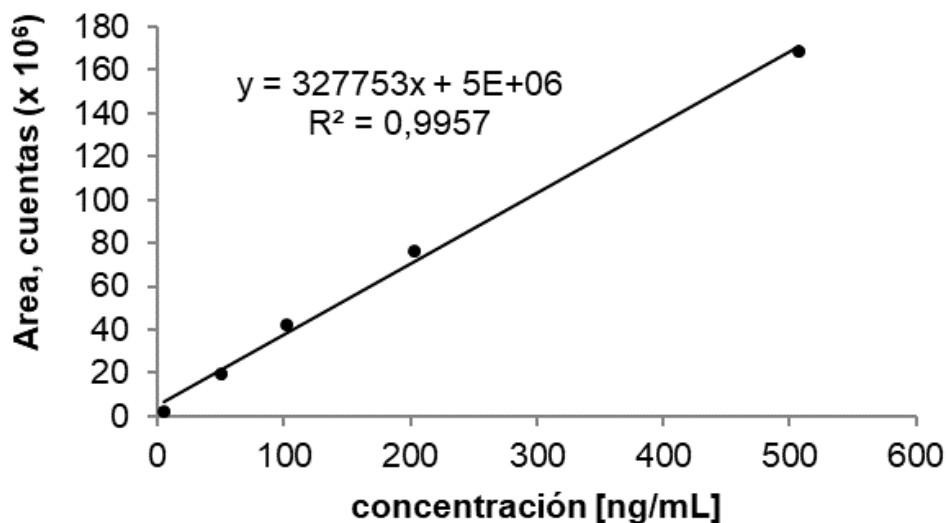


Figura 12. Curva de calibración de la retrorsina ($C_{18}H_{25}NO_7$, $[M+H]^+$: m/z 352.17546) obtenida por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS, operado en modo *full scan*.

Como se observa en la **Figura 13**, se encontraron diferencias significativas entre los seis experimentos evaluados (Véase **Tabla 3**), los valores experimentales están en el **Apéndice 1**. Con la sílice-C₁₈ como fase dispersante, se obtuvieron porcentajes de recuperación significativamente superiores (cercaos al 80%), que cuando se usó la arena de mar (60%) o fluorisil (70%) como soportes. No se encontraron diferencias significativas al usar metanol o metanol acidificado con ácido fórmico al 2%, sobre la eficiencia de recuperación de la retrorsina. Sin embargo, se seleccionó la combinación de sílice-C₁₈, como soporte, y metanol acidificado, como solvente de elusión para las extracciones de los PA y los PANO de las diferentes partes de *Crotalaria* spp. (Véase **Apéndice 1**).

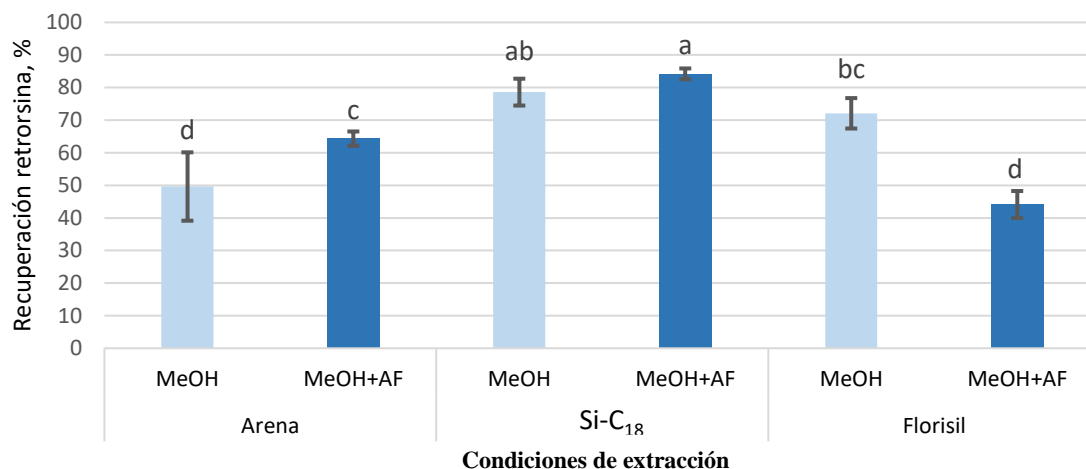


Figura 13. Porcentaje de recuperación de la retrorsina en el método de extracción por MSPD, con tres tipos de soportes sólidos (arena, C₁₈ y florisil) y con metanol o metanol acidificado. ANOVA, prueba de comparación de medias usando diferencias mínimas significativas (DMS), $p < 0,05$, misma letra no hay diferencias significativas. Los datos fueron obtenidos por Fausto Prada, Jessica Bautista y el autor (Véase **Apéndice 1**).

4.3 Determinación de los alcaloides pirrolizidínicos presentes en las muestras de *Crotalaria* spp.

La primera parte del trabajo se concentró en la identificación tentativa de los PA presentes en los diferentes órganos de *Crotalaria* spp. Se usaron los datos obtenidos por GC-MS para determinar los IRL y los espectros de masas experimentales se compararon con los de la literatura (Fletcher *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2009; Stelljes, Kelley, Molyneux, & Seiber, 1991; Witte *et al.*, 1992). Las muestras se analizaron también por LC-MS, para determinar las fórmulas moleculares a partir de las masas exactas y la interpretación de sus espectros.

4.4 Identificación de los PA reducidos con Zn usando GC-MS

El análisis de los extractos obtenidos por MSPD, en los cuales los PANO se sometieron al proceso de reducción para convertirlos a PA, se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. La **Tabla 6**, muestra los PA encontrados. Su identificación tentativa se realizó con base en dos parámetros: el primero, la determinación de los índices de retención lineales de cada analito y su comparación con los índices, reportados en la literatura (Véase **Apéndice 2**) (Fletcher *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2009; Stelljes *et al.*, 1991; Witte *et al.*, 1992); el segundo parámetro de identificación, fue, la comparación de los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos (NIST v.08 y WILEY). En el caso de la monocrotalina y la retronecina, se usaron patrones de referencia (Véase **Tabla 2**).

Tabla 6.

Iones característicos de los espectros de masas (EI, 70 eV), índices de retención lineales de los PA encontrados en los extractos obtenidos por MSPD, de las seis especies de Crotalaria estudiadas.

Alcaloide	Fórmula	IRL, DB-5		M ⁺ m/z, (%)	Iones característicos (I, %)	Modo de identificación *
		Exp.	Lit.			
Retronecina	C ₈ H ₁₃ NO ₂	1490	1465 (Witte <i>et al.</i> , 1992)	155 (17%)	136 (2), 126 (7), 111 (50), 94 (20), 80 (16), 68 (16), 55 (28), 43 (21)	a, b, c
7-Angeloilretronecina	C ₁₈ H ₂₇ NO ₅	1843	1830 (Witte <i>et al.</i> , 1992)	237 (2%)	219 (3), 154 (2), 137 (20), 136 (18), 124 (20), 111 (29), 106 (40), 94 (25), 80 (100), 55 (26)	b, c
9-Angeloilretronecina	C ₁₈ H ₂₇ NO ₅	1857	1840 (Witte <i>et al.</i> , 1992)	237 (1%)	193 (4), 154 (12), 137 (22), 138 (27), 136 (12), 126 (7), 108 (4), 94 (30), 93 (100), 80 (19), 55 (19)	b, c
9-Tigloilretronecina	C ₁₈ H ₂₇ NO ₅	1905	1888 (Witte <i>et al.</i> , 1992)	237 (2%)	138 (20), 137 (25), 136 (15), 120 (4), 93 (100), 80 (18), 67 (9), 55 (22)	b, c
Crispatina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	2220	2231 (Flores <i>et al.</i> , 2009)	309 (2%)	138 (28), 137 (22), 136 (76), 121 (25), 120 (79), 119 (100), 108 (18), 95 (45), 94 (55), 93 (65), 80 (35), 55 (21)	b, c
Retusina	C ₁₆ H ₂₅ NO ₅	2246	---	311 (11%)	296 (2), 210 (5), 154 (43), 140 (42), 138 (22), 122 (49), 96 (18), 82 (100), 55(21)	c
Monocrotalina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	2336	2338 (Flores <i>et al.</i> , 2009)	325 (1%)	236 (48), 138 (11), 137 (16), 136 (54), 120 (100), 95 (13), 94 (31), 93 (47), 80 (23)	a, b, c
Integerrimina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	2435	2414 (Flores <i>et al.</i> , 2009)	335 (3%)	248 (8), 220 (16), 138 (43), 136 (92), 120 (100), 109 (21), 94 (69), 93 (93), 80 (41), 67 (19)	b, c

Tabla 6. Continuación.

Usaramina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	2683	2673 (Flores <i>et al.</i> , 2009)	351 (4%)	281 (26), 220 (9), 138 (35), 136 (92), 122 (48), 120 (100), 108 (19), 95 (54), 94 (61), 93 (75), 80 (34), 55 (22)	b, c
-----------	---	------	------------------------------------	----------	---	------

* a- Sustancia de referencia.

b- IRL literatura [5,67].

c- Espectro de masas en base de datos NIST, (*matching* > 90%).

Los PA de base de retronecina, difieren levemente en sus cadenas laterales, por lo tanto, sus espectros de masas son similares, su identificación tentativa se realizó por sus índices de retención lineales (Bredenkamp, 1990; Flores *et al.*, 2009; Linstrom & Mallard, 2014; Stelljes *et al.*, 1991; Witte *et al.*, 1992). Muchos PA presentan el ion molecular de baja intensidad, por ende, se requiere un método de ionización suave para obtener la información sobre el peso molecular, por ejemplo, de la molécula protonada en el método LC-ESI⁺-MS.

La combinación de los IRL con los espectros de masas EI (70 eV) para el estudio de PA, permite distinguir entre monoésteres simples, los cuales ocurren naturalmente en PA esterificados con ácido senecioico, angélico o tíglico. Los ésteres de necina insaturados como la retronecina M⁺, *m/z* 273, en sus espectros de masas muestran fragmentos típicos en *m/z* 93, 136, 137 y 138, cuando el éster se encuentra en la posición C₉, y fragmentos en *m/z* 80, 106 y 111, cuando se encuentra en la posición C₇. Los ésteres de necina saturados M⁺, *m/z* 329, presentan los fragmentos en *m/z* 82, 139 y 156, cuando la sustitución es en la posición C₇, o en *m/z* 82, 95, 96, cuando la sustitución es en la posición C₉ (Véase **Apéndice 3**). En las **Figuras 14 y 15** se muestran el espectro de masas EI (70 eV) y el esquema propuesto para la fragmentación para la 7-angeloilretronecina, respectivamente.

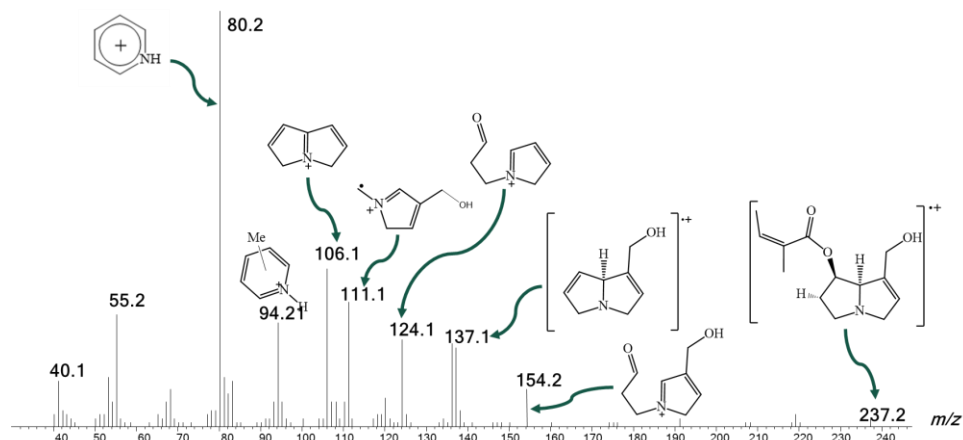


Figura 14. Espectro de masas experimental (EI, 70 eV). de la 7-angeloilretronecina, obtenido por GC-MS. La sustancia está presente en el extracto MSPD de raíces de *C.nitens*, que fue sometido al proceso de reducción con Zn.

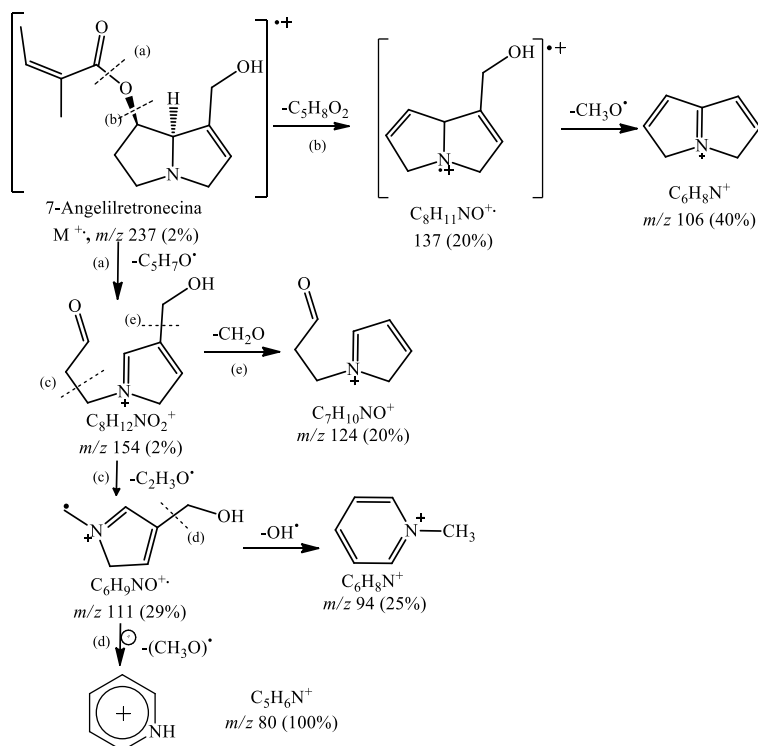


Figura 15. Ruta de fragmentación (EI, 70 eV) de la 7-angeloilretronecina (Brendenkamp, 1990).

Los PA macrocíclicos de tipo retronecina tienen iones intensos en m/z 136, 120, 119 y 93 e iones moleculares relativamente débiles (Neuner-Jehle, Nesvadba, & Spitteller, 1965) (Véase **Tabla 6**).

Los PA macrocíclicos poseen un patrón de fragmentación similar a la base necina a la que pertenecen, y solo se diferencian por la masa de su ion molecular, por ejemplo, para los compuestos macrocíclicos de diez miembros como la monocrotalina que tienen dos grupos hidroxilo en las posiciones C₁₂ y C₁₃; además, el ion molecular presenta un pico en su espectro de masas que corresponde a la escisión de los enlaces C₉-O₁₀ y C₁₂-C₁₃, con la migración de un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo en C₁₃ (Rashkes, Abdullaev, & Yunusov, 1974). El espectro de masas (EI, 70 eV) y el esquema de fragmentación propuesto para la monocrotalina se muestran en las **Figuras 16 y 17**, respectivamente. Otros ejemplos de PA macrocíclicos de diez miembros se pueden ver en el **Apéndice 4**.

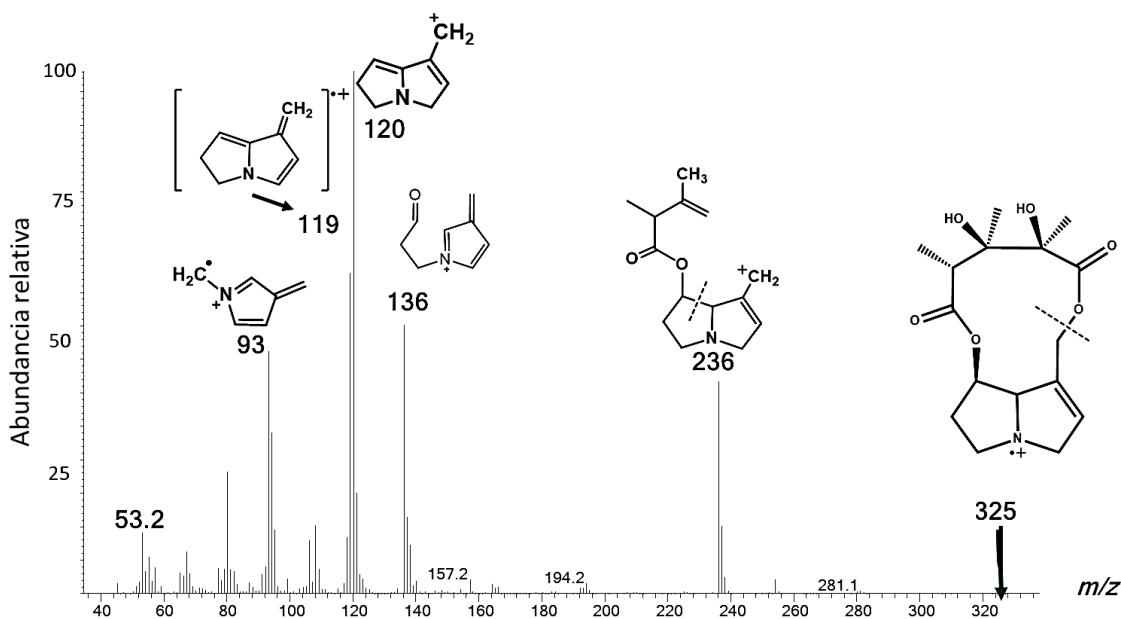


Figura 16. Espectro de masas experimental de la monocrotalina obtenido por GC-MS. EI (70 eV).

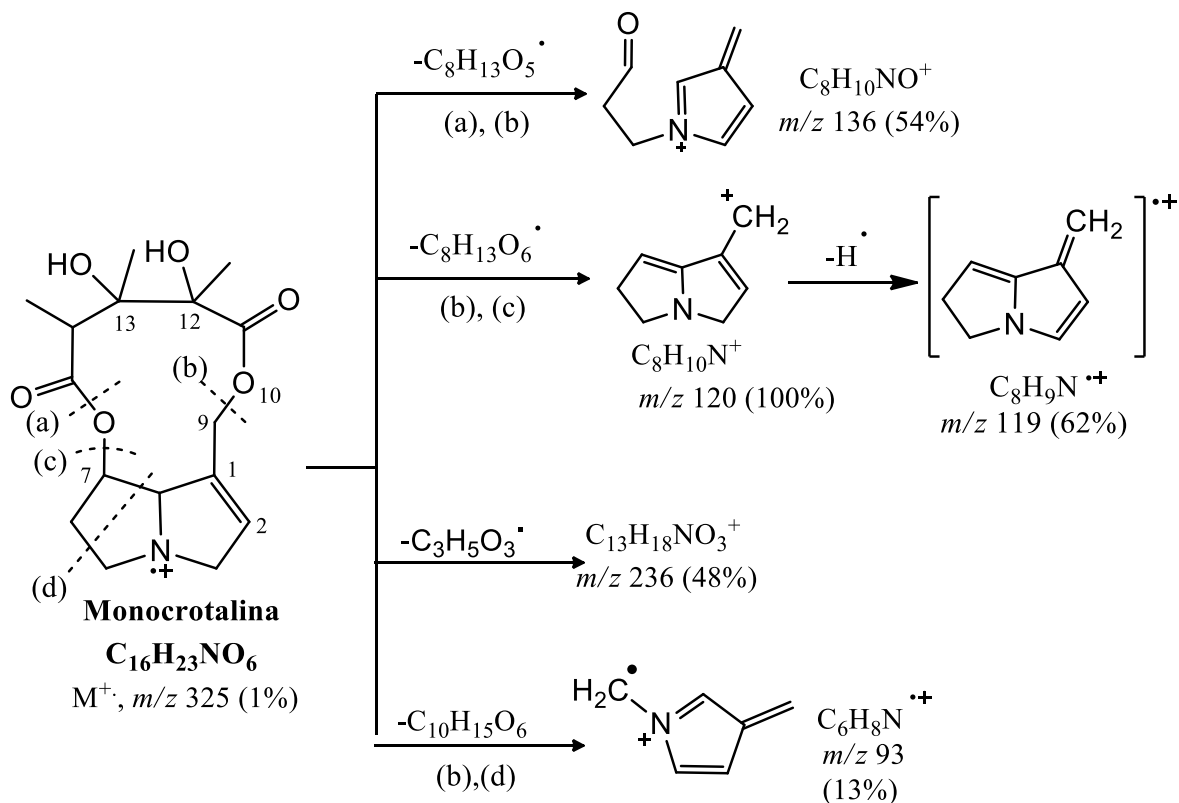


Figura 17. Esquema de fragmentación de la monocrotalina propuesto por Neuner-Jehle (EI, 70 eV), (Neuner-Jehle *et al.*, 1965).

