

**Efecto de la herbivoría de *utetheisa ornatrix* (lepidoptera) sobre el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en *crotalaria nitens* (familia fabácea).**

**Yesica Bautista Correa**

**Trabajo de investigación como requisito parcial para optar  
por el título de Química**

**Directora:**

**Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.**

**Co-directores:**

**Fausto Prada Chaparro, Químico**

**Jairo René Martínez, Químico, Ph.D**

**Centro de Investigación en Biomoléculas-CIBIMOL**

**Centro de Investigación de Excelencia-CENIVAM**

**Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas-CROM-MASS**

**Universidad industrial de santander**

**Facultad de ciencias**

**Escuela de química**

**Bucaramanga**

**2018**

### Dedicatoria

A Dios, quien ha sido mi guía y mi fortaleza, enseñándome a encontrarle aún en los detalles más pequeños.

A mis padres Yaneth y Jaime porque gracias a su esfuerzo he logrado cumplir todas las metas de mi vida.

A mis hermanos David y Sebastián ejemplo de dedicación y firmeza.

A Julián, John, Angélica, Natalia, Alejandra, Daniel, Karol, Jennifer y Jeffer que caminaron a mi lado por tantos años y hoy son parte de mi familia.

A Fausto, Anderson, Karol, Leydé, Luis Miguel y Jesica, por permitirme crecer a su lado personal y profesionalmente.

A Laura y Diana por su apoyo y su palabra en el momento justo, que me devolvió la fuerza y me recordó el camino.

A Pedro, Ana Rosa y Fredy porque su confianza me motivó a no rendirme en medio del camino.

A todas las personas que hicieron parte de este trasegar, familia y amigos, y a aquellos que, aunque hoy no se encuentren cerca, me permitieron ser parte de sus vidas y aprender de ellos la alegría, el amor y la perseverancia.

*No se trata de inteligencia; (...) la mayoría de los hombres son como hojas que caen y revolotean indecisas, (...) otras son como los astros; siguen una ruta fija, ningún viento los alcanza y llevan en su interior su propia ley y trayectoria.*

*H.Hesse.*

### **Agradecimientos**

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

A la doctora Elena E. Stashenko y el doctor Jairo René Martínez por la dedicación, el tiempo, la motivación y el conocimiento entregados, que hicieron parte vital del desarrollo y construcción de este trabajo de investigación.

A Fausto Prada Chaparro, por su tiempo y valiosa ayuda en el desarrollo de este trabajo de investigación.

### Tabla de contenido

Introducción.....	16
1. Objetivos.....	18
1.1 Objetivo general.....	18
1.2 Objetivos específicos .....	18
2. Marco de referencia.....	19
2.2.1 Género <i>crotalaria</i> .....	22
2.2.2.1 <i>Crotalaria nitens</i> .....	23
2.2.2 Género <i>utetheisa</i> .....	25
2.2.2.1 <i>Utetheisa ornatrix</i> .....	25
2.2.3 Interacción planta – insecto.....	28
2.2.3.1 <i>Herbivoría</i> .....	29
2.2.4 Mecanismos de defensa de la planta .....	30
2.2.4.1 <i>Mecanismos constitutivos</i> .....	30
2.2.4.2 <i>Mecanismos inducidos</i> .....	30
2.2.5 Metabolitos secundarios .....	31
2.2.5.1 <i>Alcaloides</i> .....	31
2.2.5.2 <i>Alcaloides pirrolizidínicos</i> .....	32
2.2.6 Métodos de extracción de alcaloides pirrolizidínicos.....	36
2.2.7Análisis cromatográfico.....	37
2.2.7.1 <i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</i> .....	37
2.2.7.2 <i>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo</i> .....	39
2.2.7.3 <i>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector orbitrap</i> .....	41
3. Metodología.....	43
3.1 Solventes, reactivos, materiales y equipos. ....	43
3.2 Material vegetal. ....	44
3.2.1 Recolección de <i>crotalaria nitens</i> .....	44
3.2.2Identificación taxonómica.....	44
3.3 Orugas y polillas.....	44

3.3.1 Recolección de orugas <i>u. Ornatrix</i> .....	44
3.3.2 Propagación y mantenimiento de la cría de <i>u. Ornatrix</i> .....	45
3.4 Implementación del método de extracción. ....	45
3.5 Composición de alcaloides pirrolizidínicos y sus <i>n</i> - óxidos en <i>c. Nitens</i> .....	49
3.5.1 Extracción y reducción de pano a pa.....	50
3.5.2 Análisis de extractos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector <i>orbitrap</i> . ....	53
3.6 Alcaloides pirrolizidínicos <i>c. Nitens</i> en diferentes estados de crecimiento. ....	54
3.6.1 Variación de alcaloides pirrolizidínicos en los órganos de <i>c. Nitens</i> durante su crecimiento. .55	
3.7 Análisis de alcaloides pirrolizidínicos en <i>c. Nitens</i> antes y después del ataque con <i>u. Ornatrix</i> .58	
3.7.1 Ataque por herbivoría a plantas de <i>c. Nitens</i> . ....	58
3.7.2 Muestreo y análisis de pa en hojas y raíces de <i>c. Nitens</i> . ....	59
4. Análisis y discusión de resultados.....	61
4.1 Estandarización del método de extracción.....	61
4.2 Identificación y cuantificación de los alcaloides pirrolizidínicos en <i>c. Nitens</i> . ....	63
4.2.1 Análisis de extractos mspd por gc-ms. ....	63
4.2.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector <i>orbitrap</i> .....	67
4.3 Alcaloides pirrolizidínicos en diferentes estados de crecimiento de <i>c. Nitens</i> . ....	75
4.4 Efecto de la herbivoría con <i>u. Ornatrix</i> sobre el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en <i>c. Nitens</i> .....	78
5. Conclusiones .....	82
6. Recomendaciones .....	83
Referencias.....	84
Apéndices.....	98

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Identificación taxonómica de la especie bajo estudio.....	24
<b>Tabla 2.</b> Identificación taxonómica de la especie <i>Utetheisa ornatrix</i> [43]......	26
<b>Tabla 3.</b> Dosis media letal de algunos PA [92].....	36
<b>Tabla 4.</b> Solventes, reactivos, materiales y equipos empleados durante el desarrollo de la investigación. ....	43
<b>Tabla 5.</b> Identificación botánica de la planta <i>C. nitens</i> . ....	44
<b>Tabla 6.</b> Condiciones experimentales para la estandarización del método de extracción. ....	47
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de preparación de la curva de calibración de la monocrotalina. ....	58
<b>Tabla 8.</b> Alcaloides pirrolizidínicos identificados por GC-MS en el extracto de semillas de <i>C. nitens</i> obtenido por MSPD. ....	64
<b>Tabla 9.</b> Masas exactas e iones característicos de los PA y los PANO obtenidos por UHPLC-ESI(+)- <i>Orbitrap</i> -MS, en el análisis de los extractos de hojas y raíces de <i>C. nitens</i> . ....	68
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de conversión de PA a PANO después del tratamiento de reducción de los extractos MSPD de hojas de <i>C. nitens</i> . ....	70
<b>Tabla 11.</b> Parámetros de la curva de calibración de la monocrotalina.....	74
<b>Tabla 12.</b> Concentración de PA y relación de PANO/PA en distintas partes de plantas de <i>C. nitens</i> . ....	78