Por otro lado, los espectros de masas para los PA macrocíclicos de once miembros se pueden diferenciar por la masa de su ion molecular y la aparición de una señal en $m/z 220$, por ejemplo, para la intergerrimina, ocurre la pérdida de un radical $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_3^\cdot$ como se muestra en la **Figura 18**. En el **Apéndice 5**, se pueden observar los fragmentos característicos en los espectros de masas para la usaramina y la intergerrimina.

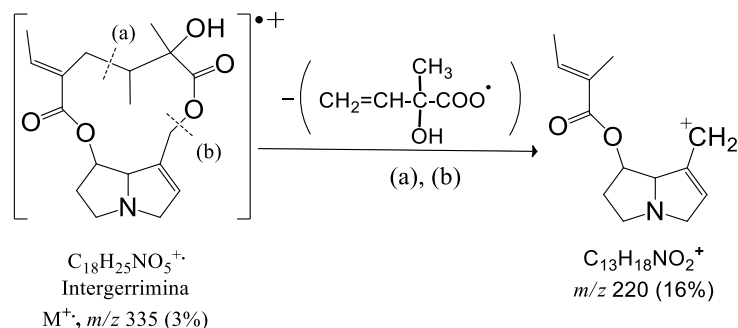


Figura 18. Generación del ion m/z 220 (16%), en el espectro obtenido por GC-MS (EI, 70 eV).

La **Figura 19** muestra el perfil cromatográfico de un extracto MSPD de semillas de *C. pallida* después del proceso de reducción con Zn/H^+ , se observó un pico de integerrimina, un PA macrocíclico de tipo retronecina.

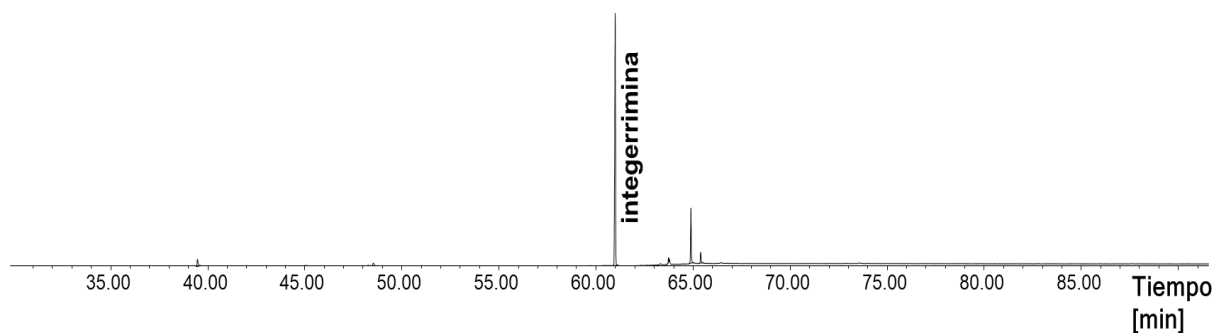


Figura 19. Perfil cromatográfico GC-MS de los PA, después de someter los PANO al proceso de reducción con Zn/H^+ . Extracto MSPD de semillas de *C. incana*. Columna DB-5MS, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

Se encontraron nueve alcaloides pirrolizidínicos por GC-MS en los extractos obtenidos por MSPD de las diferentes especies de *Crotalaria* spp. El primero, retronecina, junto con tres isómeros de cadena abierta (9-angeloilretronecina, 9-tigloilretronecina y 7-tigloilretronecina) y cinco macrocíclicos, de los cuales, cuatro son de tipo retronecina (monocrotalina, usaramina, integerrimina y crispatina) y uno, de tipo platinecina (retusina) (Véase **Figura 20**).

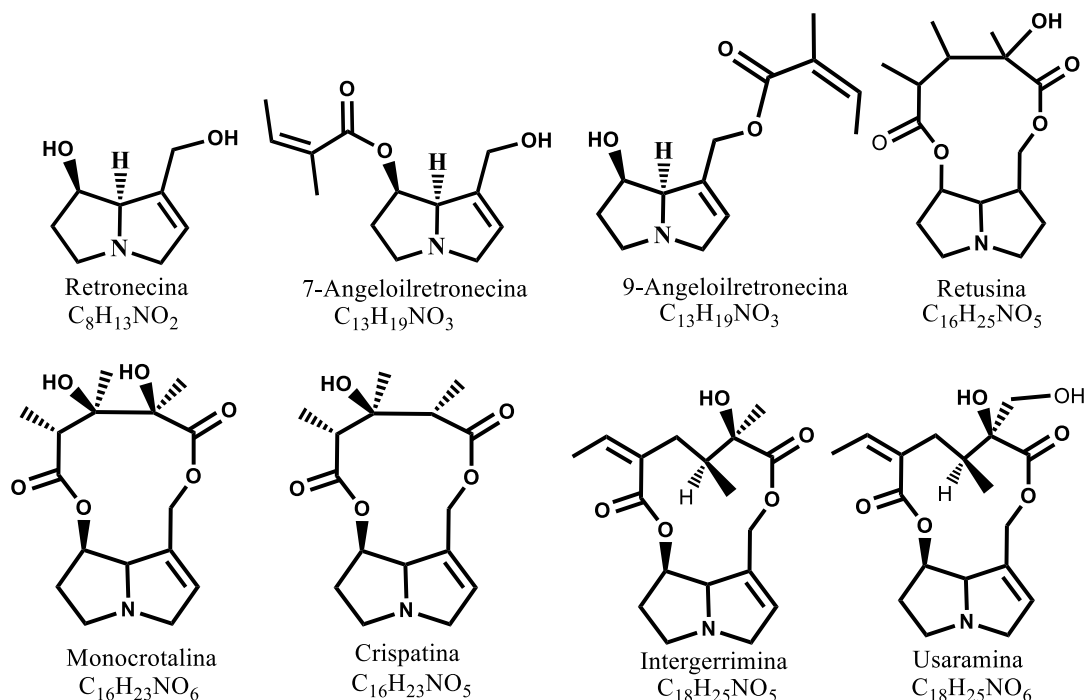


Figura 20. Compuestos identificados por GC-MS en los extractos MSPD de las especies de *Crotalaria* spp. estudiadas.

4.5 Análisis por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS de los PA y PANO en los extractos MSPD

La caracterización de los PA y PANO presentes en los extractos obtenidos por MSPD, se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, siguiendo la metodología descrita en la **Sección 3.5**. La identificación de los compuestos se realizó determinando las fórmulas moleculares calculadas a partir de las masas exactas, usando el software *Thermo Xcalibur v3.1* (*Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.*), la exactitud de las masas Δ ppm por comparación de la masa exacta experimental y la masa calculada (**Ecuación 3**). En el caso de los PA, por la comparación de espectros de masas obtenidos en el *Orbitrap* con los espectros obtenidos por impacto de electrones (EI, 70 eV).

$$\Delta\text{ppm} = \frac{\text{Masa}_{\text{calculada}} - \text{Masa}_{\text{experimental}}}{\text{Masa}_{\text{calculada}}} \times 10^6$$

Ecuación 3

Los espectros de masas obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS a diferentes energías en la celda de colisiones activadas HCD (20, 30, 40 y 50 eV) durante el análisis de los extractos aislados de diferentes órganos o partes de *Crotalaria* spp., mostraron principalmente, los iones-fragmento para compuestos de tipo retronecina, *i.e.* en m/z 138,0913, 120,0808 y 94,0656, cuyas estructuras se muestran en la **Figura 21** (Avula, *et al.*, 2015; Avula, Sagi, Wang, Zweigenbaum, *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

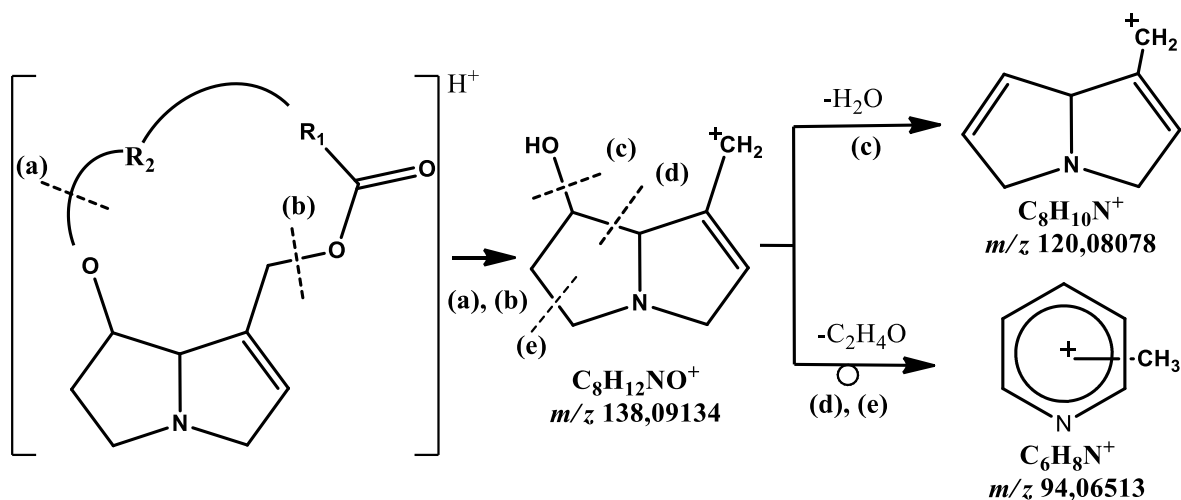


Figura 21. Esquema de iones-fragmento característicos de los PA, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-MS. Tomado con algunas modificaciones del artículo publicado por Zhang *et al.* (2017).

En la **Figura 22** se muestra el esquema de fragmentación propuesto en el espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS (HCD, 40 eV) de la monocrotalina.

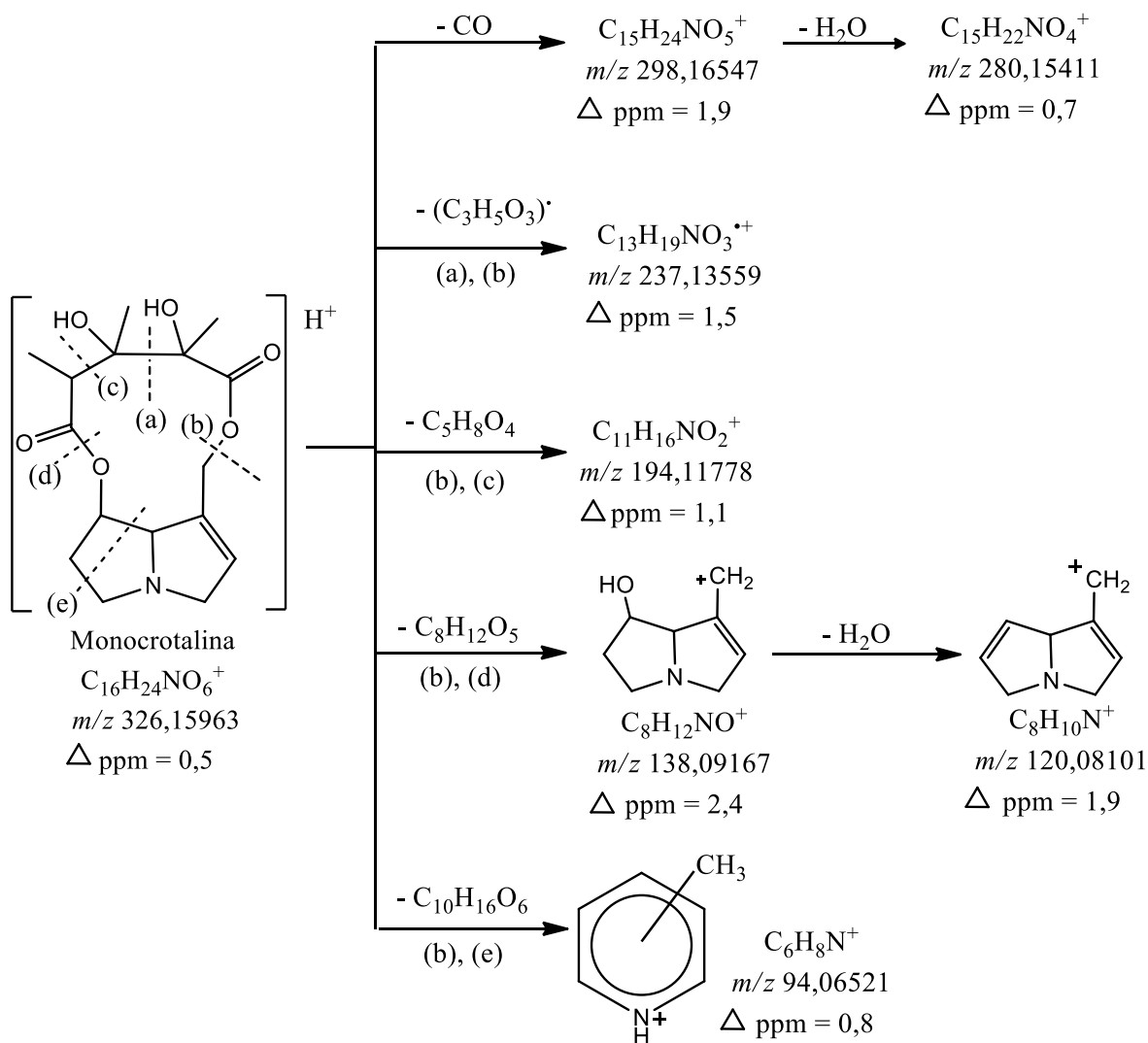


Figura 22. Esquema de fragmentación propuesto para la monocrotalina, según el espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS en modo *step scan* (HCD, 40 eV).

Para la identificación de los *N*-óxidos (PANO) se tuvieron en cuenta factores como: i) masas exactas con 15.99491 u.m.a, que corresponde a un oxígeno, mayores que los correspondientes PA encontrados por GC-MS, ii) el incremento en los picos cromatográficos

de los PA y disminución o casi desaparición de los picos correspondientes a los PANO después de la reducción con Zn/H^+ ; iii) la aparición de dímeros $(2M+H)^+$ en los espectros de masas de los PANO obtenidos en modo *full scan*; iv) la interpretación de sus espectros de masas obtenidos LC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS en modo *step scan* a diferentes valores de energía de la HCD.

Cuando un PANO se convierte a su respectivo PA, bajo la acción de Zn en medio ácido, en el cromatograma obtenido por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS en modo *full scan* el pico correspondiente al PANO desaparece dando origen al aumento de la señal del PA. En la **Figura 23**, se muestran los cromatogramas antes y después de someter al proceso de reducción a los PANO presentes en el extracto MSPD obtenido de hojas de *C. nitens*.

En la **Tabla 7**, se muestran los porcentajes de conversión de los PANO a PA, después de someter un extracto MSPD al proceso de reducción con Zn en medio ácido.

Tabla 7.

Porcentajes de conversión (%) de los PANO a los respectivos PA, después de someter los extractos MSPD al proceso de reducción con Zn/H^+ .

Nombre	Área (cuentas)		Porcentaje de reducción, (%)
	Antes de tratamiento	Después de tratamiento	
Monocrotalina	-	49437804	
Monocrotalina <i>N</i> -óxido	53823114	306347	99
Crispatina	291051	10856345	
Crispatina <i>N</i> -óxido	13578174	-	100
Integerrimina	338556	17185538	
Integerrimina <i>N</i> -óxido	17783649	127110	99

Se observó, que los tiempos de retención de los PANO fueron mayores que los de sus respectivos PA (Véase **Figura 23**). Además, en los espectros de los *N*-óxidos aparecen dímeros protonados $[2M+H]^+$, la abundancia relativa fue de 5 a 10%; estas señales están ausentes en los espectros de masas de los PA.

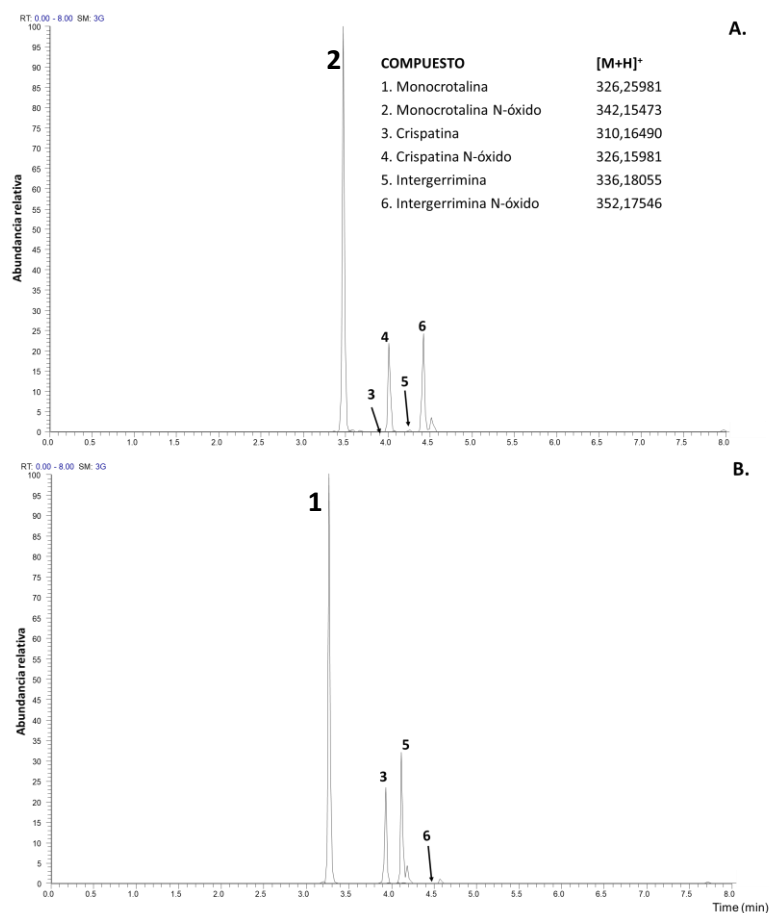


Figura 23. Fragmentograma de masas, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS en modo *full scan*, basado en las corrientes iónicas extraídas para los alcaloides protonados $[M+H]^+$: monocrotalina ($C_{16}H_{24}NO_6$, m/z 326,15981), monocrotalina *N*-óxido ($C_{16}H_{24}NO_7$, m/z 342,15473), crispatina ($C_{16}H_{24}NO_5$, m/z 310,16490), crispatina *N*-óxido ($C_{16}H_{24}NO_6$, m/z 326,15981), intergerrimina ($C_{18}H_{26}NO_5$, m/z 336,18055) e intergerrimina *N*-óxido ($C_{18}H_{26}NO_6$, m/z 352,17546) Presentes en los extractos MSPD de hojas de *C. nitens*. **A.** Extracto crudo, **B.** Extracto sometido al proceso de reducción de los PANO con Zn/H⁺.