### Lista de figuras

- Figura 1.** Relación de publicaciones según año. Fecha de consulta: 18 de diciembre de 2017. Fuente: *Scopus* (Elsevier). Periodo de observación: 1973-2018. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: “Herbivory”.....19
- Figura 2.** Relación de publicaciones por año. Fecha de búsqueda: 18 de diciembre de 2017. ....21
- Figura 3.** *Crotalaria nitens*. Fuente: Fausto Prada. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga-Santander, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2016.....24
- Figura 4.** *Utetheisa ornatrix* en sus fases de crecimiento. **A.** Huevos; **B.** Oruga; **C.** Crisálida; **D.** Polilla. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga-Santander, Colombia. Fecha: 14 de junio de 2017.....27
- Figura 5.** Estructura general de los alcaloides pirrolizidínicos: **A.** Retronecina; **B.** Otonecina; **C.** Heliotridina.....33
- Figura 6.** Estructuras moleculares de algunos PA comunes en plantas de *Crotalaria*:.....34
- Figura 7.** Esquema general de la biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos (senecionina), tomado de [87]. ....35
- Figura 8.** Proceso de obtención de extractos por dispersión de la matriz en fase sólida. **A.** Mortero con pistilo, **B.** Agente dispersante (soporte sólido), **C.** Material vegetal. Fuente: Samir Suárez Torrenegra. Lugar: CENIVAM. UIS, Bucaramanga. Fecha: 10 de noviembre de 2016. ....47
- Figura 9.** Cromatógrafo líquido AT 1200 *Series* con analizador de tiempo de vuelo AT TOF-MS 6210 *Series*. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, UIS. Bucaramanga. Fecha: 17 de noviembre de 2017.....49
- Figura 10.** Esquema de la reacción de reducción de *N*-óxido de monocrotalina a monocrotalina base, usando Zn en medio ácido [18]. ....51
- Figura 11.** **A.** Cromatógrafo de gases AT 6890 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas AT 5973 *Network*.; **B.** Cromatógrafo líquido (UHPLC, *Dionex Ultimate 3000*), acoplado a un espectrómetro de masas *Orbitrap (Exactive Plus*,

<i>Thermo Scientific</i> ). Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, UIS. Bucaramanga. Fecha: 17 de noviembre de 2017.....	54
<b>Figura 12.</b> Apariencia final de sitio construido para el experimento de interacción de <i>C. nitens</i> con <i>U. ornatix</i> . Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2017.....	55
<b>Figura 13.</b> Protección de las plantas de <i>C. nitens</i> contra otro tipo de insectos diferentes a orugas de <i>U. ornatix</i> . Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2017.....	59
<b>Figura 14.</b> Proceso de homogeneización de las hojas de <i>C. nitens</i> muestreadas. <b>A.</b> Hojas tratadas con N <sub>2</sub> líquido; <b>B.</b> Hojas trituradas; <b>C.</b> Muestra homogeneizada. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2017. ....	60
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de recuperación de retrorsina de hojas secas y molidas de <i>C. nitens</i> para el método de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida haciendo uso de tres tipos de soportes sólidos: arena, SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub> y florisil, y metanol o metanol acidificado con ácido fórmico (AF) al 2% como solvente de extracción.....	61
<b>Figura 16.</b> Estructura de la retrorsina, alcaloide pirrolizidínico usado como estándar interno para la estandarización del método de extracción de alcaloides pirrolizidínicos en muestra de <i>C. nitens</i> usando MSPD. ....	62
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico GC-MS del extracto MSPD de semillas de <i>C. nitens</i> . La identificación de picos aparece en la <b>Tabla 6</b> .....	64
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico GC-MS del patrón de <i>n</i> -parafinas C <sub>8</sub> -C <sub>40</sub> . ....	65
<b>Figura 19.</b> Superposición del perfil cromatográfico del patrón de <i>n</i> -parafinas C <sub>8</sub> -C <sub>40</sub> (rojo) y del perfil cromatográfico GC-MS del extracto MSPD de semillas de <i>C. nitens</i> (negro). ....	65
<b>Figura 20.</b> Espectro de masas de la monocrotalina (M <sup>+</sup> , <i>m/z</i> 325). Ionización por impacto de electrones (EI, 70 eV). ....	66
<b>Figura 21.</b> Posible esquema de fragmentación de monocrotalina, origen de los iones característicos <i>m/z</i> 93, 120 y 136. Tomado de [115]. ....	67

- Figura 22.** Cromatogramas obtenidos por UHPLC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS de los extractos MSPD de hojas de *C. nitens*. **A.** Los PANO en los extractos sin reducción con Zn/H<sup>+</sup> y **B.** Los PA en los extractos reducidos con Zn/H<sup>+</sup>. Ver identificación de los picos en la **Tabla 9**. .....69
- Figura 23.** Fragmentogramas de iones extraídos obtenidos por UHPLC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS del extracto MSPD de raíces de *C. nitens*. Identificación de los picos aparece en la **Tabla 9**. .....71
- Figura 24.** Posible esquema general de fragmentación de PA macrocíclicos con base retronecina analizados por UHPLC-ESI(+)-Cuadrapolo-*Orbitrap*-MS [116]. .....72
- Figura 25.** Esquema general de fragmentación de la 9-angelolilretronecina, molécula identificada tentativamente mediante por UHPLC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS. ....72
- Figura 26.** Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS, operado modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 9-angeloilretronecina. ....73
- Figura 27.** Curva de calibración de la monocrotalina para la cuantificación de PA y PANO en extractos de hojas y raíces de *C. nitens* mediante LC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS. ....74
- Figura 28.** **A.** Variación de la concentración de PA (mg/g) en diferentes órganos de *C. nitens*. **B.** Relación PANO/PA en diferentes órganos de *C. nitens*. Datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10 plantas). .....76
- Figura 29.** Comparación del área foliar y la altura de las plantas de *C. nitens* sin ataque (control) y atacadas por orugas *U. ornatix* (herbivoría). Datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10 plantas), intervalo de confianza: 90%. ....79
- Figura 30.** Variación de la concentración de PA en: **A.** Raíces y **B.** Hojas de plantas de *C. nitens* antes y después del ataque con *U. ornatix*. Datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10 plantas). .....80

**Lista de apéndices**

<b>Anexo A.</b> Espectros de masas de <b>i)</b> Crispatina ( $M^+$ , $m/z$ 309) y <b>ii)</b> Intergerrimina ( $M^+$ , $m/z$ 335). Ionización por impacto de electrones (EI, 70 eV).....	98
---	----

**Siglas, abreviaturas y acrónimos**

<b>CENIVAM</b>	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
<b>COV</b>	Compuestos orgánicos volátiles
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
<b>LC-MS</b>	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)
<b>MSPD</b>	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida)
<b><i>m/z</i></b>	Relación masa carga.
<b>SPE</b>	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
<b>TOF</b>	<i>Time-of-Flight</i> (Analizador de tiempo de vuelo)

### Resumen

**TÍTULO:** EFECTO DE LA HERBIVORÍA DE *Utetheisa ornatrix* (Lepidóptera) SOBRE EL CONTENIDO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EN *Crotalaria nitens* (Familia Fabácea)

**AUTORA:** Yesica Bautista Correa\*\*

**Palabras clave:** Herbivoría, *Crotalaria*, alcaloides pirrolizidínicos, GC-MS, LC-MS.

Las plantas del género *Crotalaria* de la familia Fabácea sintetizan alcaloides pirrolizidínicos como metabolitos secundarios con el fin de defenderse del ataque de diferentes insectos herbívoros. Los alcaloides pirrolizidínicos son moléculas con efectos hepatotóxicos y neumotóxicos. Las orugas del género *Utetheisa* se alimentan de *Crotalaria* con el fin de adquirir estos alcaloides como estrategia de protección ante sus propios depredadores. El ataque de un insecto a una planta se conoce como herbivoría. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto que causa la herbivoría de *U. ornatrix* sobre el contenido de alcaloides pirrolizidínicos (PA) en *Crotalaria nitens*, utilizando como método de extracción la técnica dispersión de la matriz en fase sólida y, como técnicas de análisis de los extractos obtenidos, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector *Orbitrap*. Se identificaron cuatro alcaloides pirrolizidínicos en hojas, semillas y raíces de *C. nitens*, a saber: monocrotalina, crispatina, integerrimina y 9-angeloilretronecina y sus respectivos *N*-óxidos. La concentración de PA en flores, semillas maduras y verdes, hojas apicales y basales y raíces fue: 0,90; 6,00 y 0,30; 0,05 y 0,30 y 0,30 mg/g PA totales, respectivamente. Bajo las condiciones del estudio no hubo cambios significativos en la concentración de alcaloides en hojas y raíces de *C. nitens* sometidas a herbivoría. Sin embargo, se observó disminución significativa en la altura (25 %) y en el área foliar (60 %) de las plantas atacadas.

---

\*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:** HERBIVORY EFFECT OF *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera) ON THE CONTENT OF PYRROLIZIDINE ALKALOIDS IN *Crotalaria nitens* (Fabaceae family).

**AUTHOR:** Yesica Bautista Correa\*\*

**Key words:** Herbivory, *Crotalaria*, pyrrolizidine alkaloids, GC-MS, LC-MS.

Plants of the genus *Crotalaria* synthesize pyrrolizidine alkaloids as secondary metabolites to defend themselves from herbivore insect attacks. Pyrrolizidine alkaloids are hepatotoxic and neurotoxic molecules. The caterpillars of the genus *Utetheisa* feed on *Crotalaria* in order to acquire these alkaloids as a defensive strategy against their predators. The insect attack on leaves is known as herbivory. The objective of this research was studying the effect of the herbivory of *U. ornatrix* on the content of pyrrolizidine alkaloids (PA) in *Crotalaria nitens*. The methodology utilized the matrix solid phase dispersion technique as extraction method and gas chromatography coupled to mass spectrometry and liquid chromatography coupled to mass spectrometry with *Orbitrap* detector as extraction method. Four pyrrolizidine alkaloids were identified in leaves, seeds and roots of *C. nitens*, namely: monocrotaline, crispatine, integerrimine and 9-angeloylretronecine and their respective *N*-oxides. The concentration of PA in flowers, mature and green seeds, apical and basal leaves and roots was 0,90; 6,00 and 0,30; 0,05 and 0,30 and 0,30 mg/g total PA respectively. Under these conditions no significant changes occurred in the concentration of pyrrolizidine alkaloids in leaves and roots of *C. nitens* under herbivory. However, a significant decrease was observed in the height (25 %) and leaf area (60 %) of the plants under attack.

---

\*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.

## Introducción

La interacción planta–insecto ha sido un fenómeno de interés científico que ha permitido estudiar procesos de coevolución con base en la comunicación entre especies por medio de sustancias químicas (Cortez V, 2013, p.16). El género *Crotalaria* (Fabácea) tiene unas 1415 especies descritas, de las cuales 680 están aprobadas, 89 han sido reportadas para América (Flores *et al.* 2009, p.459). y 19, para Colombia (Bernal Y, 1986, p.3). Las especies del género *Crotalaria* se usan en la agricultura como fijadoras de nitrógeno y como abono orgánico para control de nematodos (Sancho F, *et al.* 1997, p.111). Sin embargo, la planta produce alcaloides pirrolizidínicos (PA), al parecer, como mecanismo de defensa ante el ataque de insectos (Sepúlveda G, *et al.* 2003, p.355). El ataque de un herbívoro sobre una planta se conoce como herbivoría y es uno de los tipos de interacción planta–insecto más común. A pesar de que los PA han demostrado toxicidad en aves y mamíferos (Céspedes A, *et al.* 2003, p.41), la oruga *Utetheisa ornatix*, uno de los insectos que consume *Crotalaria*, aprovecha los PA para protegerse de sus propios depredadores, sintetizar feromonas de atracción o proteger sus huevos (Gonzales A, 1999, p.5570). La interacción planta-insecto es un proceso relacionado con la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa natural que las plantas poseen para defenderse de herbívoros (Camarena G, 2009, p.81). Estas interacciones pueden aprovecharse como una estrategia de control de plagas en cultivos de interés comercial, para eliminar o sustituir el uso de pesticidas tóxicos para la salud humana y para los ecosistemas (Suquilanda M, 1996, p.185). Sin embargo, la implementación de esta estrategia ha tenido limitaciones. Aún no se conoce completamente el papel que juegan algunos metabolitos secundarios en las interacciones de las plantas con su entorno. Por lo tanto, en este trabajo, se estudiará la variación en el contenido de PA inducida por la interacción entre *Crotalaria nitens* y las orugas de *U. ornatix*.

En este trabajo, se realizó una recolección de semillas de *C. nitens* que crecen naturalmente en Santander, Colombia, con el fin de propagarlas en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, ubicado en la Universidad Industrial de Santander en Bucaramanga. Las plantas se aislaron para evitar interacciones con otros insectos, que

podieran alterar el experimento. A los 43 días de germinación, la planta fue expuesta al ataque de la oruga *U. ornatix*. El cambio en el contenido de alcaloides producidos se midió usando el método de extracción de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés), seguido del análisis de los PA por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector *Orbitrap* (LC-*Orbitrap*-MS).

No se encontró variación significativa de la concentración de PA después del ataque en hojas y raíces de *C. nitens*, pero sí se observó la disminución de la altura y del área foliar de las hojas atacadas. Se identificaron cuatro alcaloides pirrolizidínicos principales en hojas, semillas y raíces de la planta: monocrotalina, crispatina, integerrimina y 9-angeloilretronecina y sus respectivos *N*-óxidos. La concentración de PA en flores, semillas maduras y verdes, hojas apicales y basales y raíces fue: 0,90; 6,00 y 0,30; 0,30 y 0,05 y 0,30 mg/g PA totales, respectivamente.

El trabajo se encuentra dividido en cuatro capítulos: 1. Cienciometría; 2. Marco teórico; 3. Parte experimental y 4. Análisis y discusión de resultados, con un total de 30 figuras, 11 tablas y 124 referencias bibliográficas. Los resultados de este trabajo de investigación se divulgaron en los siguientes congresos a saber: I Encuentro Académico-Científico Nacional de la Facultad de Ciencias UIS. (Bucaramanga, noviembre 2015); V Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales (Barranquilla, agosto 2016) y V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, XII Congreso Colombiano de Fitoquímica, VIII Congreso Colombiano de Cromatografía (Bogotá, abril 2016).

La fase de prospección se realizó, según el “Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica N° 101”, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM. Este trabajo hizo 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 y 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.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo general

Estudiar el efecto que causa la herbivoría de *U. ornatix* sobre el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en *Crotalaria nitens*, mediante la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida y análisis por cromatografía líquida y gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