En la **Figura 24**, se muestran los espectros de masas obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS de la monocrotalina y la intergerrimina, con sus correspondientes *N*-óxidos.

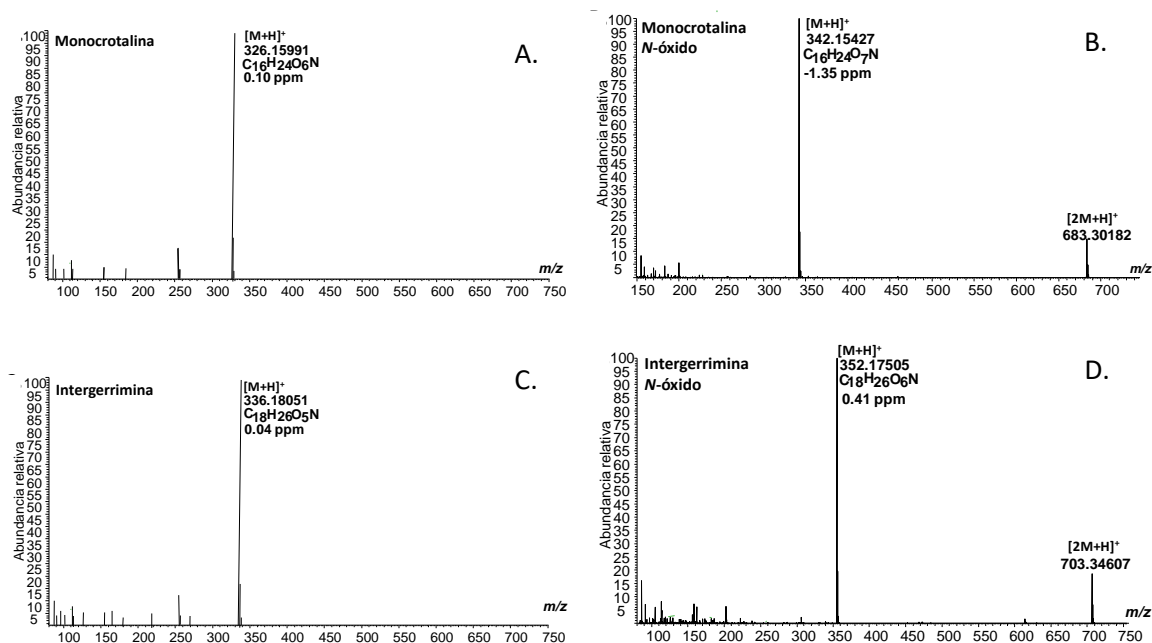


Figura 24. Espectros de masas de: **A.** Monocrotalina; **B.** Monocrotalina *N*-óxido; **C.** Intergerrimina; **D.** Intergerrimina *N*-óxido, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS operado en modo *full scan*.

En cuanto a los espectros de masas obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS en modo *step scan*, los *N*-óxidos de los PA de diésteres, incluidos los de la cadena abierta y macrocíclicos, exhiben los iones en m/z 118, 120, 136 o 138 (Bredenkamp, 1990). En la **Figura 25**, observan estos iones característicos en el espectro de masas de la usamina *N*-óxido obtenido por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV).

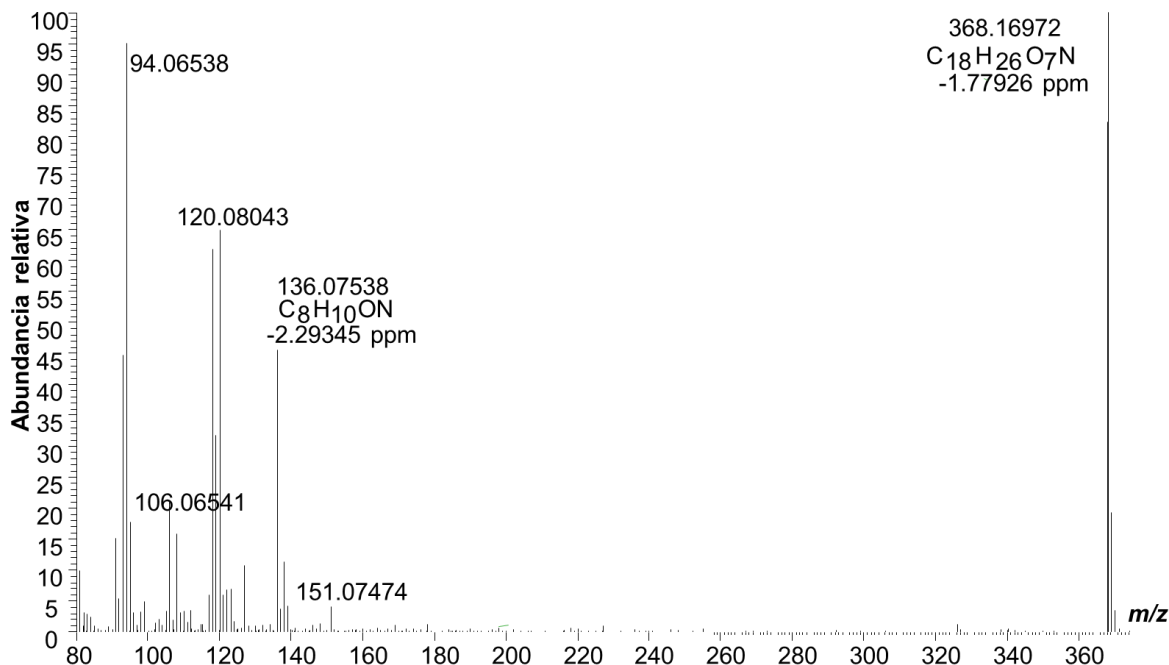


Figura 25. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la ursamina *N*-óxido, [M+H]⁺ C₁₈H₂₆NO₇, *m/z* 368.17038.

Ruan *et al.* (Ruan *et al.*, 2012), propuso que estos iones se generan a través de tres vías de fragmentación individuales (Véase **Figura 26**), a saber:

1. La escisión de dos grupos éster en las posiciones C₇ y C₉ para producir un ion fragmento en *m/z* 154, que se rompe adicionalmente para genera los iones en *m/z* 136 y 137, a través de la pérdida de H₂O y un radical OH[•], respectivamente.

2. La ruptura simultánea de dos grupos éster y una molécula de agua para generar el ion en *m/z* 136, seguido de una pérdida de otra molécula de H₂O, un radical OH[•], lo que produce fragmentos en *m/z* 118 y 119, respectivamente.

3. La pérdida del átomo de oxígeno unido al nitrógeno de la base de necina para formar la base libre correspondiente.

Se observa que los monoésteres poseen dos iones en m/z 136, y en m/z 138 y que los diésteres de tipo retronecina presentan los iones en m/z 118 y en m/z 120.

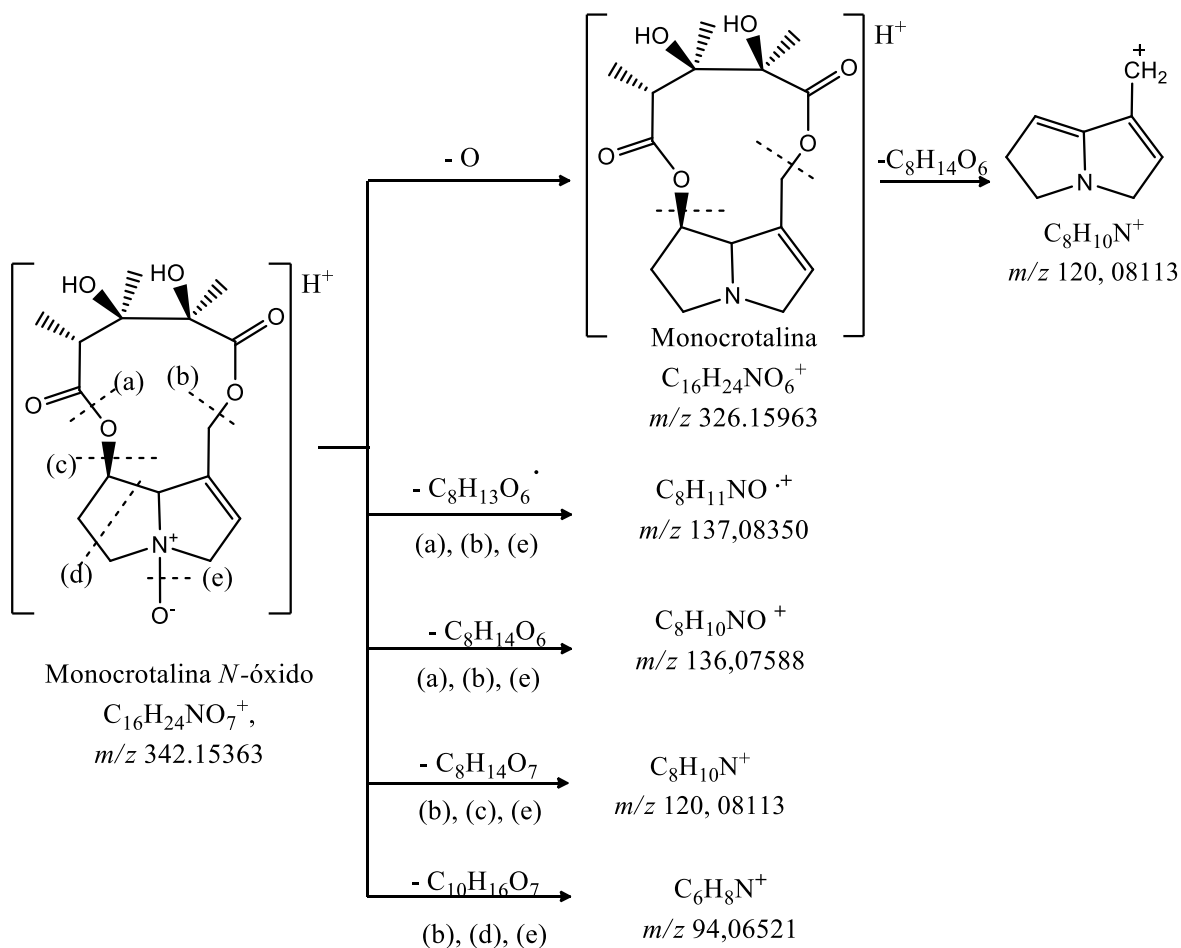


Figura 26. Ruta de fragmentación propuesta por Ruan *et al.* (Ruan *et al.*, 2012) para la monocrotalina *N*-óxido en el espectro obtenido por HPLC-MS/MS

En la **Tabla 8** aparecen 39 alcaloides pirrolizidínicos detectados en diferentes partes de las plantas de las seis especies de *Crotalaria* spp. colectadas en Santander. Nueve PA se detectaron por GC-MS. Sus correspondientes *N*-óxidos y 21 compuestos adicionales tipo retronecina se detectaron por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS. En los **Apéndices (8-44)** se presentan los espectros de masas experimentales de los diferentes compuestos encontrados.

En los experimentos realizados, las moléculas protonadas se activaron en la celda de colisiones activadas, HCD. El voltaje en esta celda se buscó de tal manera que los espectros de masas mostraran una fragmentación abundante, pero, sin perder por completo la señal de la molécula protonada.

Tabla 8.

Masa exactas y iones-fragmento de los PA y los PANO determinados por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS, operado en modo step scan, a diferentes voltajes HCD, presentes en los extractos aislados por MSPD de plantas de *Crotalaria* spp.

N° de Compuesto (Apéndice 5)	t _R , min	COMPUESTO	FÓRMULA	[M+H] ⁺		Δ ppm	HCD, eV	Iones característicos (I, %)
				Calculada	Experimental			
1	0,97	Retronecina ^b	C ₈ H ₁₃ NO ₂	156,10191	156,10192	0,05	30	156,10192(79), 138,09154 (12), 126,09138 (10), 112,07611 (49), 108,08101 (45), 96,08130 (26), 94,06532 (87), 93,05782 (42), 91,05510 (28), 86,06073 (46), 82,06521 (65), 80,04952 (100)
2	1,02	PA N.I. ^c	C ₇ H ₇ NO ₂	138,05496	138,05478	1,27	30	138,05478 (34), 110,06023 (96), 96,04475 (48), 94,06566 (100), 93,05786 (26), 92,04985 (27), 85,02904 (13)
3	1,04	PA N.I. ^c	C ₈ H ₁₅ NO ₂	158,11756	158,11729	1,70	50	158,11729 (100), 124,07600 (19), 108,08109 (79), 98,06068 (19), 94,06572 (11), 91,05504 (20), 84,08136 (18), 82,06538 (39)
4	1,2	Retronecina N-óxido ^a	C ₈ H ₁₃ NO ₃	172,09682	172,09701	1,10	30	172,09701 (100), 155,09413 (4), 138,09151 (2), 136,07588 (5), 111,06816 (47), 106,06567 (10), 94,06572 (25)
5	1,36	PANO N.I. ^c	C ₈ H ₁₅ NO ₃	174,11247	174,11272	1,41	40	174,11272 (78), 156,10194 (5), 140,10696 (1), 124,07579 (2), 108,08104 (4), 96,08134 (3), 83,07373 (100), 82,06596 (21)
6	1,37	PA N.I. ^c	C ₈ H ₁₅ NO	142,12264	142,1228	1,14	50	142,1228 (54), 124,11275 (8), 108,08113 (58), 96,08133 (19), 94,06599 (14), 91,05508 (10), 83,07399(16), 82,06587 (100)
7	3,30	Monocrotalina ^b	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	326,15981	326,15963	0,55	40	326,15963 (9), 280,15411 (5), 237,13559 (8), 194,11778 (17), 138,09167 (15), 120,08101 (100), 94,06521 (47)
8	3,30	PA N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₆ H ₂₅ NO ₇	340,17546	340,17500	1,35	30	340,17500 (100), 294,17003 (17), 252,15103 (12), 223,12062 (16), 208,13286 (53), 164,10748 (12), 138,09151 (13), 122,09560 (11), 121,08865 (52), 120,08070 (53), 102,09166 (67), 94,06543 (20)

Tabla 8.*Continuación.*

9	3,53	PA N.I. de tipo monocrotalina ^c	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17038	368,17062	0,65	30	368,17062 (100), 308,14740 (24), 280,15332 (66), 237,13593 (33), 194,11726 (21), 164,10721 (34), 138,09125 (17), 120,08055 (89), 94,06544 (12)
10	3,55	Monocrotalina N-óxido ^a	C ₁₆ H ₂₃ NO ₇	342,15473	342,15363	1,10	40	342,15363 (100), 236,12886 (17), 157,08591 (11), 138,0987 (10), 137,08350 (56), 136,07588 (30), 120,08113 (35), 119,07336 (40), 108,08086 (15), 94,06440 (24)
11	3,57	PANO N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17062	368,17024	0,38	50	368,17024 (64), 164,10713 (7), 138,0987 (11), 136,07549 (39), 120,08151 (68), 118,06541 (61), 106,06548 (21), 94,06543 (100)
12	3,61	PANO N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	352,17522	0,70	50	352,1722 (7), 156,10243 (11), 138,0987 (38), 120,08107 (86), 118,06534 (23), 105,0750 (30), 94,06584 (100)
13	3,76	Retusina ^a	C ₁₆ H ₂₅ NO ₅	312,18055	312,17999	0,55	50	312,17999 (6), 284,18523 (11), 266,17519 (5), 226,14319 (9), 158,11777 (81), 140,10689 (81), 122,09683 (100), 120,0809 (9), 110,09656 (11), 96,08104 (45), 94,0657 (18), 82,06583 (27)
14	3,79	PA N.I. de tipo monocrotalina ^c	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17038	368,17062	0,67	30	368,17062 (100), 308,14740 (24), 280,15332 (66), 237,13593 (33), 194,11726 (21), 164,10721 (34), 138,09125 (17), 122,09650 (14), 121,08850 (83), 120,08055 (89), 119,07343 (83), 94,06544 (12)
15	3,80	PA N.I. de tipo crispatina ^c	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	310,16490	310,16493	0,03	30	310,16493 (15), 280,15485 (7), 237,13580 (3), 194,11758 (2), 164,10875 (3), 138,09114 (28), 120,08127 (93), 94,06577 (100)
16	3,86	Usaramina ^a	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	352,17706	1,60	50	352,17706 (12), 220,13454 (8), 138,09166 (45), 136,07608 (50), 120,08154 (97), 118,06541 (25), 108,08153 (27), 96,08154 (44), 94,06575 (100)
17	3,92	PA N.I. de tipo usaramina ^c	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	352,17562	0,45	50	352,17562 (12), 220,13431 (7), 138,09137 (35), 136,07588 (15), 120,08147 (80), 118,06512 (35), 108,08159 (23), 94,06592 (100), 92,05269 (24)

Tabla 8.*Continuación.*

18	3,92	PANO N.I. ^c	C ₁₈ H ₂₅ NO ₈	384,16529	384,16463	1,73	30	384,16463 (100), 296,15039 (14), 236,12782 (16), 138,09137 (10), 137,08374 (31), 136,07562 (70) 120,08080 (12), 119,07343 (15), 118,06541 (87)
19	3,93	7-Angeloilretronecina ^a	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	238,14377	238,14353	1,00	30	238,14353 (23), 201,05518 (7), 156,10188 (39), 138,09158 (83), 120,08099 (86), 108,08118 (59), 102,09152 (45), 94,06557 (76), 91,05463 (53), 83,04956 (100)
20	3,94	Usaramina N-óxido ^a	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17038	368,16972	1,78	50	368,16972 (100), 138,09109 (11), 136,07538 (45), 120,08043 (64), 118,06534 (61), 94,06538 (95)
21	3,95	7-Angeloilretronecina N-óxido ^a	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄	254,13868	254,13837	1,25	30	254,13837 (13), 154,08589 (8), 136,07591 (35), 124,07602 (19), 120,08128 (12), 111,06523 (35), 106,06523 (100), 94,06566 (40), 83,04950 (36)
22	3,97	Crispatina ^a	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	310,16490	310,16528	1,23	50	310,16528 (10), 282,16882 (5), 156,10245 (24), 138,09129 (25), 94,06586 (100)
23	3,97	Retusina N-óxido ^a	C ₁₆ H ₂₅ NO ₆	328,17546	328,17435	1,11	50	328,17435 (58), 154,08658 (39), 140,10680 (54), 138,09160 (34), 122,0963 (96), 120,08102 (100), 108,08121 (14), 96,08092 (23)
24	4,00	Crispatina N-óxido ^a	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	326,15981	326,15984	0,06	50	326,15984 (100), 136,07610 (50), 120,08118 (68), 118,06548 (50), 94,06570 (74), 93,05789 (39)
25	4,01	9-Tigloilretronecina ^a	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	238,14377	238,14296	0,81	30	238,14296 (1), 215,07030 (1), 156,10196 (2), 138,091604 (17), 120,08105 (28), 108,08133 (21) 94,06560 (100), 83,04956 (2)
26	4,07	PA N.I. ^c	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	310,16490	310,16493	0,03	30	310,16493 (100), 266,13809 (62), 138,09163 (27), 120,08086 (50), 94,06566 (27)
27	4,09	9-Angeloilretronecina ^a	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	238,14377	238,14276	1,00	30	238,14276 (5), 138,09158 (4), 120,08105 (14), 94,06558 (100), 83,04956 (5)
28	4,14	PA N.I. ^c	C ₁₈ H ₂₇ NO ₇	370,18063	370,18645	0,42	50	370,18645 (20), 172,09766 (23), 138,09192 (39), 118,06560 (8), 111,06827 (20), 94,06580 (100)
29	4,16	PA N.I. de tipo platinecina ^c	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	240,15942	240,15921	0,87	30	240,15921 (11), 158,11836 (27), 140,10689 (55), 122,09633 (100), 120,08064 (10), 96,08128 (31), 94,06596 (18), 86,09708 (32), 83,04961 (72)

Tabla 8.*Continuación.*

30	4,23	9-Tigloilretronecina <i>N</i> -óxido ^a	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄	254,13868	254,13863	0,23	50	254,13863 (69), 154,08592 (23), 138,0911 (12), 136,07613 (2), 126,09134 (13), 108,08136 (17), 94,06572 (62), 93,05791 (100), 83,04968 (13)
31	4,24	PANO N.I. ^c	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	326,15981	326,16037	0,55	30	326,16037 (77), 271,05931 (8), 154,08600 (10), 138,09111 (100), 136,0754 (35), 118,06554 (13), 94,06573 (46), 93,05792 (36)
32	4,27	9-Angelylretronecina <i>N</i> -óxido ^a	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄	254,13868	254,13812	0,56	50	254,13812 (88), 154,08661 (28), 138,09087 (20), 136,07594 (32), 126,09117 (15), 108,08124 (15), 94,06563 (82), 93,05782 (100), 83,04961 (14)
33	4,27	Integerrimina ^a	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	336,18055	336,18173	1,18	40	336,18173 (35), 308,18610 (23), 138,09164 (65), 120,08121 (100), 118,06554 (14) 94,06549 (71)
34	4,48	Integerrimina <i>N</i> -óxido ^a	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	352,17505	0,41	50	352,17505 (49), 138,09086 (9), 136,07608 (47), 120,0801 (68), 118,0653 (64), 106,06538 (21), 94,06580 (100)
35	4,40	PANO N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄	256,15433	256,15508	1,89	50	256,15508 (25), 156,10240 (9), 138,09203 (5), 120,08139 (7), 113,08400 (31), 96,08156 (18), 95,07344 (28), 94,06572 (19), 82,06507 (100)
36	4,48	PA N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₈ H ₂₇ NO ₆	354,19111	345,19186	1,94	30	354,19186 (4), 154,08565 (29), 136,07570 (31), 120,08069 (4), 94,06544 (100)
37	4,58	PA N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₈ H ₂₇ NO ₅	338,1962	338,19589	0,91	30	338,19389 (6), 138,09123 (34), 120,08054 (38), 94,06543 (100)
38	4,73	PA N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₈ H ₂₇ NO ₆	354,19111	354,19186	0,75	50	354,19186 (30), 138,09114 (29), 136,07622 (31), 108,08142 (8), 94,06578 (100)
39	4,88	PA N.I. de tipo retronecina ^c	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	352,17422	1,24	50	352,17422 (4), 292,15431 (26), 138,09126 (41), 120,08139 (66), 108,08099 (20), 94,06543 (100)

^a Identificación tentativa, según espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS, por comparación con el patrón de fragmentación observado en espectros EI, (70 eV), GC-MS y fórmulas moleculares a partir de masas exactas.