### 1.2 Objetivos específicos

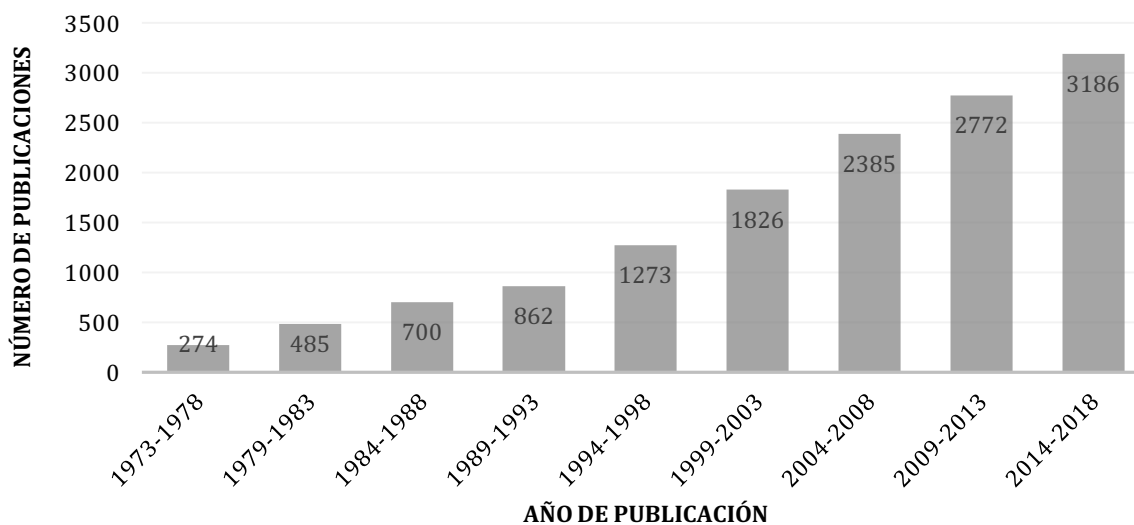
- Establecer condiciones favorables para el experimento de herbivoría.
- Extraer los alcaloides pirrolizidínicos de plantas de *C. nitens* mediante dispersión de la matriz en fase sólida MSPD antes y después de la herbivoría.
- Analizar los extractos MSPD mediante GC-MS y LC-*Orbitrap*-MS.

## 2. Marco de referencia

### 2.1 Antecedentes

El número de publicaciones sobre el tema de interés se obtuvo usando la base de datos *Scopus* (Elsevier). La búsqueda se dividió en tres temas principales: (1) herbivoría, (2) herbivoría en *Crotalaria* y (3) alcaloides pirrolizidínicos en *Crotalaria*.

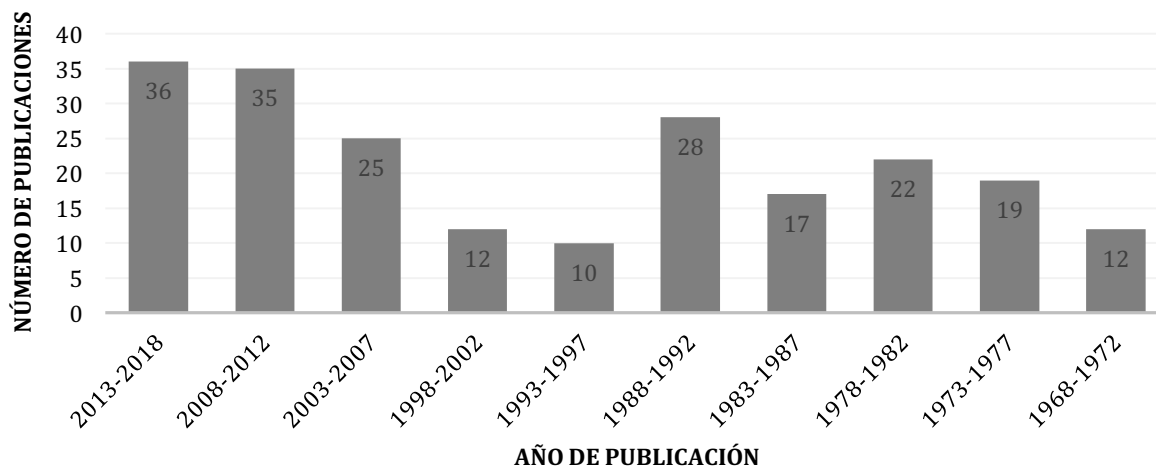
En la **Figura 1**, se muestra el número de publicaciones relacionadas con el tema “Herbivoría”, durante 1973–2018. La mayoría de artículos se publicaron durante los años 2000-2018. En el periodo de observación consultado, se hallaron, en total, 16870 artículos relacionados. También, se encontraron algunos libros que se dedican específicamente al tema: “*The dynamics of animal-plant interactions*”, de MJ Crawley, 1983, “*Insect Herbivory*”, de I.D. Hodkinson, 1982, “*Induced Plant Resistance to Herbivory*”, de Andreas Schaller, 2010, entre otros.



**Figura 1.** Relación de publicaciones según año. Fecha de consulta: 18 de diciembre de 2017. Fuente: *Scopus* (Elsevier). Periodo de observación: 1973-2018. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: “Herbivory”.

Con la segunda ecuación de búsqueda, “*Herbivory in Crotalaria*”, se encontraron apenas siete publicaciones. En este campo, la literatura es escasa; los artículos publicados son recientes (2009–2016), pero no tratan puntualmente sobre experimentos de herbivoría controlada. El artículo que más se aproxima al tema es una investigación realizada por Cogni y Futuyma, 2009, p.494. Los investigadores observaron que la adaptación de *C. pallida* y de las orugas de *U. ornatix*, no tiene una relación directa con la escala espacial en la que se encuentren distribuidas las plantas, y concluyeron que la supervivencia de la planta no se ve afectada por la interacción con la oruga. La búsqueda se realizó el 22 de enero del año 2018, el periodo de observación fue de 2009-2018, aunque no hubo publicaciones en 2017, tampoco en 2018.

Aunque la presencia de PA en *Crotalaria* ha sido objeto de investigación desde 1935, cuando se reportó por primera vez el aislamiento del principio tóxico (monocrotalina) en *C. spectabilis* (Neal *et al.* 1935, p.2560), la búsqueda “Alcaloides pirrolizidínicos en *Crotalaria*” se limitó al periodo de observación de 1968-2018, debido al bajo número de publicaciones en años anteriores; se encontraron un total de 225 publicaciones (Véase **Figura 2**). El año en que más se publicó sobre este tema fue 2013, en total 14 publicaciones. Los artículos más relevantes hallados, usando esta ecuación de búsqueda, fueron aquellos que describen la ocurrencia de PA, según la especie de *Crotalaria* y su lugar de origen, como es el caso del artículo publicado por Williams, 1987, p.36, en el que se analizaron los PA en 35 especies de *Crotalaria*; Asres *et al.* 2004, p 915, estudiaron 12 especies de *Crotalaria* en Etiopia; Fletcher *et al.*, 2008, p.311, hicieron un estudio similar en 28 especies de *Crotalaria* en Australia, y el mismo número de especies, se analizaron por Flores y col. en Brasil, 2009, p.459. Por otro lado, Álvarez T, 2003, p.35, estableció los niveles de alcaloides pirrolizidínicos en plantas de *C. retusa* y *C. nitidula* bajo condiciones de estrés hídrico y por herbivoría, concluyendo que, *C. retusa* presentó mayor variabilidad y mayor concentración de PA respecto a las plantas de *C. nitidula* bajo las condiciones de estrés a las que se sometieron.



**Figura 2.** Relación de publicaciones por año. Fecha de búsqueda: 18 de diciembre de 2017. Fuente: *Scopus* (Elsevier). Período de observación: 1968-2016. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: “*Crotalaria pyrrolizidine alkaloids*”

De acuerdo con la bibliometría realizada, hay muchas investigaciones en el campo de la interacción planta-insecto, pero, no existen estudios de herbivoría controlada en plantas de la especie *C. nitens* con orugas de la especie *U. ornatrix*. Por otro lado, a pesar de que las plantas del género *Crotalaria* han sido estudiadas en diferentes partes del mundo, ninguno de los artículos publicados describe el perfil de PA presente en hojas y raíces de la planta de *C. nitens*, ni como varía su concentración debido al ataque con orugas de *U. ornatrix*.

## 2.2 Marco teórico

**2.2.1 género *Crotalaria*** El género *Crotalaria* (Fam. Fabácea) es propio de los trópicos y sub-trópicos de todo el hemisferio sur, se encuentra concentrado en África y Madagascar, aunque, actualmente, una cantidad apreciable de especies originarias se ha encontrado en el centro y norte de Suramérica (Cortéz V, 2013, p.16).