^b Identificación confirmatoria, basada en el uso de sustancias certificadas.

^c Determinación basada en los picos característicos para alcaloides pirrolizidínicos en sus espectros de masas, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-MS.

N.I. – Compuesto no identificado.

4.6 Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en raíces, hojas, flores y semillas de *Crotalaria* spp.

La cuantificación de los PA y los PANO presentes en los extractos MSPD de raíces, hojas, flores y semillas de *Crotalaria* spp., se realizó por el método de estándar externo y se reportó como equivalentes de monocrotalina. Se construyó una curva de calibración con el patrón certificado de monocrotalina (**Figura 27**). El rango de concentraciones fue de 11–550 ng/mL, bajo las condiciones descritas en la **Sección 3.7**. El límite de detección (LOD) se determinó con diluciones sucesivas del estándar y fue de 0,4 ng/mL a una relación señal ruido (S/N) de 4 y el límite de cuantificación (LOQ) fue de 1,2 ng/mL a una S/N de 10. La cuantificación de los *N*-óxidos se hizo sumando el área cromatográfica tanto del PANO, como de su dímero.

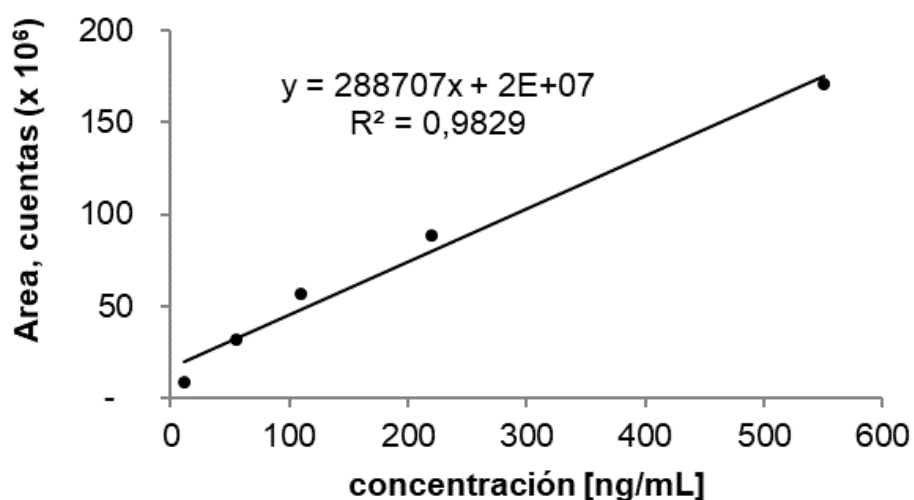


Figura 27. Curva de calibración de la monocrotalina ($C_{16}H_{23}NO_6$, $[M+H]^+$: m/z 326,15981) obtenida por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS, operado en modo *full scan*.

Los resultados de la cuantificación de los PA y los PANO totales se muestran en la **Figura 28**. La determinación de los PA y sus PANO en los diferentes partes de las seis

especies de *Crotalaria* spp. mostró, que la concentración más alta de los PA se encuentra en las semillas. Los siguientes fueron los rangos de contenido de PA en semillas: para *C. nitens*, 4–11 mg/g; *C. retusa*, 9–23 mg/g; *C. pallida*, 0,7–6 mg/g; *C. incana*, 23–44 mg/g; *C. maypurensis*, 0,9–41 mg/g y *C. spectabilis*, 4–20 mg/g, respectivamente. En las demás partes de la planta, los alcaloides se encuentran principalmente en forma de PANO. Las plantas acumulan los PA, fundamentalmente en sus semillas para protegerse de los herbívoros y así asegurar su descendencia (Martins, Cunha, Solferini, & Trigo, 2015). Toppel, Witte, & Hartmann (1988), determinaron que los alcaloides pirrolizidínicos en las semillas de *Scasellatii* se encuentran exclusivamente como base libre, sin embargo, se oxidan rápidamente durante los primeros días de germinación, es cuando, sólo se pueden detectar los PANO en la radícula y el brote emergente de la plántula, así como en las diferentes partes maduras. Este hecho se debe a que la base libre es más lipofílica, lo cual es más adecuado para su almacenamiento en la semilla seca, mientras que los PANO, más polares, lo que facilita su transporte y el almacenamiento en diferentes órganos de la planta diferentes al fruto.

Las especies *C. incana*, *C. maypurensis* y *C. pallida* tienen los PA y los PANO en concentración baja en comparación con otras especies (no superaron los 2 mg de alcaloides pirrolizidínicos/g de semilla), lo que explica que sean propuestas en algunos trabajos, como alimento para ganado (Bernal, 1986; McKee & Enlow, 1931). A pesar de esto, las especies de *Crotalaria* siguen siendo consideradas como tóxicas y su suministro diario a los bovinos puede causar envenenamiento por el efecto de bioacumulación y formación de pirroles tóxicos.

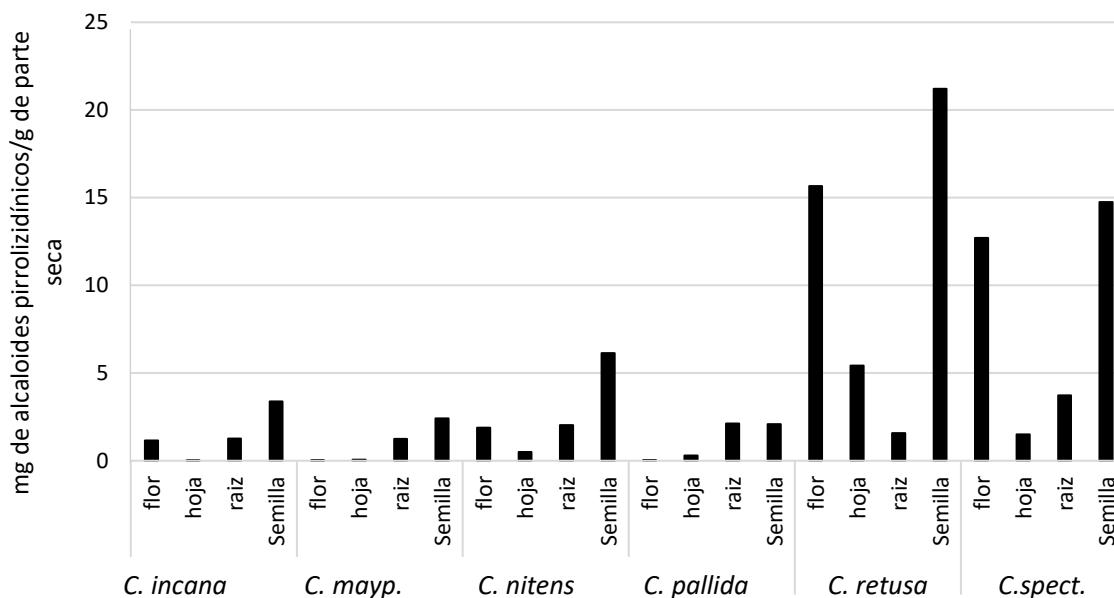


Figura 28. Contenido total de alcaloides pirrolizidínicos y sus *N*-óxidos, en equivalentes de monocrotalina, en las diferentes partes de las seis especies de *Crotalaria* spp. estudiadas.

Los resultados de la cuantificación de los PA y PANO, por tipo de alcaloide, por tejido y según la especie, se encuentran en el

Apéndice 6, y se discutirán brevemente a continuación:

La mayor variedad de estructuras de PANO y PA en las especies estudiadas, se encontró en las raíces, ya que el proceso de biosíntesis de los PA se realiza por células especializadas principalmente en esta zona según Borstel & Hartmann, (1986), Los experimentos de marcaje con ^{14}C hechos por Hartmann *et al.* (1989), para plantas del género *Senecio*, demostraron que los *N*-óxidos de PA migran desde las raíces a través del floema y se canalizan en las vacuolas, ya que son las principales reservas de almacenamiento de alimento y productos tóxicos en los vegetales. Según Dah-nouvlessounon *et al.* (2015), la alta variabilidad en las concentraciones de metabolitos secundarios, en este caso, de PA y PANO,

dentro de los órganos, los tejidos y las células de una planta responde a los efectos ambientales.

C. retusa fue la especie que presentó mayor concentración de PA en sus semillas, principalmente monocrotalina. En el 2003 se presentó una intoxicación masiva de aves de corral en Santander por la contaminación accidental de sorgo con semillas de *C. retusa* (Stashenko, 2011; Álvarez, 2004) . La especie *C. maypurensis* presentó menor contenido de PA y PANO, aun así, se considera peligrosa (Diaz, 2006).

C. incana contiene intergerrimina, retronecina y usaramina y sus respectivos PANO, la intergerrimina representa hasta el 50% de los alcaloides totales, que se encuentran en la planta; el 50% restante corresponden a los PA y los PANO no identificados localizados principalmente en semillas y hojas. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Asres, Sporer, & Wink, (2004), quien encontró que en *C. incana*, la mayor concentración de intergerrimina y usaramina estaba en las semillas, en menor proporción, en hojas, raíces y tallos. Flores *et al.* (2009), encontraron en las semillas de *C. incana* intergerrimina y usaramina en alta concentración, además, 9-senecioilretronecina y un alcaloide no identificado de tipo incaina, que no se detectó en el presente estudio.

C. maypurensis posee principalmente un alcaloide no identificado de fórmula $C_8H_{15}NO$, posiblemente, sea retronecanol, un PA reportado por Adams & Rogers (1939). Además, *C. maypurensis* posee usaramina e intergerrimina en sus semillas, y sus *N*-óxidos en las demás partes. Una diferencia notoria de esta especie es que presenta en sus raíces 9-angeloilretronecina *N*-óxido, en mayor proporción. Flores *et al.* (2009), encontraron los mismos compuestos y señalan la presencia de un alcaloide de tipo 9-senecioilretronecina, isómero estructural de la 9-angeloilretronecina.

El perfil cromatográfico de extractos MSPD de diferentes partes de *C. nitens* revela la presencia mayoritariamente, de monocrotalina, crispatina e intergerrimina. De las seis especies, *C. nitens* presentó la mayor variedad de estructuras correspondientes a PA y PANO en sus raíces, incluyendo los diésteres de tipo 7- y 9-angeloilretronecinas. En la **Figura 29**, se muestran los perfiles cromatográficos de PA y PANO, presentes en los diferentes tejidos de *C. nitens* aislados por MSPD y analizados por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS, operado en modo *full scan*. En la actualidad, no existen trabajos que reporten el contenido de PA y PANO en esta especie.

C. pallida contiene unsaramina como el PA mayoritario. *C. retusa* y *C. spectabilis* poseen monocrotalina en mayor proporción, básicamente en sus semillas. La concentración de la monocrotalina *N*-óxido en las flores de *C. retusa* y *C. pallida* alcanza los 21 y 16 mg/g, respectivamente. Otro hecho interesante, es que en las semillas de *C. retusa* se encuentra una cantidad considerable de *N*-óxidos; caso que no ocurre en las demás especies que solo presentan alcaloides en su forma libre. En *C. retusa* la concentración de PA y PANO puede llegar hasta los 22 mg de alcaloides/g en tejido seco, por ende, es una especie altamente tóxica, que si se consume, puede causar intoxicación ampliamente documentadas (Wiedenfeld, 2011). Fletcher *et al.* (2009), determinaron la concentración de los PA en las semillas de *C. retusa* cultivada, en Australia y alcanzó 33 mg de alcaloides /g de tejido seco. Esto convierte a *C. retusa* en la segunda especie de *Crotalaria* más peligrosa, después de *C. ramosissima*, en la cual la concentración de los PA puede llegar hasta los 77 mg/g de tejido seco (Fletcher *et al.*, 2009).

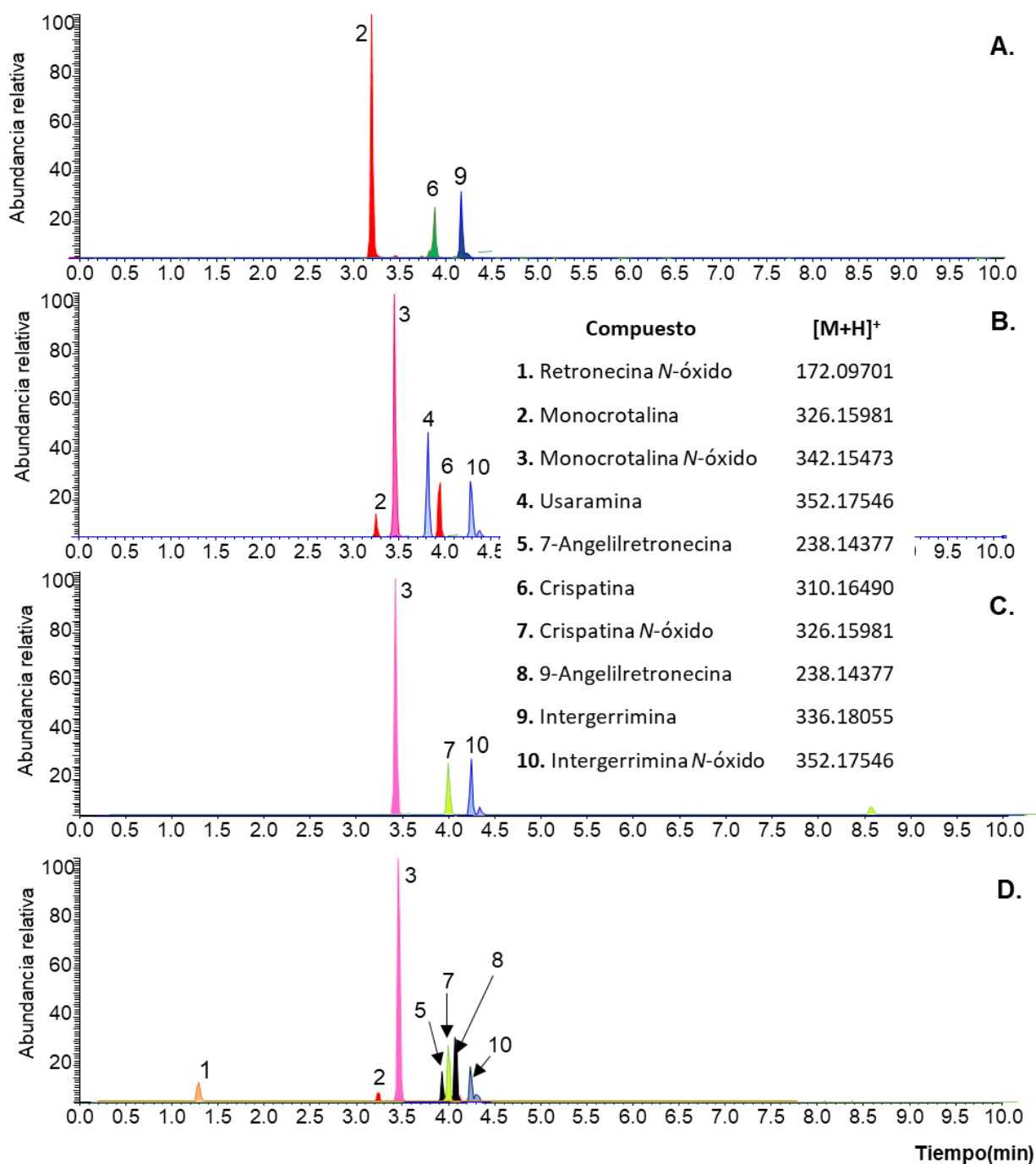


Figura 29. Cromatogramas basados en las corrientes iónicas extraídas $[M+H]^+$, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS de los extractos MSPD aislados de las diferentes partes de: *C. nitens*. **A.** Semillas; **B.** Flores; **C.** Hojas y **D.** Raíces.

Se detectaron los PA de tipo 7-tigloilretronecina y 9-tigloilretronecina, pero su concentración fue menor de 1 µg de alcaloide pirrolizidínico/g de material seco, por lo que no se incluyeron en las tablas (Véase **Apéndice 5**).

La alta variación en las concentraciones de PA y PANO en tejidos de plantas de la misma especie, se puede deber a que el contenido de diferentes metabolitos secundarios está influenciado por el genotipo de la planta (la especie y la variedad), las características ambientales (la radiación solar y la disponibilidad de agua, entre muchas otras), la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. Así mismo, la aparición de los compuestos secundarios está relacionada con los mecanismos de defensa de la planta (Harborne, 2014).

El presente trabajo mostró que las especies de género *Crotalaria* que crecen en los alrededores de Bucaramanga, poseen concentraciones altas de alcaloides pirrolizidínicos. Por lo tanto, existe riesgo de que algunos productos de consumo agrícola o humano se puedan contaminar con alcaloides pirrolizidínicos, con consecuencias para la salud de la población o pérdidas económicas a la agroindustria.

5 Recomendaciones

Cuantificar los PA y PANOS en otras matrices que puedan estar contaminadas por las especies de *Crotalaria* mencionadas en el trabajo, como mieles, lácteos, carnes, huevos, entre otros.