Existen alrededor de 1415 especies descritas, de las cuales solamente 680 están aprobadas, 500 son de origen africano y alrededor de 89 se conocen en América y 19, en Colombia, (Cortéz V, 2013, p.16; Bernal Y, 1986, p.93). Los nombres comunes para *Crotalaria* en Colombia son: matraca, sonajuelas y cáñamo de la India. El género *Crotalaria* pertenece al reino Plantae; división Magnoliophyta; clase Fabales; orden Magnoliopsida; familia Fabáceae (Miller R, 1967, p.205). La especie insignia de esta planta es la *Crotalaria lotifolia* L., que fue descrita por Carlos Linneo, y publicada en su obra “Species Plantarum” en 1753 (Linneo C, 1958, p.169).

Las especies de este género se utilizan principalmente en la agricultura. Las raíces de la planta forman nódulos en una relación simbiótica con bacterias beneficiosas, que fijan nitrógeno atmosférico al suelo, protegiéndolo de la erosión y generando una gran cantidad de biomasa en poco tiempo, lo que la convierte en un excelente cultivo de cobertura para la recuperación de suelos. También, se le conoce desde la antigüedad por sus fibras, que son fuertes, aun cuando se mojan, resistentes a los hongos, la humedad y al agua salada. La fibra de *Crotalaria*, sobre todo de aquella proveniente de la especie *C. juncea* se usa para elaborar cordón, alfombras, papel, redes de pesca, sacos, lona y medios de siembra, entre otros (Carreras M *et al.* 2001, p.45). Otras especies como *C. mucroneata*, *C. striata* y *C. retusa*, son usadas principalmente para ornamentación y forraje (Fischler M, 1999, p.1926).

Las plantas del género *Crotalaria*, son hierbas perennes que alcanzan entre 1,2 y 2,6 m de altura, poseen hojas simples cuyo tamaño puede variar dependiendo de la especie, sus inflorescencias se desarrollan en el ápice de la planta, las flores son de color amarillo; las semillas se desarrollan dentro de una vaina en la cual sufren el proceso de maduración (Fischler M, 1999, p.1926).

El género *Crotalaria* y el género *Senecio* son reconocidos por la capacidad de síntesis y almacenamiento de alcaloides pirrolizidínicos (moléculas tóxicas) en hojas, semillas y raíces de un gran número de sus especies (Adams R *et al.* 1973, p.1926). Un estudio realizado en Sur África demostró que la especie *C. burkeana*, al ser consumida por el ganado produce una enfermedad conocida como “crotalismo”, caracterizada por la inflamación de las membranas alrededor de los cuernos del ganado [Atal C, *et al.*, 2003, p.12). En Jamaica, la especie *C. dura*, al ser consumida por el ganado y por los caballos, contribuía significativamente, en animales, al desarrollo de cirrosis y problemas pulmonares (Sippel W, 1964, p.562). En Colombia existen estudios que reportan intoxicación masiva de aves, cabras, y ganado, en general, debido al consumo de semillas o material vegetal de diferentes especies de *Crotalaria*, entre ellas las especies *C. retusa*, *C. pallida*, entre otras (Stashenko E, 2011, p.41; Villar, D, 2007, p.22).

La intoxicación por PA se ha presentado también en seres humanos. Un estudio realizado por Dübecke, A *et al.*, en 2011, p.348, demostró que los PA no solo están en los tejidos de la planta de *Crotalaria*, sino que se encuentran también en el polen, lo que explica su presencia en las mieles clasificadas como aptas para el consumo humano; Kempf *et al.*, en 2011, p.332, analizaron muestras de miel en Alemania e identificaron tres tipos de alcaloides pirrolizidínicos: equimidina, licopsamina y *N*-óxidos de licopsamina, provenientes de distintas especies de *Eupatorium* spp. Sin embargo, no todas las especies de *Crotalaria* son tóxicas. La especie *C. juncea*, por ejemplo, se clasifica como una especie inofensiva; esta característica se asocia con la concentración baja de alcaloides pirrolizidínicos en los tejidos de la planta (White G, 1965, p.175).

#### **2.2.2.1 *Crotalaria nitens***

*C. nitens*, es una especie del género *Crotalaria* cuya distribución se extiende desde América Central hasta América del Sur. Esta especie se ha encontrado en México, Ecuador Bolivia, Brasil y Colombia (Windler D, 1974, p.151).



**Figura 3.** *Crotalaria nitens*. Fuente: Fausto Prada. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga-Santander, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2016.

En Colombia, *C. nitens* ha sido identificada en departamentos como Amazonas, Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Chocó, Cundinamarca, Huila, Nariño, Santander, Tolima y Valle del Cauca (Salazar M, 2008, P.2008). Sin embargo, se presume que la planta es nativa de la Amazonía de Brasil (Flores S, 2008, p.477). En la **Tabla 1**, se puede observar la taxonomía de la planta.

**Tabla 1.**

*Identificación taxonómica de la especie bajo estudio.*

<b>Reino</b>	Plantaeae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Fabales
<b>Orden</b>	Magnoliopsida
<b>Familia</b>	Fabaceae
<b>Género</b>	<i>Crotalaria</i>
<b>Especie</b>	<i>nitens</i>

*C. nitens* es una planta leguminosa anual, posee tallos fibrosos erectos de 1,3 a 1,5 m de altura; sus flores son de color amarillo y se desarrollan en el ápice de la planta; sus

semillas se desarrollan en una vaina y germinan en periodos cortos de tiempo (2-3 días); posee raíces cortas de un radio que va de 20 a 30 cm [Bernal Y, 1986, p.57).

Los reportes en la literatura sobre esta especie son escasos; los estudios más significativos fueron realizados por D. J. Pilbeam *et al.*, 1983, p.601, quienes encontraron monocrotalina en las semillas de esta planta; Chennaveeraiah *et al.*, en 1971, p.73, estudiaron el cariotipo de ocho especies de *Crotalaria*, incluida *C. nitens*, definiéndola como una especie primitiva debido a que sus cromosomas son simétricos y poseen centrómeros medianos.

**2.2.2 Género *utetheisa*** Las polillas del género *Utetheisa* se caracterizaron por primera vez en 1758 por Carlos Linneo (Da Costa M, 2007, p.94). Las polillas de este género se caracterizan por sus colores brillantes con tonos naranjas, blancos y rojos (Quiroz A, 1978, p.555). El género se encuentra distribuido en el Este y Oeste Medio de Estados Unidos, y en toda la zona del neotrópico (Karsholt O, 1996, p. 91). La polilla tiene un tamaño mediano con una envergadura alar que varía entre 29 y 42 mm. La oruga es de color negro con franjas de color amarillo o blanco en posición dorsal y lateral, posee microvellosidades y puede alcanzar hasta los 35 mm de largo. Las crisálidas son pequeños ovillos de seda de color negro con algunos puntos naranjas vistosos [Signoretti A, et al., 2008, p. 447)]. Estudios realizados en diferentes especies de este género demuestran que sus colores llamativos están relacionados con el contenido de sustancias tóxicas almacenadas como protección contra posibles depredadores (Quiroz A, 1978, p.555; Karsholt O, 1996, p.91; Signoretti A, et al., 2008, p.447)

### **2.2.2.1 *Utetheisa ornatrix***

Carlos Linneo, quien caracterizó por primera vez las polillas de este género, las clasificó en dos especies, la especie *Phalaena ornatrix*, que designó a los especímenes de polilla con colores pálidos; y la especie *Utetheisa bella* correspondiente a los especímenes de polilla con colores brillantes y rosados. Sin embargo, en 1960, Forbes p. 187,] unió tanto la

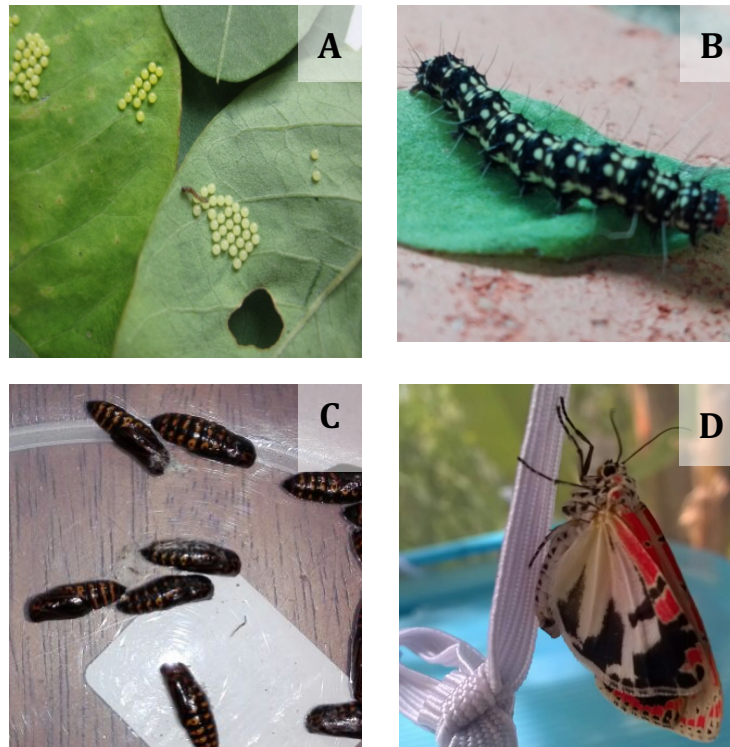
especie, *Phalaena ornatix* como *Utetheisa bella*, en la especie conocida como *Utetheisa ornatix*. En 1966, Pease Jr., p.719, determinó mediante diagnóstico genético que cualquier diferencia fenotípica entre las especies estaba basada en la variación inter-específica debido a diferencias geográficas, por lo que se corroboró que había una sola especie, dándole la razón a Forbes. En la **Tabla 2** se observa la taxonomía de *U. ornatix*.

**Tabla 2.**

*Identificación taxonómica de la especie Utetheisa ornatix.*

<b>Reino</b>	Animalia
<b>División</b>	Arthropoda
<b>Clase</b>	Insecta
<b>Orden</b>	Lepidóptera
<b>Familia</b>	Erebidae
<b>Género</b>	<i>Utetheisa</i>
<b>Especie</b>	<i>Ornatix</i>

La presencia de esta especie se ha hecho notoria en el Este y Oeste Medio de Estados Unidos, y en toda la zona del Neotrópico (Karsholt O, 1996, p.91); se diferencia de la mayoría de especies de polillas, en que es diurna y de colores llamativos. En su estado larval, puede llegar a medir alrededor de 30-35 mm, como se observa en la **Figura 4**. Su ciclo biológico desde larva hasta el paso a adulto, tarda alrededor de 36 días (Luna L, 2009, p.79). La polilla pone sus huevos en el envés de la hoja de la planta, la eclosión del huevo tarda entre 3 y 3,5 días; cuando el huevo eclosiona, las orugas se mueven hacia las inflorescencias de la planta perforando el estandarte y la quilla de la flor; se considera que esta es la manera de protegerse de sus enemigos naturales; cuando no hay inflorescencias, se mueven hacia las hojas tiernas de la planta y allí se hospedan (Sourakov A, 2013, p.344).



**Figura 4.** *Utetheisa ornatrix* en sus fases de crecimiento. **A.** Huevos; **B.** Oruga; **C.** Crisálida; **D.** Polilla. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga-Santander, Colombia. Fecha: 14 de junio de 2017.

Conner et al, 1981, p.227, determinaron que la producción de feromonas (hidroxidanaidal) en machos de *U. ornatrix* está relacionada directamente con su dieta, cuando se encuentra en estado larval, y ocurre, únicamente, cuando dicha dieta contiene alcaloides pirrolizidínicos, lo que explica que se alimente de *Crotalaria*. Según Storey, G. K. 1991, p.687, la especie *U. ornatrix* usa los PA en su fase oruga para prevenir el ataque de predadores; mientras que en fase polilla, las hembras usan los PA para transmitirlos a los huevos para su protección.

**2.2.3 Interacción planta – insecto** La relación planta-insecto puede tener la misma edad que poseen ambas especies en este planeta. Las primeras observaciones científicas se atribuyen a Erasmus Darwin, abuelo de Charles Darwin, quien centró sus investigaciones en la estrecha y curiosa relación morfológica entre los abejorros y las llamativas flores de las orquídeas en el proceso de polinización (Dirzo R, 2009, p.587). Los científicos que sucedieron a Erasmus, bautizaron a este mecanismo de interacción como proceso de “coevolución” (Benson W, 1975, p.659). Feinsinger, 1983, p.282 afirmó que en el proceso de coevolución, las partes que intervienen aportan por igual al proceso evolutivo y que, genéticamente, ambas partes intervienen en igual magnitud, de manera que ninguna puede considerarse dominante o dominada. Sin embargo, Jolivet, 1986, p.187, observó, después de varios experimentos, que los insectos, en términos ecológicos, muestran una superioridad relativa sobre las plantas, marcando así una diferencia entre los procesos ecológico y genético. Carius *et al.*, 2001, p. 1136, dieron una definición concreta al término coevolución, así: “*Cualquier asociación en la que haya interacción de evolución recíproca entre los miembros, ya sea, predador-presa, planta-patógeno, planta-polinizador, parásito-hospedero, entre otros, se conoce como coevolución*”. Según Roughgarden, 1976, p.388, un proceso coevolutivo se caracteriza por conducir a las poblaciones involucradas hacia cambios morfológicos, estructurales o mutaciones que amplíen las formas de interacción, haciendo que la selección de las especies involucradas en el proceso permita obtener un beneficio mutuo.

La interacción planta-insecto, se consideró al principio, como un proceso de selección natural; sin embargo, se ha demostrado que este proceso de selección depende de una fuerza, denominada fuerza selectiva [54]. Autores como Slatkin *et al.*, 1970, p.87, afirman que esta fuerza selectiva se da a nivel del fenotipo de las especies, es decir, a través de similitudes morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, Fenny, 1975, p.87, asegura que la interacción entre plantas e insectos es posible gracias al intercambio de sustancias químicas entre ellos, y que estas sustancias pueden ser las encargadas tanto de llamar a los polinizadores, como de defender a la planta de los ataques, lo que dio un nuevo rumbo a la investigación sobre la interacción planta-insecto. Dichas sustancias se denominaron metabolitos secundarios, es decir, sustancias elaboradas por las plantas que no parecen

cumplir una función directa en fotosíntesis, procesos respiratorios, asimilación de nutrientes o en la síntesis de macromoléculas, metabolismo primario (Croteau *et al.*, 2000, p.1250) aunque sí parecen ser mecanismos de defensa directos e indirectos de las plantas.

### ***2.2.3.1 Herbivoría***

La relación específica entre plantas y animales (herbívoros o insectos) que se alimentan de plantas es conocida como herbivoría; la herbivoría se considera una interacción inter-específica, es decir, una interacción en la que participan dos o más organismos de diferentes especies, que tienen en común la necesidad de supervivencia y evolución (Jolivet, 1986, p.189). Dentro de la teoría de la coevolución, la herbivoría se considera como un fenómeno decisivo en el proceso evolutivo de la planta, ya que determina su éxito adaptativo (Westoby M, *et al.*, 2002, p.125); ello implica que la planta debe ser capaz de desarrollar un medio de defensa para sobrevivir y, además, debe adaptarse a las condiciones naturales que podrán contemplarse a favor o en contra de su preservación (Dalín P *et al.*, 2008, p.89). La herbivoría es una lucha natural constante por la supervivencia entre las especies y es una de las principales causas del 50% de la biodiversidad en el mundo (Westoby M, *et al.*, 2002, p.126; Dalín P *et al.*, 2008, p.100).