Aislar los alcaloides pirrolizidínicos no identificados en las diferentes especies de *Crotalaria* y utilizar otros métodos analíticos (RMN, Rayos X) para elucidar sus estructuras moleculares.

6. Conclusiones

Se encontraron condiciones eficientes de extracción por la técnica MSPD de los PA en diferentes órganos de *Crotalaria* spp., usando sílice C-18 como soporte sólido y metanol con ácido fórmico al 2% y una relación muestra:soporte sólido de 1:4.

Se identificaron 39 compuestos correspondientes a los PA y los PANO, usando UHPLC-ESI-Orbitrap-MS operado en modo positivo en los extractos MSPD de diferentes partes de *Crotalaria* spp. Los siguientes fueron los compuestos mayoritarios a saber: monocrotalina, intergerrimina, usaramina y crispatina, con sus correspondientes *N*-óxidos.

Las semillas presentaron el contenido más alto de alcaloides pirrolizidínicos en las especies de *Crotalaria* evaluadas, en comparación con las demás partes de la planta. Hasta 20 veces más alta, que, en las raíces, 44 veces más que en las hojas y 13 veces superior a las de las flores.

Los siguientes fueron los rangos de concentraciones de los PA y los PANO totales en las semillas, a saber: para *C. nitens*: 4–11 mg/g; *C. retusa*: 9–23 mg/g; *C. pallida*: 0,7–6 mg/g; *C. incana*: 23–44 mg/g; *C. maypurensis*: 0,9–41 mg/g y *C. spectabilis*: 4–20 mg/g, respectivamente.

Referencias Bibliográficas

- Adams, R., & Rogers, E. F. (1939). The Structure of Monocrotaline, the Alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*. *Journal of the American Chemical Society*, *61*(10), 2815–2819.
- Agilent Technologies Inc. (2011). *Agilent 6100 Series Quadrupole LC/MS Systems Concepts Guide*. Agilent Technologies (Vol. Revision A). Santa Clara, CA, USA. p 126.
- Alvarez, A. T. (2004). *Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloidales en plantas del género Crotalaria y alimento contaminado para aves* (tesis de maestría). Univerisad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- ANZFA. (2001). *Pyrrrolizidine alkaloids in food a Toxicological Review and Risk Assessment*. New Zealand Food Autorithy. The Terrace, Wellington, NEz Zeland. 6p.
- Arpino, P. (1992). Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part III. Applications of thermospray. *Mass Spectrometry Reviews*, *11*(1), 3–40.
- Asres, K., Sporer, F., & Wink, M. (2004). Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, *32*(10), 915–930.
- Atlântica, M., Martinelli, G., Vieira, C. M., Gonzalez, M., Leitman, P., Ferreira, A., & Ferreira, A. (2015). Phytogeographical patterns (Leguminosae-Papilionoideae) of, *59*(1), 477–486.
- Avula, B., Sagi, S., Wang, Y.-H., Wang, M., Khan, I. A., & Zweigenbaum, J. (2015). Pyrrolizidine Alkaloids: Characterization in Botanical and Dietary Supplements using Accurate-Mass Q-TOF LC/MS and All Ions MS/MS. *Application Note*. Wilmington,

Delaware, USA. p 10.

- Avula, B., Sagi, S., Wang, Y. H., Zweigenbaum, J., Wang, M., & Khan, I. A. (2015). Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, *178*, 136–148.
- Barker, A., Long, R., Short, R., & Rouge, B. (1989). Isolation of drugs residues from tissue by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography*, *475*, 353–361.
- Barker, S. a. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *70*(2), 151–62.
- Bernal, H. Y. (1986). *Flora de Colombia (Crotalaria en colombia)*. (P. Pinto, Ed.) (4th ed., Vol. 4). Santa Fé de Bogotá Colombia: Museo de Historia Natural Universidad Nacional.
- Bernal, R., Grandstein, R. S., & Celis, M. (2016). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia, volumen I. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia volumen I, Capítulos introductorios - líquenes a Lythraceae*. Recuperado de: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Bisby, F., & Polhill, R. (1973). The role of taximetrics in angiosperm taxonomy II. Parallel taximetric and orthodox studies in *Crotalaria* L. *New Phytologist*, *72*(3), 727–742.
- Boppré, M. (1990). Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids Exemplification of complexity in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, *16*(1), 165–185.
- Bredenkamp, M. W. (1990). The mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids. *Naturally Occurring Pyrrolizidine Alkaloids*. CRC Press, Boca Raton, FL. Google Scholar, p 147–

167.

Brown, K. S., & Trigo, J. R. (1995). Chapter 4 The Ecological Activity of Alkaloids.

Alkaloids: Chemistry and Pharmacology, 47(C), 227–354.

Brunner, B., Martínez, S., & Flores, L. (2009). *Crotalaria*. Recuperado de

<http://proorganico.info/crotalaria.pdf>

Bull, L. B. (1955). The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids.

Australian Veterinary Journal, 31(2), 33–40.

Cheeke, P. R. (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Animal*

Science. 66(1), 2343-2350.

Coulombe, R. A. (2003). Pyrrolizidine Alkaloids in foods. *Advances in Food and Nutrition*

Research, 45, 62–99.

Crews, C., Berthiller, F., & Krska, R. (2010). Update on analytical methods for toxic

pyrrolizidine alkaloids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 327–38.

Culvenor, C. C. J. (1978). Pyrrolizidine alkaloids - occurrence and systematic importance in

angiosperms. *Botaniska Notiser*, 131, 473–486.

Dah-nouvlessounon, D., Adjanohoun, A., Sina, H., Noumavo, P. A., Diarrasouba, N.,

Parkouda, C., ... Dicko, M. H. (2015). Nutritional and Anti-Nutrient Composition of

Three Kola Nuts (*Cola nitida* , *Cola acuminata* and *Garcinia kola*) Produced in Benin.

Food Nutritional Science. 6, 1395-1407.

Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition*.

John Willey & Sons, University of Nottingham, Nottingham, UK. p 487.

- Diaz, G. J. (2006). Toxic Plants of Veterinary and Agricultural Interest in Colombia. *International Journal of Poisonous Plant Research*, 1(ISSN 2154-3216), 1–19.
- Diaz, G. J., Almeida, L. X., & Gardner, D. R. (2014). Effects of dietary *Crotalaria pallida* seeds on the health and performance of laying hens and evaluation of residues in eggs. *Research in Veterinary Science*, 97(2), 297–303.
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 2011, 9(11), 2406; 1-134.
- Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., & Kraj, A. (2008). *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*. Vol 20, John Wiley & Sons. New Jersey. USA. p387.
- Fletcher, M. T., McKenzie, R. A., Blaney, B. J., & Reichmann, K. G. (2009). Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* taxa from Northern Australia: Risk to grazing livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 311–319.
- Flores, A. S., Tozzi, A. M. G. D. A., & Trigo, J. R. (2009). Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 459–469.
- García, H. (1974). *Flora medicinal de Colombia: botánica médica* Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá, Colombia. Vol 3, p 345.
- Germani, G., & Plenchette, C. (2005). Potential of *Crotalaria* species as green manure crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 266(1–2), 333–342.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use.

Plant Physiology, 131(March), 872–877.

Grases, P. J., & Simon Beker, G. (1972). Venous-occlusive disease of the liver. A case from Venezuela. *The American Journal of Medicine*, 53(4), 511–516.

Griffin, C. T., Sheehan, A., Danaher, M., & Furey, A. (2017). *Pyrrolizidine Alkaloids in Food: Analytical, Toxicological and Health Considerations. Analysis of Food Toxins and Toxicants*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. UK. 267-318.

Harborne, J. B. (2014). *Introduction to ecological biochemistry*. Academic press. University of Reading, UK, 4th Ed. p 316.

Hartmann, T. (1999). Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*. 207, 483-495.

Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U., von Borstel, K., & Theuring, C. (1989). Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 177(1), 98–107.

Hartmann, T., Theuring, C., & Bernays, E. A. (2003). Are insect-synthesized retronecine esters (creatonotines) the precursors of the male courtship pheromone in the arctiid moth *Estigmene acrea*? *Journal of Chemical Ecology*, 29(11), 2603–2608.

Hartmann, T., & Witte, L. (1995). Chemistry, biology and chemocology of the pyrrolizidine alkaloids. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, 9, 155–233.

Hoffmann, E. De, & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications*. John Wiley & Sons. Chichester. UK. p 489.

Hooper, P. T., & Scanlan, W. A. (1977). *Crotalaria retusa* poisoning of pigs and poultry. *Australian Veterinary Journal*, 53(3), 109–114.

- Kim, H. Y., Stermitz, F. R., & Coulombe, R. A. (1995). Pyrrolizidine alkaloid-induced DNA-protein cross-links. *Carcinogenesis*, *16*(11), 2691–2697.
- Knight, A. P., Kimberling, C. V, Stermitz, F. R., & Roby, M. R. (1984). *Cynoglossum officinale* (hound's-tongue) a cause of pyrrolizidine alkaloid poisoning in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 185, 647–650.
- Linstrom, P. J., & Mallard, W. G. (2014). NIST Chemistry webBook, *NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology*.
- Lloret, L., y Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *47*(1–2), 43–60.
- Martins, C. H. Z., Cunha, B. P., Solferini, V. N., & Trigo, J. R. (2015). Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a specialist herbivore. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–27.
- Mattocks, A. R., Rebekah, J., & Janet, B. (1989). Simple procedures for preparing putative toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Toxicon*, *27*(5), 561–567.
- McKee, R., & Enlow, C. R. (1931). *Crotalaria*, a new legume for the south. USA Department of Agriculture. Inform N° 137. p 31.
- Mohabbat, O., Shafiq Younos, M., Merzad, A. A., Srivastava, R. N., Ghaos Sediq, G., & Aram, G. N. (1976). An Outbreak of Hepatic Venous-Occlusive Disease in North-Western Afghanistan. *The Lancet*, *308*(7980), 269–271.
- Molyneux, R. J., Gardner, D. L., Colegate, S. M., & Edgar, J. A. (2011). Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? *Food Additives & Contaminants: Part A*, *28*(3), 293–307.

- Neuner-Jehle, N., Nesvadba, H., & Spiteller, G. (1965). Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt.: Pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. *Monatshefte Für Chemie*, 96(2), 321–338.
- Niessen, W. M. (3th Ed.) (2006). *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*. CRC Press. Boca Raton. FL. USA. p 600.
- Ober, D., & Kaltenegger, E. (2009). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. Elsevier Ltd. 70,1687-1695.
- Palomino, G., & Vázquez, R. (1991). Cytogenetic Studies in Mexican Populations of Species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae). *Cytologia*, 56(3), 343–351.
- Polhill, R. M. (1968). Miscellaneous Notes on African Species of *Crotalaria* L.: II. *Kew Bulletin*, 22(2), 169–348.
- Polhill, R. M. (1982). *Crotalaria in Africa and Madagascar*. CRC Press. Rotterdam. Países Bajos. p 383.
- Rangel-ch, J. O. (2005). La biodiversidad de Colombia. *Palimpsestos*, 5, 292–304.
- Rasenack, R., Müller, C., Kleinschmidt, M., Rasenack, J., & Wiedenfeld, H. (2003). Venooclusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 18(4), 223–225. <http://doi.org/10.1159/000070799>
- Rashkes, Y. V., Abdullaev, U. A., & Yunusov, S. Y. (1974). Mass spectra and stereochemistry of some macrocyclic pyrrolizidine alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds*, 10(1), 34–37.
- Ridker, P. M., Ohkuma, S., McDermott, W. V, Trey, C., & Huxtable, R. J. (1985). Hepatic

venocclusive disease associated with the consumption of pyrrolizidine-containing dietary supplements. *Gastroenterology*, 88(4), 1050–1054. <http://doi.org/S0016508585001287> [pii]

Roeder, E. (1995). Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, 50, 83-98.

Ruan, J., Li, N., Xia, Q., Fu, P. P., Peng, S., Ye, Y., & Lin, G. (2012). Characteristic ion clusters as determinants for the identification of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in pyrrolizidine alkaloid-containing natural products using HPLC-MS analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(3), 331–337.

Samba, R. T., Sylla, S. N., Neyra, M., Gueye, M., Dreyfus, B., Ndoye, I., ... Isra, I. R. D. (2002). Biological nitrogen fixation in *Crotalaria* species estimated using the ¹⁵N isotope dilution method. *African Journal of Biotechnology*, 1(November), 17–22.

Schoental, R. (1968). Toxicology and carcinogenic action of pyrrolizidine alkaloids. *Cancer Research*, 28(11), 2237–2246.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Couch, S. R. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. Thomson Learning, Inc. Belmont, Massachusetts, USA. p. 731.

Stashenko, E. E. (2011). Productos sin químicos y algunas hazañas e historias de los químicos. *Innovación y Ciencia*, 18, 42–58.

Stashenko, E. E., y Martínez, J. R. (2009). ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica. *Scientia Chromatographica*, 1(2), 23–33.

Stegelmeier, B. L., Edgar, J. A., Colegate, S. M., Gardner, D. R., Schoch, T. K., Coulombe, R. A., & Molyneux, R. J. (1999). Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity.

Journal of Natural Toxins, 8(1), 95–116.

Stelljes, M. E., Kelley, R. B., Molyneux, R. J., & Seiber, J. N. (1991). GC-MS determination of pyrrolizidine alkaloids in four *Senecio* species. *Journal of Natural Products*, 54(3), 759–773.

Studies, R. A., & Evaluation, C. H. (2017). *Centre for Food Safety. Centre for Food Safety Food*. Hong Kong.

Tandon, B. ., Tandon, H. ., Tandon, R. ., Narndranathan, M., & Joshi, Y. . (1976). An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. *The Lancet*, 308(7980),

Tandon, H. D., Tandon, B. N., Tandon, R., Nayak, N. C., & others. (1977). A pathological study of the liver in an epidemic outbreak of veno-occlusive disease. *Indian Journal of Medical Research*, 65(5), 679–684.

Toppel, G., Witte, L., & Hartmann, T. (1988). N-oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. *Phytochemistry*, 27(12), 3757–

Von-Borstel, K., & Hartmann, T. (1986). Selective uptake of pyrrolizidine N-oxides by cell suspension cultures from pyrrolizidine alkaloid producing plants. *Plant Cell Reports*, 5(1), 39–42.

Wiedenfeld, H. (2011). Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Additives and Contaminants*, 28(3), 282–292.

Wiedenfeld, H., & Edgar, J. (2010). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochemistry Reviews*, 10(1), 137–151.

Wiedenfeld, H., Roeder, E., Bourauel, T., & Edgar, J. (2008). *Pyrrolizidine Alkaloids*.

Structure and Toxicity (1st ed.). Veröffentlichungen der Bonn University, Germany. p 142.

Willimans, R. (1987). Occurrence, Concentration, and Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria* Seeds. *Weed Science*, 35(4), 476–481.

Witte, L., Rubiolo, P., Bicchi, C., & Hartmann, T. (1992). Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry*, 32(1), 187–196.

Zhang, W., Huai, W., Zunyou, Xie, X., Wang, K., & Fan, H. (2017). 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 Standardshang. *Phytochemical Analysis*, 28(5), 365–373.

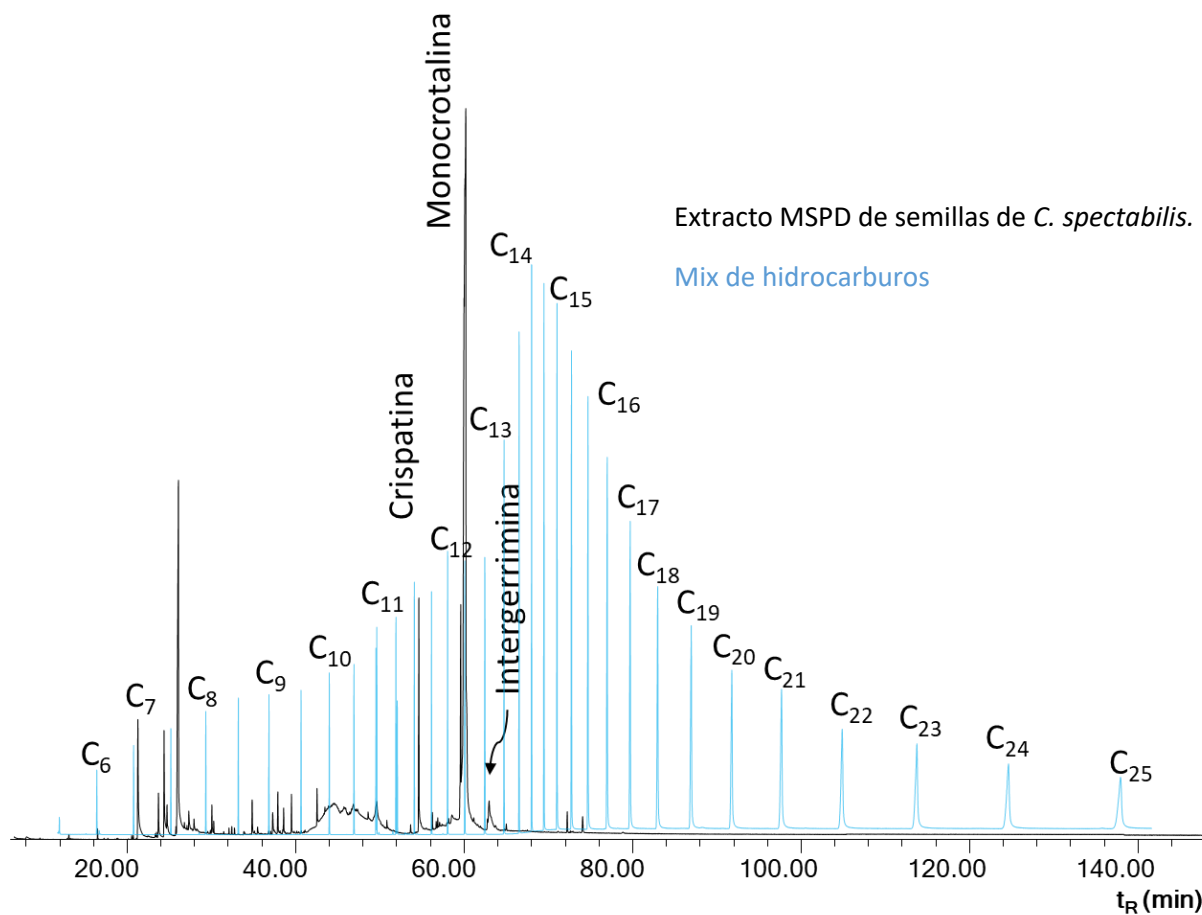
Zubarev, R. A., & Makarov, A. (2013). Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(11), 5288–5296.

Apéndices

Apéndice 1. Porcentaje de recuperación (%) de retrorsina en el método de extracción de dispersión de la matriz en fase sólida, MSPD, usando de tres tipos de soportes solidos: Arena, C₁₈ y florisil.