Se ha observado que, después de un ataque, la planta sufre procesos biológicos y químicos significativos: despolarización de la membrana, producción de especies reactivas de oxígeno, activación de inhibidores de proteínasa o síntesis y liberación de metabolitos secundarios tóxicos, todo esto con el fin de defenderse y sobrevivir (Mithofer *et al.*, 2009, p.261; Doss R, *et al.*, 2000, p.6218).

Según Camarena G, 2009, p.82, una planta atacada por un herbívoro en alguno de sus tejidos, no tiene la posibilidad de movilizar células para sanar las heridas, como en el caso de los mamíferos, por lo que la planta ha desarrollado diferentes estrategias de defensa ante la mordedura de un insecto. La más llamativa de estas estrategias es la bioquímica, que consta de la habilidad que desarrolló la planta para que cada célula pueda ser competente para activar respuestas de defensa. Según Bowles, 1990, p.873, el ataque por herbivoría

activa un conjunto de respuestas que incluye la generación o liberación, percepción y transducción de señales específicas, que después activan los genes de defensa relacionados directamente con la aparición de heridas causadas por el atacante. (Wagner, 1991, p.675).

**2.2.4 Mecanismos de defensa de la planta.** Según Wink, 1999, p. 374, los mecanismos de defensa de las plantas ante los ataques por herbivoría, se pueden clasificar en constitutivos o inducidos.

#### ***2.2.4.1 Mecanismos constitutivos***

Los mecanismos constitutivos tienen que ver con la aparición de estructuras o cambios evolutivos físicos que se encuentran presentes todo el tiempo en las plantas, entre ellos; la presencia de espinas, el engrosamiento de las paredes celulares, la acumulación y secreción de resinas, la presencia de tricomas en distintos tejidos de las plantas en los cuales se acumulan sustancias tóxicas para alertar a los atacantes (alcaloides, glucosilatos, etc.), entre otros (Reichelt M, 2002, p.663; Dirzo R, 1995, p.304)

#### ***2.2.4.2 Mecanismos inducidos***

Los mecanismos inducidos, por su parte, son aquellos que solamente están presentes en periodos específicos durante el ataque (Croteau R, *et al.*, 2000, p.1215). En general, el mecanismo de defensa inducido implica la síntesis y la acumulación de metabolitos secundarios, que, a su vez, pueden considerarse mecanismos de defensa directos o indirectos, ya que influyen en la repelencia de los insectos atacantes, o en la atracción de insectos predadores del atacante (Rosenthal G, 2012, p. 291). Por otro lado, pueden influir en el desarrollo biológico de la planta, ya que pueden inhibir su crecimiento e inclusive activar inhibidores de proteínasa y polifenol oxidasas que actúan sobre las enzimas digestivas de los insectos (Wink, 1999, p.374).

Según Wink, 1999, p.374, si la defensa constitutiva no basta para proteger a la planta de los posibles ataques de insectos, la planta mediante el reconocimiento de

inductores presentes en las secreciones orales de los insectos tales como la glucosa oxidasa, la  $\beta$ -glucosidasa y la fosfatasa alcalina, caeliferinas, entre otras, activarán los mecanismos de defensa inducidos en pro de su conservación y supervivencia.

**2.2.5 Metabolitos secundarios.** El metabolismo secundario es el conjunto de reacciones en el que intervienen productos o subproductos de rutas del metabolismo primario (glucólisis, ciclo de Krebs, etc.), en la síntesis de moléculas asociadas a posibles mecanismos de defensa contra predadores o de atracción de polinizadores en las plantas (Castellanos I, 1997, p.591). Actualmente, existen más de 100000 moléculas reconocidas como metabolitos secundarios de las plantas (Edwards R, 1999, p.384). Unas son producidas específicamente por alguna especie y, otras, se consideran características de un género e incluso de una familia (Facchini P, 2001, p.39).

Los metabolitos secundarios asociados a herbivoría pueden clasificarse en dos grandes grupos: nitrogenados y no nitrogenados. Dentro del grupo de los nitrogenados se encuentran los alcaloides, los aminoácidos no protéicos, las aminas, los glucósidos cianogénicos y los glucosinolatos; mientras que dentro de los no nitrogenados se encuentran los terpenoides, los poliacetilenos, los policétidos y los fenilpropanoides (Wink M, 1999, p.17). La síntesis de estas moléculas puede realizarse en órganos específicos de la planta, o en cada uno de ellos, depende de la etapa de crecimiento de la planta (Roberts M, 2013, p.493). Su transporte puede realizarse vía floema o xilema, y la variación en la concentración de los niveles constitutivos de estas moléculas en la planta está asociada a la respuesta de la planta debida a estrés biótico (herbivoría) o abiótico, es decir, daño mecánico (McNaughton S, 1983, p.657).

#### ***2.2.5.1 Alcaloides***

Los alcaloides son moléculas sintetizadas, principalmente, a partir de aminoácidos como el triptófano, la tirosina, la fenilalanina, la lisina, la arginina y la ornitina, aunque también pueden provenir de acetatos de policétidos (Baldwin I, 1993, p.1143). Los alcaloides se clasifican de diversas formas, una de ellas es con base en su estructura química, según esta

característica, los alcaloides se clasifican en: A. Alifáticos; B. Aromáticos y C. De origen diverso (Levin D, 1978, p.61). Dentro de los alifáticos, se encuentran derivados de la ornitina y de la lisina; los de origen diverso, corresponden a los terpénicos y esteroidales, purinas, macrociclos, etc; mientras que dentro de los de origen aromático, se encuentran derivados del ácido nicotínico, la fenilalanina y la tirosina, derivados del triptófano y derivados de la histidina (Fu, P *et al.*, 2004, p.155).

Los alcaloides son moléculas heterocíclicas nitrogenadas. Su similitud química con las moléculas que participan en la transmisión de señales del sistema nervioso los convierte en moléculas potencialmente tóxicas, ya que tienen la capacidad de bloquear neuroreceptores de transducción de la señal neuronal y canales iónicos de vertebrados e insectos (Fu, P *et al.*, 2004, p.155).

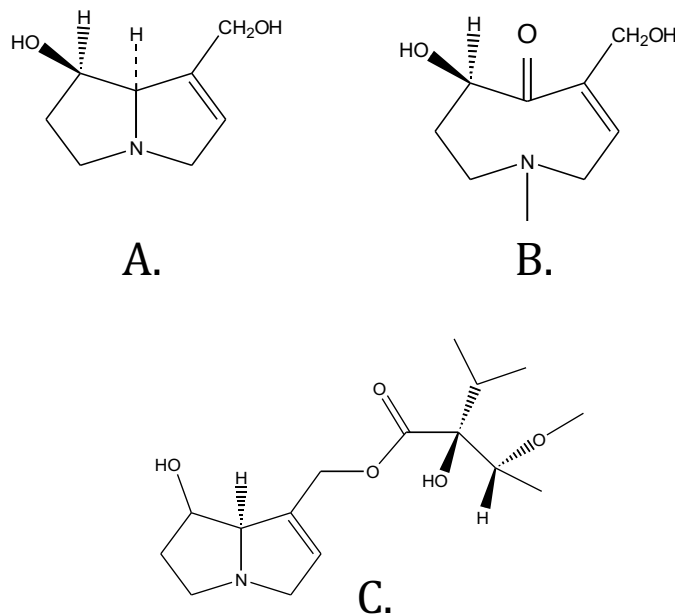
Los alcaloides considerados metabolitos secundarios son los isoquinolólicos, pirrolizidínicos, tropánicos e indólicos (Croteau R, 2000, p.1250). Según Baldwin, 1993, p.1143, la síntesis constitutiva de alcaloides en las plantas, aumenta como respuesta a una herida provocada por un depredador. Dependiendo de la planta, los alcaloides pueden sintetizarse y almacenarse en la vacuola o en los plástidos.