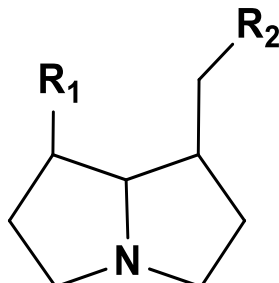
Exp N°	Soporte	Solvente	Recuperación, %	Promedio, % Rec.
1	Arena	MeOH	44,5	
2	Arena	MeOH	42,7	(50 ± 10)
3	Arena	MeOH	61,7	
4	Arena	MeOH_AF (2%)	65,6	
5	Arena	MeOH_AF (2%)	65,6	(64 ±2)
6	Arena	MeOH_AF (2%)	61,8	
7	C ₁₈	MeOH	79,5	
8	C ₁₈	MeOH	82,2	(78 ± 4)
9	C ₁₈	MeOH	74,1	
10	C ₁₈	MeOH_AF (2%)	84,9	
11	C ₁₈	MeOH_AF (2%)	85,4	(84 ±1)
12	C ₁₈	MeOH_AF (2%)	82,3	
13	Florisil	MeOH	68,6	
14	Florisil	MeOH	77,4	(72 ±4)
15	Florisil	MeOH	70,3	
16	Florisil	MeOH_AF (2%)	48,9	
17	Florisil	MeOH_AF (2%)	41,5	(44 ±4)
18	Florisil	MeOH_AF (2%)	41,9	

AF – Ácido fórmico (2%)



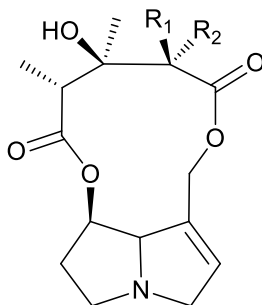
Apéndice 2. Perfiles cromatográficos, obtenido por GC-MS de los extractos de semillas de *C. spectabilis* aislados por MSPD y el mix de hidrocarburos C₆-C₂₅ para el cálculo de los índices de retención lineal. Columna DB-5MS, 60 m. *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

Apéndice 3. Iones característicos en los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (70 eV), de los alcaloides pirrolizidínicos de cadena abierta.



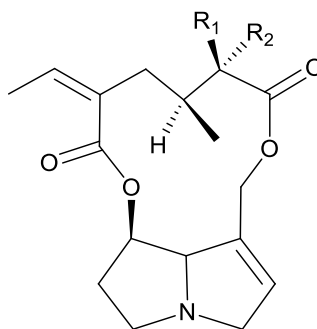
MOMBRE	Sustituyente		<i>m/z</i> (I, %)				
	R ₁	R ₂	[M] ⁺	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
7-Angeloilretronecina		OH	237 (2)	137 (20)	106 (40)	94 (25)	80 (100)
9-Angeloilretronecina	OH		237 (1)	137 (25)	138 (27)	94 (30)	93 (100)
9-Tigloilretronecina	OH		237 (2)	138 (20)	137 (25)	93 (100)	80 (18)

Apéndice 4. Iones característicos en los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (70 eV), de los alcaloides pirrolizidínicos macrocíclicos de diez miembros.



MOMBRE	Sustituyente		<i>m/z</i> (I, %)				
	R ₁	R ₂	[M] ⁺	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
Monocrotalina	OH	CH ₃	325 (1)	236 (48)	136 (54)	120 (100)	93 (47)
Crispatina	H	CH ₃	309 (2)	136 (76)	120 (79)	119 (100)	93 (65)

Apéndice 5. Iones característicos en los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones (70 eV), de los alcaloides pirrolizidínicos macrocíclicos de once miembros.



MOMBRE	Sustituyente		I (<i>m/z</i> , %)					
	R ₁	R ₂	[M] ⁺	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
Intergerrimina	OH	CH ₃	335 (3)	220 (16)	136 (92)	120 (100)	94 (69)	93 (93)
Usaramina	OH	CH ₂ OH	352 (4)	220 (9)	136 (92)	120 (100)	94 (61)	93 (75)

Apéndice 6. Contenido de los PA y PANO [mg/g] en los diferentes tejidos de las especies de *Crotalaria* estudiadas.

ESPECIE	TEJIDO	COMPUESTOS	PROMEDIO ± SD, mg/g
<i>C. incana</i>	Semillas (n=10)	Intergerrimina	1,7 ± 0,6
		Retronecina	0,11 ± 0,03
		Usaramina	0,20 ± 0,09
		Intergerrimina N-óxido	0,013 ± 0,008
		Usaramina N-óxido	0,02 ± 0,01
		PA no identificados (3, 6, 17, 29, 38) *	1,0 ± 0,8
		PA totales	3,30 ± 0,03
	flores (n=2)	Intergerrimina	0,10 ± 0,03
		Intergerrimina N-óxido	0,09 ± 0,08
		Retronecina N-óxido	0,04 ± 0,03
		Usaramina N-óxido	0,03 ± 0,02
		PA desconocidos (3,6,17,14) *	1,0 ± 0,5
		PA totales	1,30 ± 0,06
	hojas (n=9)	PA no identificados (6) *	0,30 ± 0,07
		PA totales	0,30 ± 0,07
	Raíces (n=7)	Intergerrimina N-óxido	0,3 ± 0,2
		Retronecina N-óxido	0,2 ± 0,1
		Intergerrimina	0,06 ± 0,04
		Usaramina N-óxido	0,03 ± 0,01
		Retronecina	0,040 ± 0,008
PA no identificados (3, 5, 6) *		0,4 ± 0,3	
PA totales		1,20 ± 0,03	
<i>C. maypurensis</i>	Semillas (n=7)	Usaramina	0,8 ± 0,4
		Intergerrimina	0,2 ± 0,1
		Usaramina N-óxido	0,004 ± 0,003
		PA desconocidos (3, 6) *	1,3 ± 0,9
	PA totales	2,4 ± 0,4	
	flores (n=5)	PA desconocidos (6) *	0,120 ± 0,005
		PA totales	0,120 ± 0,005
	Hojas (n=6)	PA desconocidos (3, 5, 28, 29, 35, 38) *	0,05 ± 0,04
		PA totales	0,05 ± 0,04
	Raíces (n=6)	9-Angeolil retronecina N-óxido	0,30 ± 0,16
		Usaramina N-óxido	0,136 ± 0,03
		Intergerrimina N-óxido	0,030 ± 0,006
		Retronecina N-óxido	0,03 ± 0,02
9-Angeolil retronecina		0,5 ± 0,1	
Usaramina		0,07 ± 0,05	

Apéndice 6. Continuación

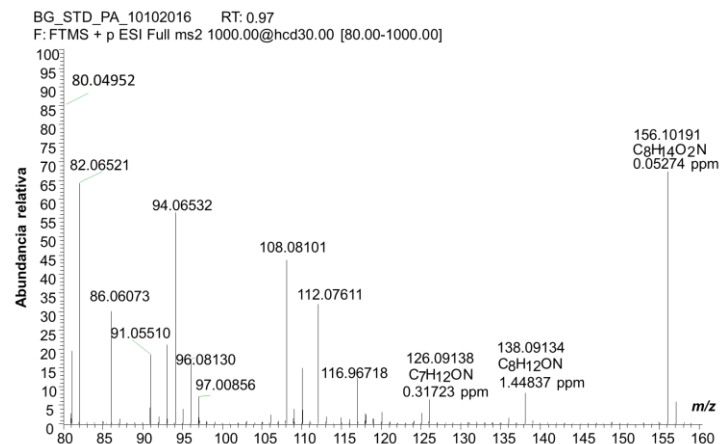
		PA desconocidos (3, 6, 5, 8, 28, 35, 38) *	0,6 ± 0,4
		PA totales	1,2 ± 0,3
<i>C. nitens</i>	Semillas (n=4)	Monocrotalina	4 ± 2
		Crispatina	1,0 ± 0,8
		Intergerrimina	1,0 ± 0,6
		Monocrotalina N-óxido	0,050 ± 0,006
		Crispatina N-óxido	0,010 ± 0,002
		Intergerrimina N-óxido	0,01 ± 0,01
		PA desconocidos (14, 15, 39) *	0,2 ± 0,1
		PA totales	6,1 ± 0,2
	Flores (n=3)	Monocrotalina N-óxido	1,1 ± 0,4
		Crispatina N-óxido	0,2 ± 0,1
		Intergerrimina N-óxido	0,3 ± 0,1
		Monocrotalina	0,04 ± 0,02
		Intergerrimina	0,014 ± 0,008
		Crispatina	0,004 ± 0,003
		PA desconocidos (17, 18) *	0,03 ± 0,02
		PA totales	1,8 ± 0,3
	Hojas (n=10)	Monocrotalina N-óxido	0,2 ± 0,1
		Crispatina N-óxido	0,14 ± 0,05
		Monocrotalina	0,05 ± 0,02
		Intergerrimina N-óxido	0,04 ± 0,03
		Crispatina	0,01 ± 0,01
		PA desconocidos (14, 17) *	0,04 ± 0,03
		PA totales	0,40 ± 0,01
Raíces (n=6)		Monocrotalina N-óxido	0,7 ± 0,3
	Monocrotalina	0,3 ± 0,1	
	9-Angeolil retronecina N-óxido	0,2 ± 0,1	
	Crispatina N-óxido	0,14 ± 0,05	
	Intergerrimina N-óxido	0,09 ± 0,07	
	Retronecina N-óxido	0,06 ± 0,03	
	9-Angeolil retronecina	0,04 ± 0,03	
	Crispatina	0,030 ± 0,03	
	Intergerrimina	0,06 ± 0,01	
	7-Angeolil retronecina N-óxido	0,005 ± 0,005	
	PA desconocidos (3, 5, 6, 15, 29, 35, 31) *	0,4 ± 0,2	
	PA totales	2,0 ± 0,3	
	<i>C. pallida</i>	Semillas (n=13)	Usaramina
Monocrotalina			0,03 ± 0,02
Intergerrimina			0,02 ± 0,01

Apéndice 6. Continuación

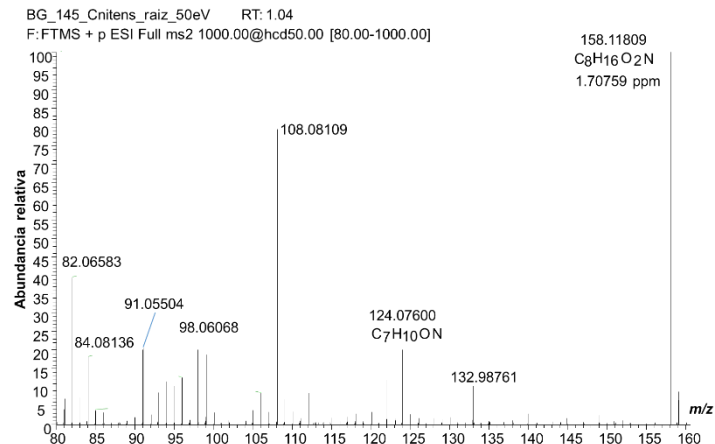
		Usaramina <i>N</i> -óxido	0,006 ± 0,005
		Retronecina	0,001 ± 0,001
		PA desconocidos (3, 6) *	1,2 ± 0,9
		PA totales	2,14 ± 0,03
flores		Usaramina <i>N</i> -óxido	0,003 ± 0,002
(<i>n</i> =4)		PA desconocidos (6) *	0,2 ± 0,1
		PA totales	0,20 ± 0,01
hojas		Usaramina <i>N</i> -óxido	0,002 ± 0,002
(<i>n</i> =10)		PA desconocidos (6) *	0,3 ± 0,2
		PA totales	0,3 ± 0,2
Raíces		9-Angeolil retronecina <i>N</i> -óxido	0,3 ± 0,1
(<i>n</i> =8)		Usaramina <i>N</i> -óxido	0,3 ± 0,2
		Intergerrimina <i>N</i> -óxido	0,3 ± 0,1
		9-Angeolil retronecina	0,08 ± 0,01
		Intergerrimina	0,03 ± 0,02
		Usaramina	0,03 ± 0,01
		Retronecina <i>N</i> -óxido	0,008 ± 0,004
		PA desconocidos (3, 5, 6, 17, 28, 38) *	1,249 ± 1,3
		PA totales	2,1 ± 0,5
<i>C. retusa</i>	Semillas	Monocrotalina	20 ± 1
	(<i>n</i> =4)	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	0,5 ± 0,1
		Crispatina	0,19 ± 0,02
		Retronecina	0,08 ± 0,05
		Intergerrimina	0,013 ± 0,002
		PA desconocidos (14, 26, 39) *	0,2 ± 0,1
		PA totales	20,0 ± 0,7
Flores		Monocrotalina <i>N</i> -óxido	14,320 ± 4
(<i>n</i> =3)		Monocrotalina	0,5 ± 0,3
		Usaramina	0,07 ± 0,02
		Crispatina <i>N</i> -óxido	0,034 ± 0,002
		Retronecina <i>N</i> -óxido	0,03 ± 0,02
		Intergerrimina	0,006 ± 0,002
		PA desconocidos (18, 31) *	0,4 ± 0,1
		PA totales	15 ± 2
Hojas		Monocrotalina <i>N</i> -óxido	4,3 ± 0,4
(<i>n</i> =4)		Monocrotalina	0,10 ± 0,02
		Usaramina	0,08 ± 0,03
		Crispatina <i>N</i> -óxido	0,008 ± 0,006
		Intergerrimina	0,007 ± 0,003
		Retronecina <i>N</i> -óxido	0,001 ± 0,001
		PA desconocidos (17) *	0,07 ± 0,05

Apéndice 6. Continuación.

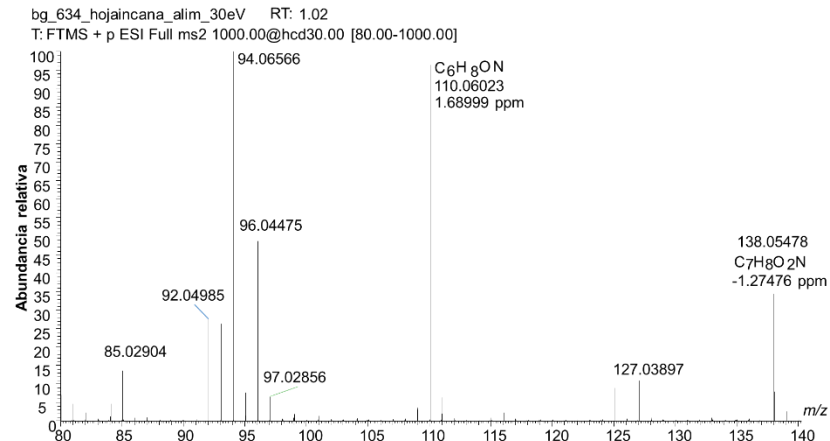
		PA totales	4,6 ± 0,3
	Raíces	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	0,8 ± 0,6
	(<i>n</i> =4)	Monocrotalina	0,4 ± 0,3
		9-Angeolil retronecina <i>N</i> -óxido	0,11 ± 0,08
		Retronecina	0,05 ± 0,05
		Retronecina <i>N</i> -óxido	0,03 ± 0,02
		9-Angeolilretronecina	0,01 ± 0,01
		Crispatina <i>N</i> -óxido	0,009 ± 0,003
		PA desconocidos (3, 5, 6, 18, 31) *	0,30 ± 0,09
		PA totales	1,5 ± 0,5
<i>C.</i>	Semillas	Monocrotalina	15 ± 6
<i>spectabilis</i>	(<i>n</i> =7)	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	0,02 ± 0,01
		Crispatina	0,006 ± 0,005
		PA desconocidos (15, 17, 26, 39) *	0,02 ± 0,01
		PA totales	14 ± 2
	Flores	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	12 ± 5
	(<i>n</i> =2)	Monocrotalina	0,55 ± 0,04
		Crispatina <i>N</i> -óxido	0,02 ± 0,01
		PA desconocidos (31) *	0,2 ± 0,1
		PA totales	13 ± 3
	Hojas	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	2 ± 1
	(<i>n</i> =7)	Monocrotalina	0,16 ± 0,04
		Crispatina <i>N</i> -óxido	0,007 ± 0,005
		PA desconocidos (17, 31) *	0,03 ± 0,02
		PA totales	1,9 ± 0,6
	Raíces	Monocrotalina <i>N</i> -óxido	2 ± 1
	(<i>n</i> =6)	Monocrotalina	0,7 ± 0,6
		9-Angeolil retronecina <i>N</i> -óxido	0,2 ± 0,1
		Retronecina	0,09 ± 0,06
		Retronecina <i>N</i> -óxido	0,11 ± 0,09
		Crispatina <i>N</i> -óxido	0,02 ± 0,02
		9-Angeolil retronecina	0,008 ± 0,06
		PA desconocidos (3, 5, 6, 31) *	1,3 ± 0,9
		PA totales	4 ± 1



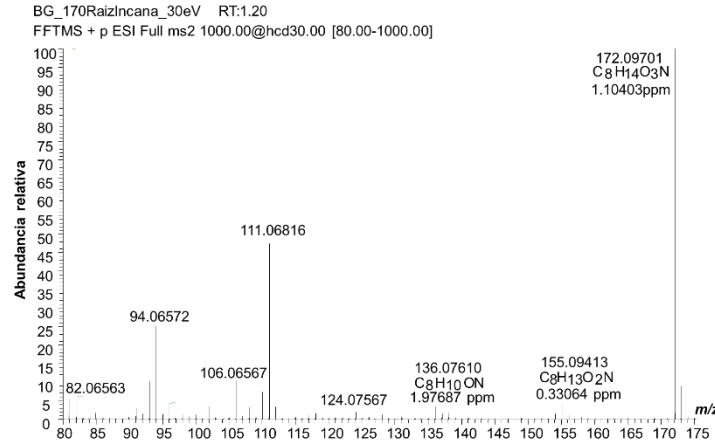
Apéndice 7. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la retronecina, C₈H₁₃NO₂, [M+H]⁺: m/z 156,10191 (t_R: 0,97 min).



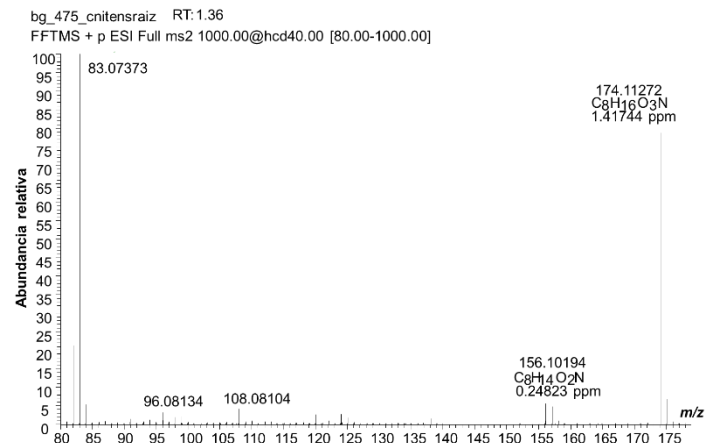
Apéndice 9. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado C₆H₁₅NO₂, [M+H]⁺: m/z 158,11756, t_R: 1,04 min.



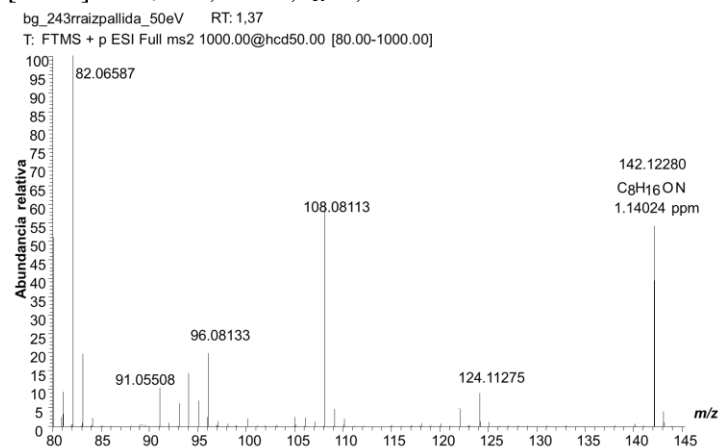
Apéndice 8. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado C₇H₇NO₂, [M+H]⁺: m/z 138,05496, t_R: 1,02 min.



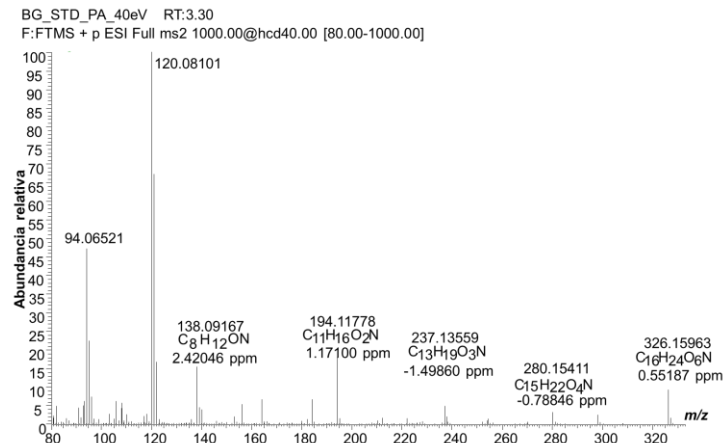
Apéndice 10. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la retronecina N-óxido, C₈H₁₃NO₃, [M+H]⁺: m/z 172,09683, t_R: 1,20 min.



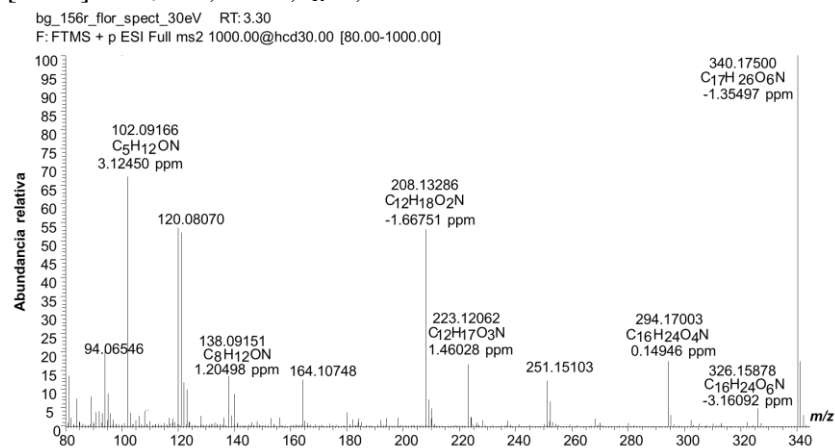
Apéndice 11. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) del PANO no identificado, C₈H₁₆NO₃, [M+H]⁺: m/z 174,11247, t_R: 1,36 min.



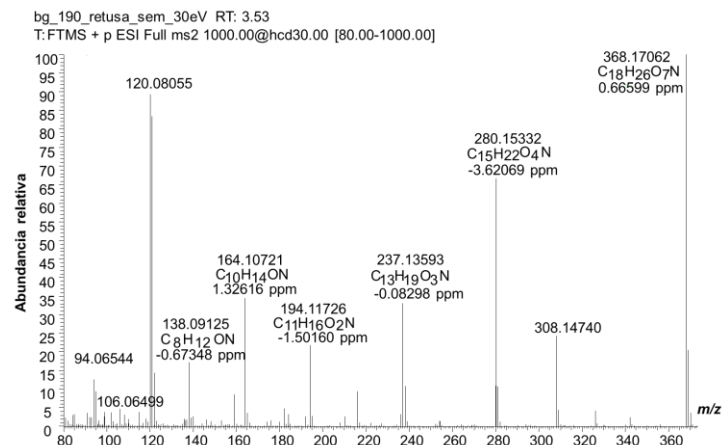
Apéndice 12. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado, C₈H₁₅NO, [M+H]⁺: m/z 142,12264, t_R: 1,37 min.



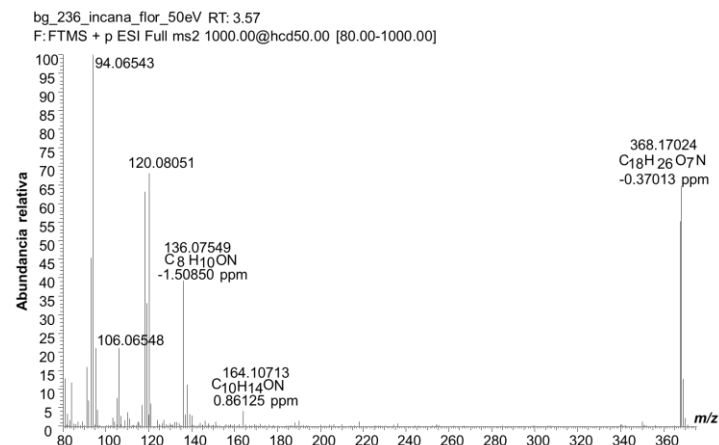
Apéndice 13. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) de la monocrotalina, C₁₆H₂₃NO₆, [M+H]⁺: m/z 326,15981, t_R: 3,30 min.



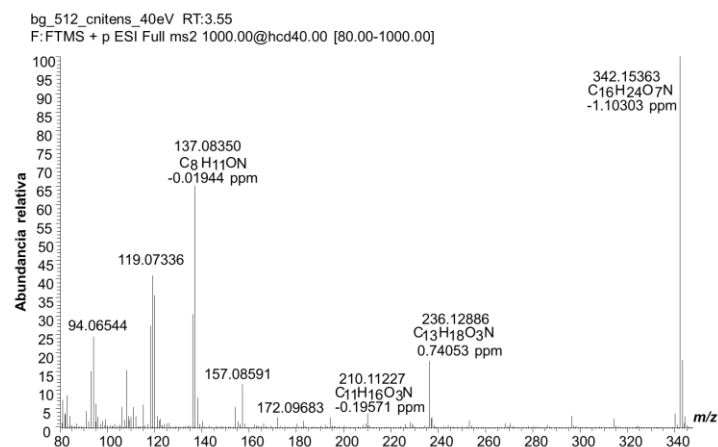
Apéndice 14. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₇H₂₅NO₆, [M+H]⁺: m/z 340,17546, t_R: 3,30 min.



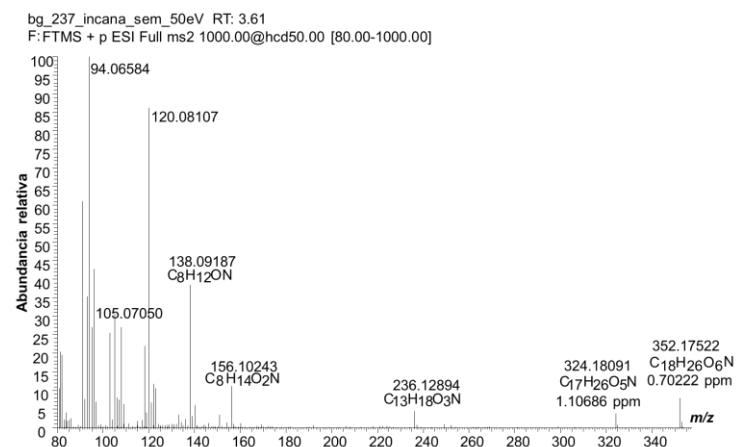
Apéndice 15. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo monocrotalina, C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 368,17038, *t_R*: 3,53 min.



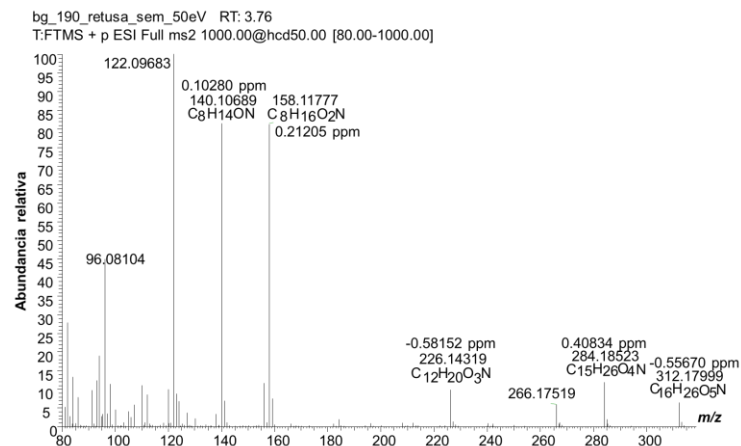
Apéndice 17. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 368,17038, *t_R*: 3,57 min.



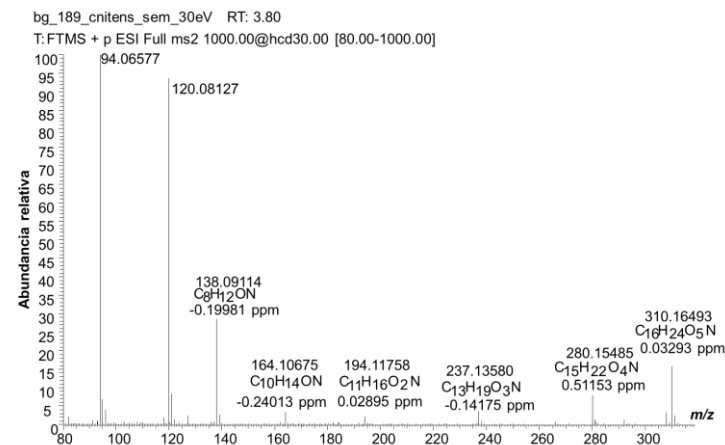
Apéndice 16. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) de la monocrotalina *N*-óxido, C₁₆H₂₃NO₇, [M+H]⁺: *m/z* 342,15373, *t_R*: 3,55 min.



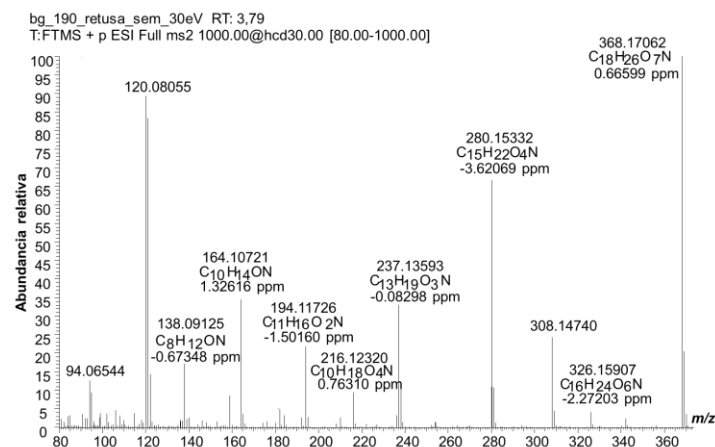
Apéndice 18. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PANO no identificado, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17546, *t_R*: 3,61 min.



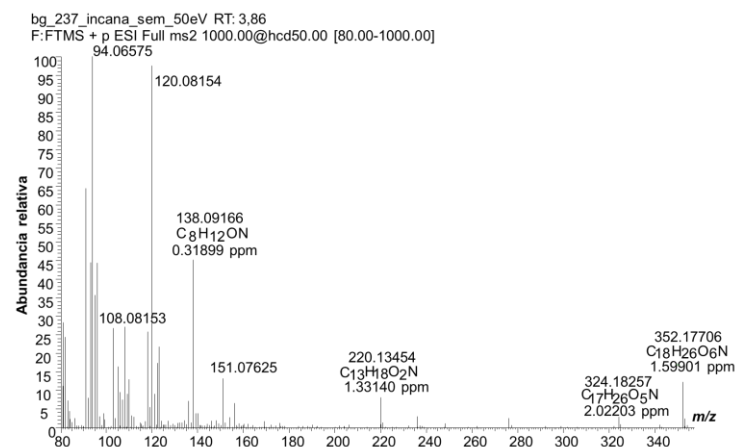
Apéndice 19. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la retusina, $C_{16}H_{25}NO_5$, $[M+H]^+$: m/z 312,18055, t_R : 3,76 min.



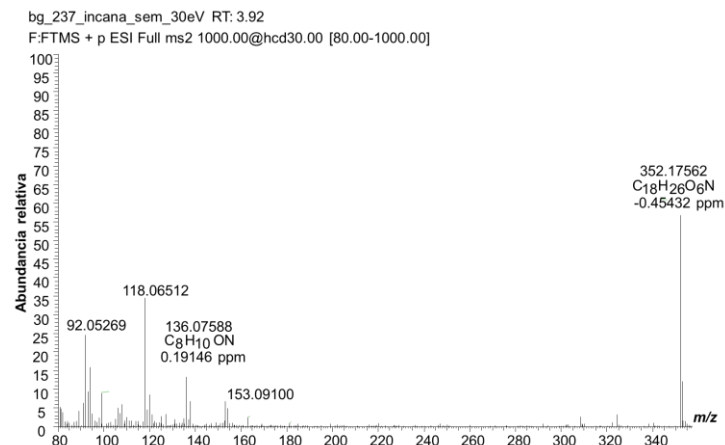
Apéndice 21. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo crispatina, $C_{16}H_{23}NO_5$, $[M+H]^+$: m/z 310,16490, t_R : 3,80 min



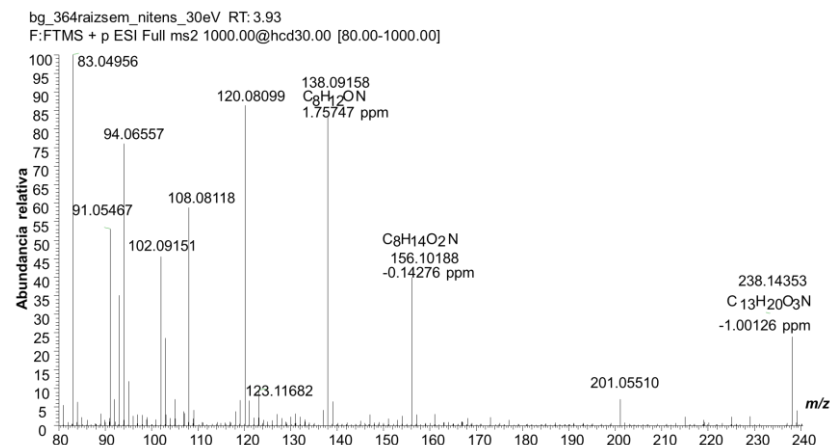
Apéndice 20. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo monocrotalina, $C_{18}H_{25}NO_7$, $[M+H]^+$: m/z 368,17038, t_R : 3,79 min.



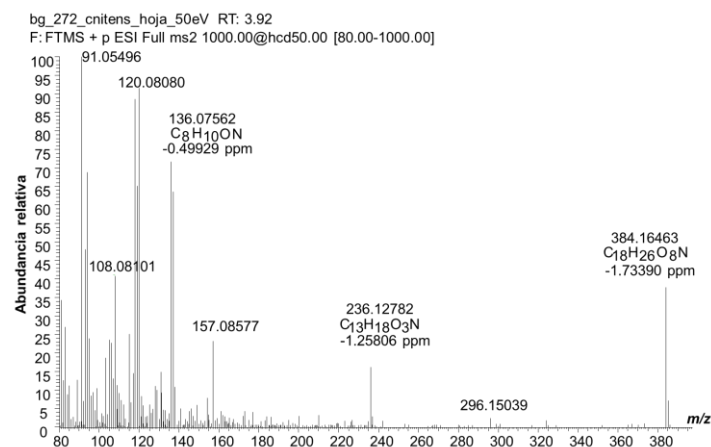
Apéndice 22. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la usaramina, $C_{18}H_{25}NO_6$, $[M+H]^+$: m/z 352,17546, t_R : 3,86 min.



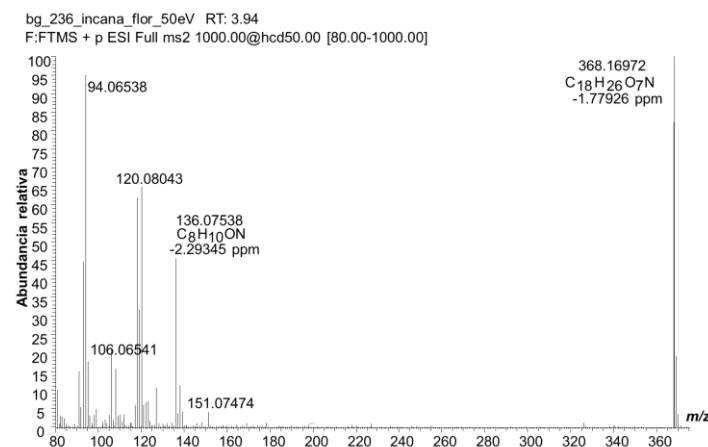
Apéndice 23. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo usaramina, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: m/z 352,17546, t_R: 3,92 min



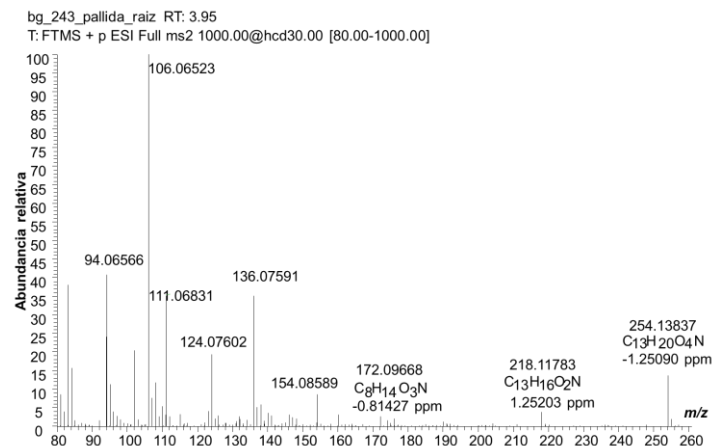
Apéndice 25. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 7-angeloilretronecina, C₁₃H₁₉NO₃, [M+H]⁺: m/z 238,14377, t_R: 3,93 min.



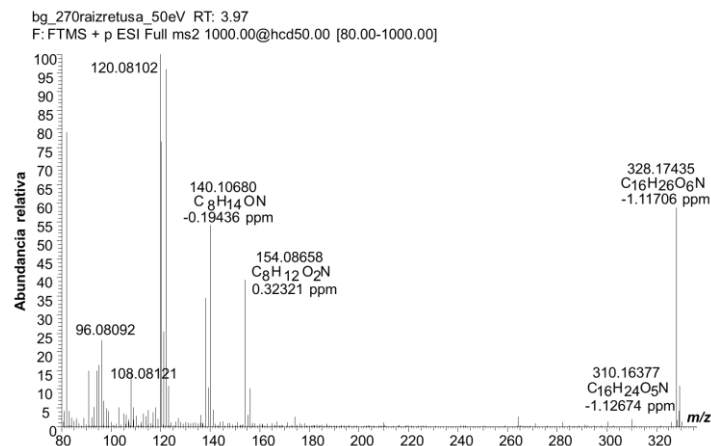
Apéndice 24. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PANO no identificado, C₁₈H₂₅NO₈, [M+H]⁺: m/z 384,16529 t_R: 3,92 min.



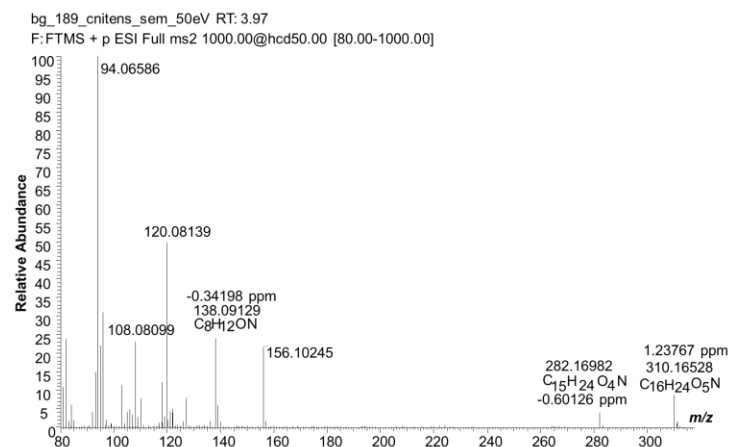
Apéndice 26. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la usaramina *N*-óxido, C₁₈H₂₅NO₇, [M+H]⁺: m/z 368,17038, t_R: 3,94 min.



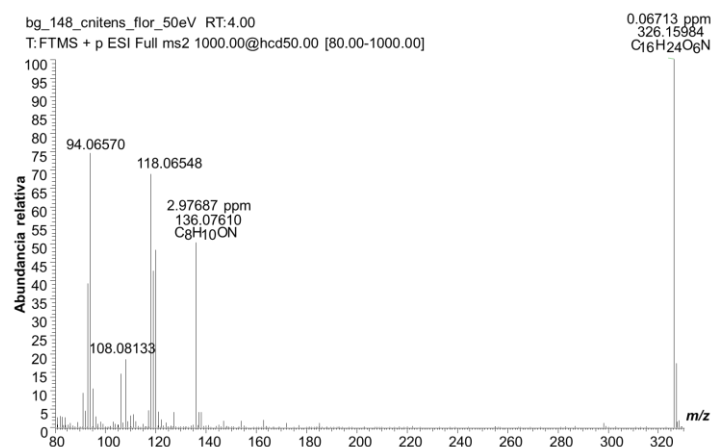
Apéndice 27. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 7-angeloilretronecina *N*-óxido, $C_{13}H_{19}NO_4$, $[M+H]^+$: m/z 254,13868, t_R : 3,95 min.



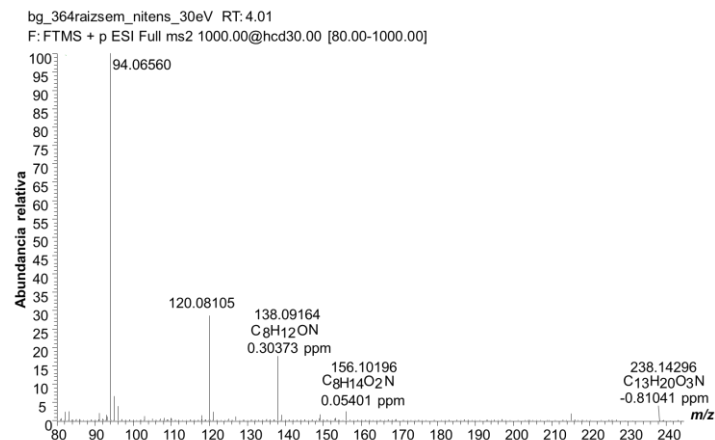
Apéndice 29. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la retusina *N*-óxido, $C_{16}H_{25}NO_6$, $[M+H]^+$: m/z 310,16582, t_R : 3,97 min.



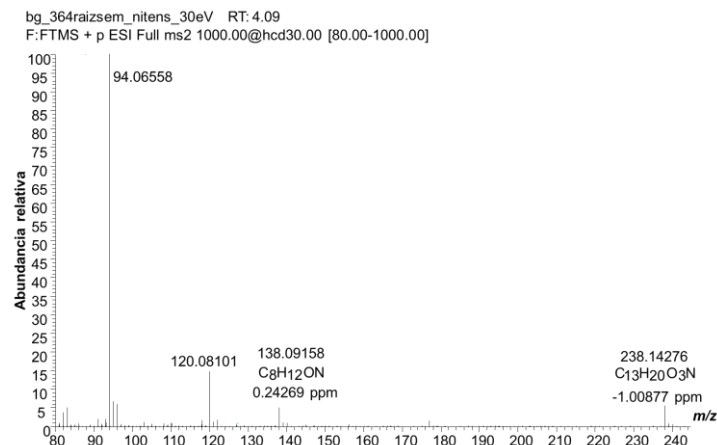
Apéndice 28. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la crispatina, $C_{16}H_{23}NO_5$, $[M+H]^+$: m/z 310,16490, t_R : 3,97 min.



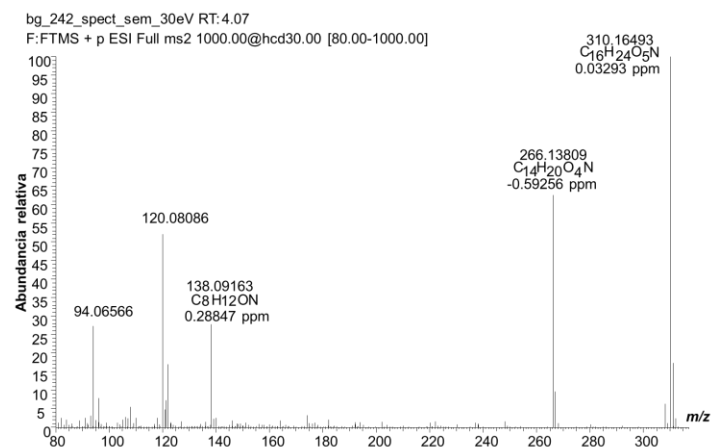
Apéndice 30. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la crispatina *N*-óxido, $C_{16}H_{23}NO_6$, $[M+H]^+$: m/z 310,16490, t_R : 4,00 min.



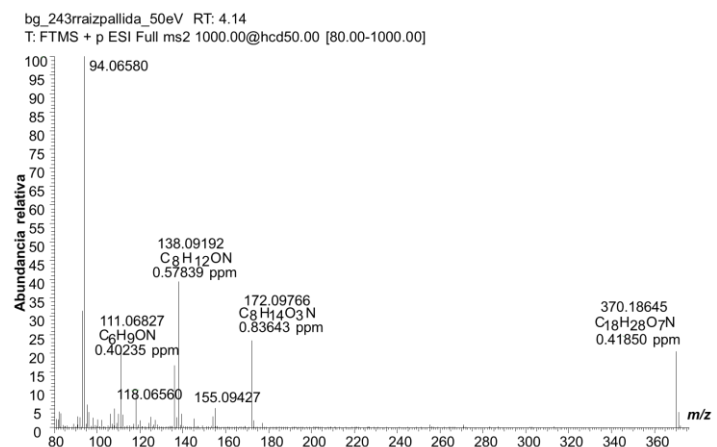
Apéndice 31. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 9-tigloilretronecina, C₁₃H₁₉NO₃, [M+H]⁺: m/z 238,14377, t_R: 4,01 min.



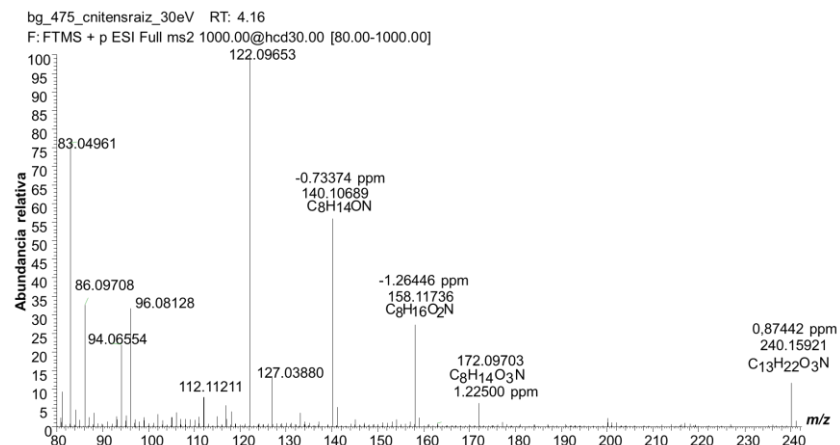
Apéndice 33. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 9-angeloilretronecina, C₁₃H₁₉NO₃, [M+H]⁺: m/z 238,14377, t_R: 4,09 min.



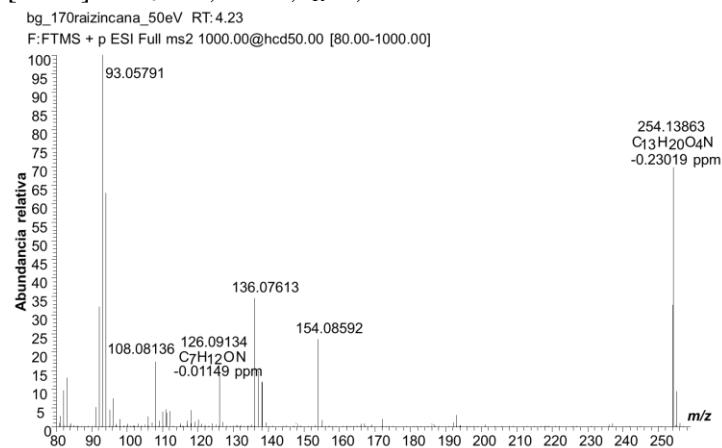
Apéndice 32. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado, C₁₆H₂₃NO₅, [M+H]⁺: m/z 310,16490, t_R: 4,07 min.



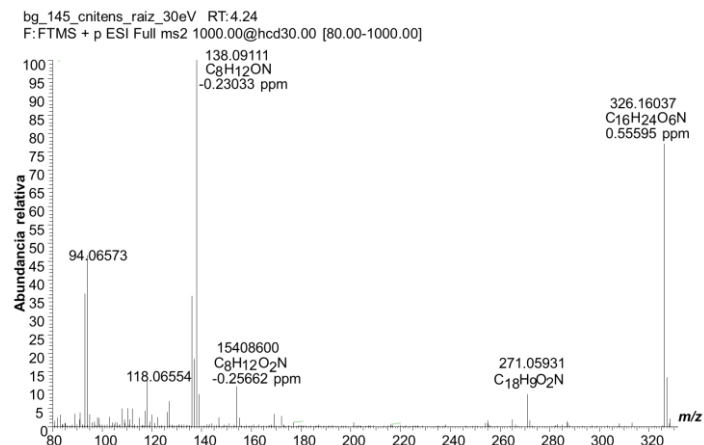
Apéndice 34. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado, C₁₈H₂₇NO₇, [M+H]⁺: m/z 370,18063, t_R: 4,14 min.



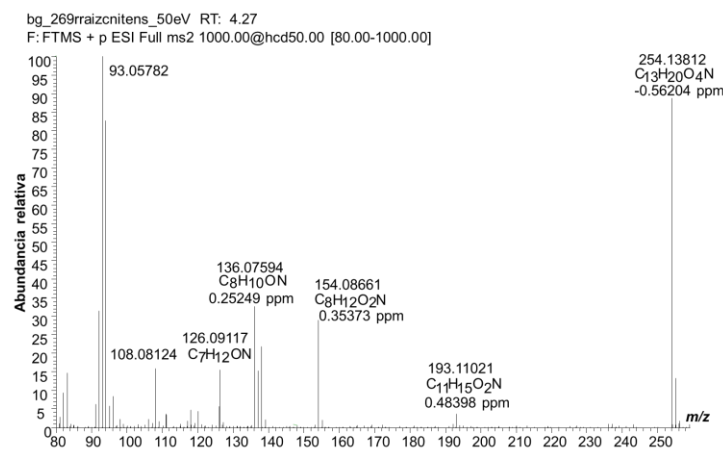
Apéndice 35. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado, C₁₃H₂₀NO₃, [M+H]⁺: m/z 240,15942, t_R: 4,16 min.



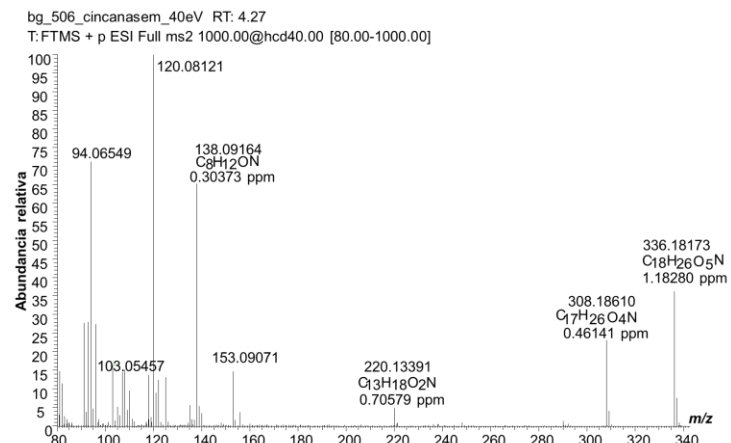
Apéndice 36. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la 9-tigloilretroreocina *N*-óxido, C₁₃H₁₉NO₄, [M+H]⁺: m/z 254,13868, t_R: 4,23 min.



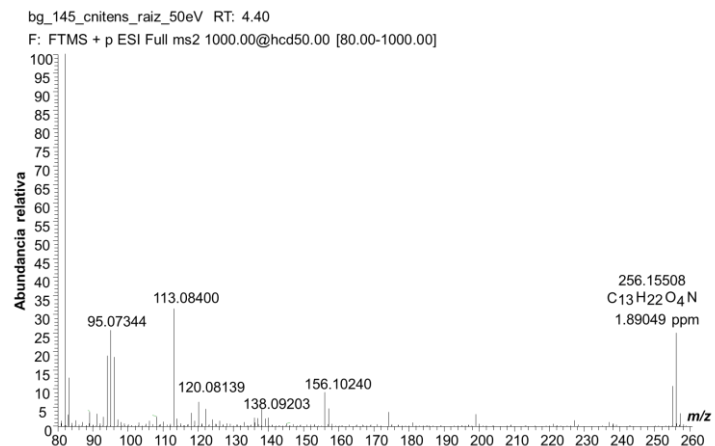
Apéndice 37. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PANO no identificado, C₁₆H₂₃NO₆, [M+H]⁺: m/z 326,15981, t_R: 4,24 min.



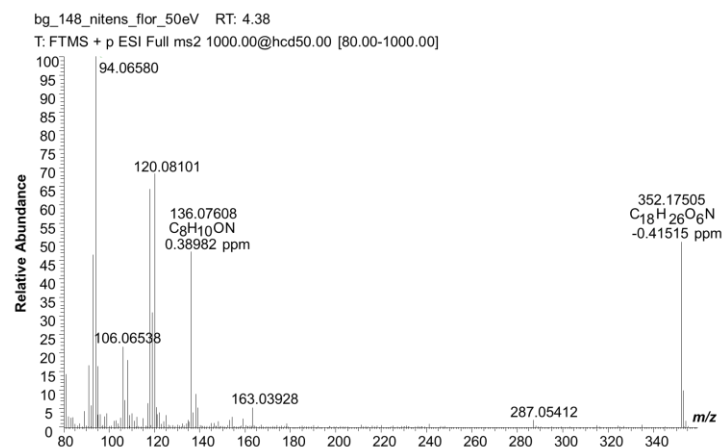
Apéndice 38. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la 9-angeloilretroreocina *N*-óxido, C₁₃H₁₉NO₄, [M+H]⁺: m/z 254,13868, t_R: 4,27 min.



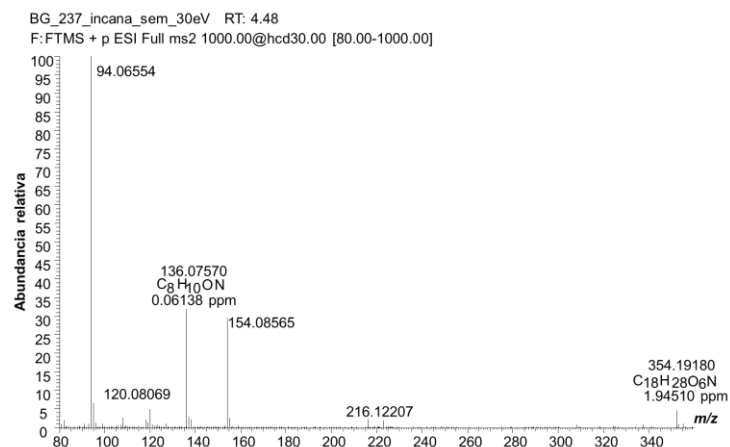
Apéndice 39. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 40 eV) de la intergerrimina, C₁₈H₂₅NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 336,18055, *t_R*: 4,27 min.



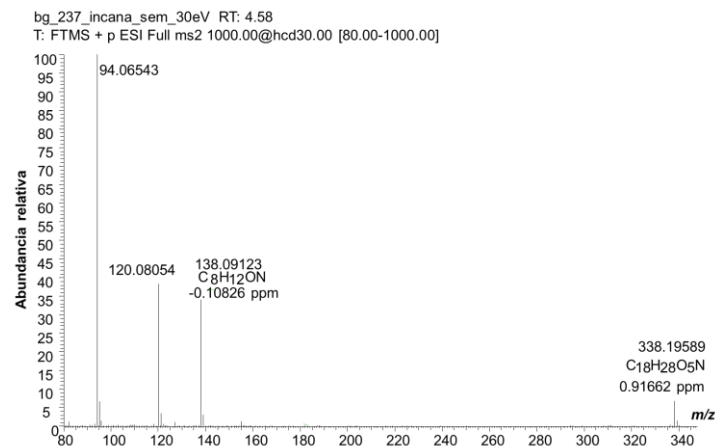
Apéndice 41. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PANO no identificado, C₁₃H₂₂NO₄, [M+H]⁺: *m/z* 256,15433, *t_R*: 4,40 min.



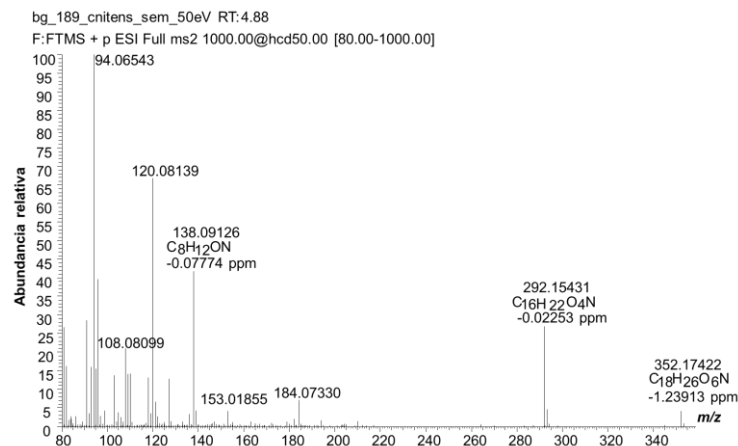
Apéndice 40. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) de la intergerrimina *N*-óxido, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17546, *t_R*: 4,38 min.



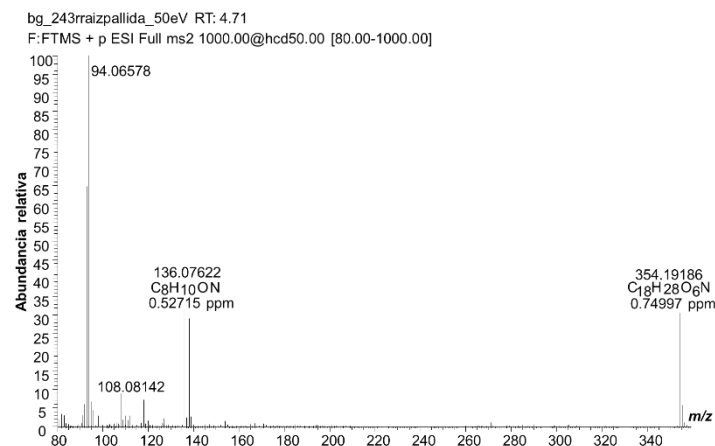
Apéndice 42. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo platynecina, C₁₈H₂₇NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 354,19111, *t_R*: 4,48 min.



Apéndice 43. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 30 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₇NO₅, [M+H]⁺: *m/z* 338,19620, *t_R*: 4,58 min.



Apéndice 45. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₅NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 352,17422, *t_R*: 4,88 min.



Apéndice 44. Espectro de masas UHPLC-ESI⁺-*Obitrap*-MS operado en modo *step scan* (HCD, 50 eV) del PA no identificado de tipo retronecina, C₁₈H₂₇NO₆, [M+H]⁺: *m/z* 354,19111, *t_R*: 4,71 min.