#### ***2.2.5.2 Alcaloides pirrolizidínicos***

Los alcaloides pirrolizidínicos son metabolitos secundarios nitrogenados, producidos y utilizados por plantas de diferentes familias como herramienta de defensa contra los herbívoros que buscan devorarlas (McLean, 1970, p.429). La aparición de PA en plantas, es característica de pocas familias botánicas no relacionadas. Los PA son especialmente abundantes en plantas de familias Asteráceas, Boragináceas y Fabáceas (Wink M, 1995, p.139).

El nombre de estos compuestos fue propuesto por W. Meissner, farmacéutico alemán, que describió a los PA como sustancias de origen vegetal con propiedades alcalinas debido a la presencia de un nitrógeno amínico en su estructura química (Wiedenfield, 2008, p.19).

La molécula de PA comprende un heterociclo pirrolizidínico, con un grupo metílico y dos sustituyentes hidroxilo, (Macel M, 2004, p.865), véase la estructura A en la **Figura 5**.



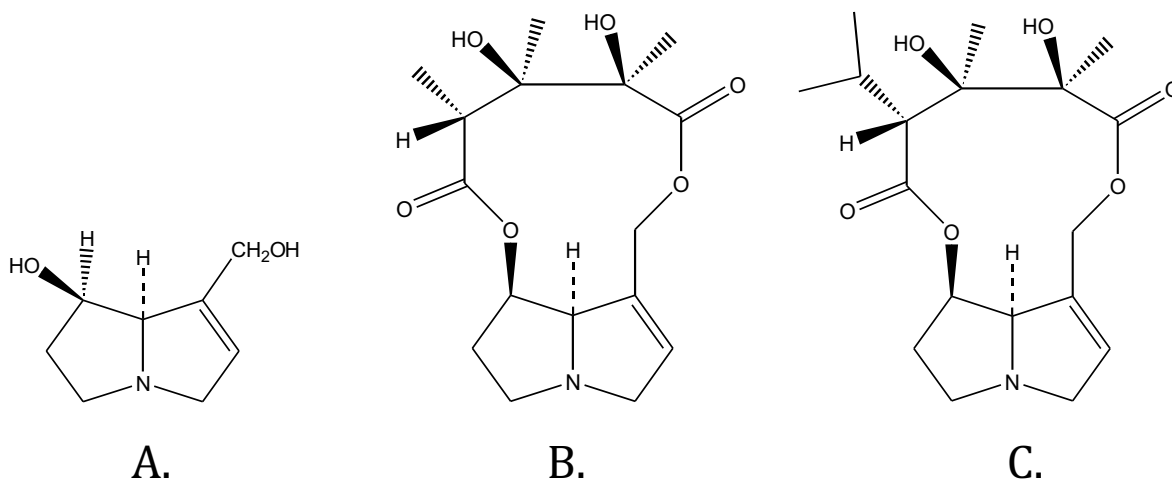
**Figura 5.** Estructura general de los alcaloides pirrolizidínicos: **A.** Retronecina; **B.** Otonecina; **C.** Heliotridina.

Teniendo en cuenta las posibles combinaciones e isomerías químicas de estas estructuras, podría haber más de 600 diferentes alcaloides pirrolizidínicos; hasta el momento, se han identificado más de 350 en distintas plantas de todo el mundo (Hartman, *et al.*, 1989, p.98).

La estructura de los PA varía ampliamente, lo que depende de factores relacionados con la especie analizada, las condiciones climáticas del cultivo, el período de muestreo y la parte de la planta de la cual son extraídos (Asres K, 2004, p.915).

En el caso de las plantas de *Crotalaria* spp., los principales PA son la monocrotalina, la retronecina y la tricodesmina. En la **Figura 6**, se presentan las estructuras

de algunos PA típicos, encontrados en plantas de *Crotalaria* (Dubecke A, 2011, p.348; Windler D, 1974, p.175).

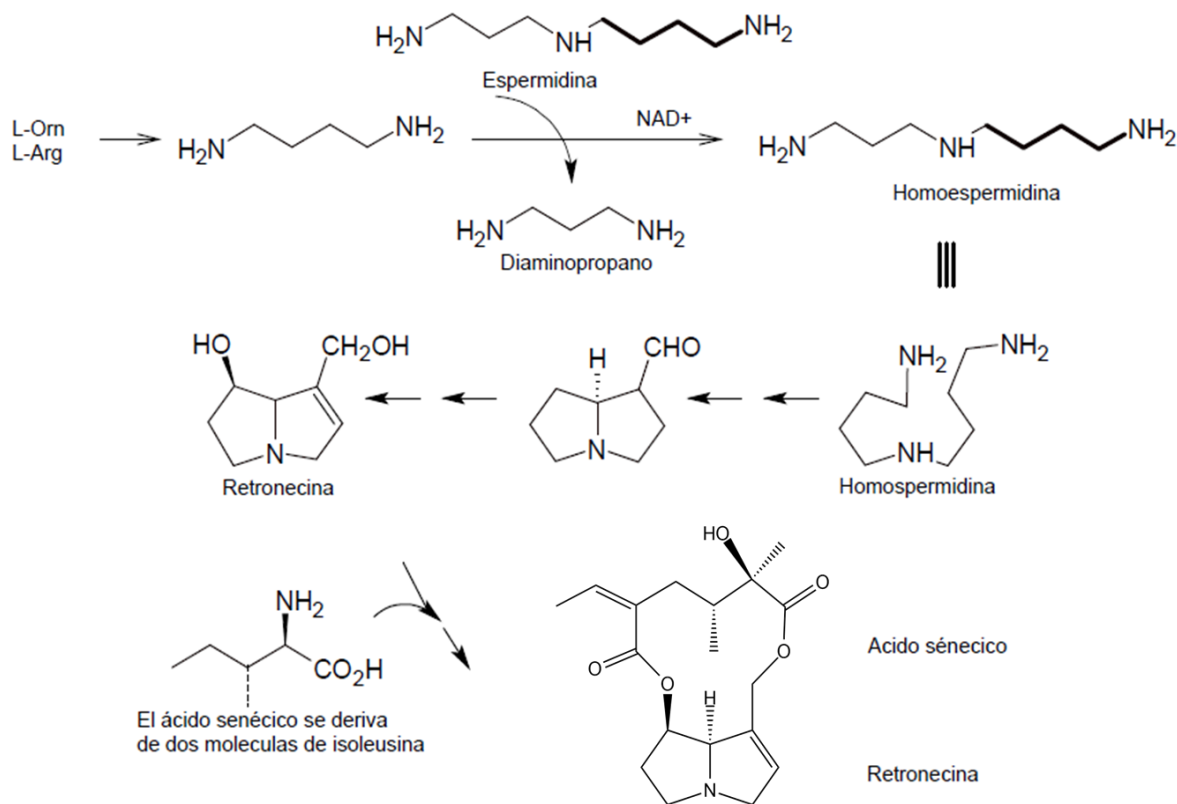


**Figura 6.** Estructuras moleculares de algunos PA comunes en plantas de *Crotalaria*: **A.** Retronecina; **B.** Monocrotalina y **C.** Tricodesmina.

El análisis de PA en diversas especies de las familias botánicas que los contienen, ha demostrado que los PA se encuentran, también, en su forma de *N*-óxidos (PANO) en las plantas (Kutchan, 1995, p.1059). Los PANO son *N*-óxidos de amina menos tóxicos que las bases, PA, y tienen una polaridad mayor. Según Macel, M, 2004, p.865, la polaridad de los PANO facilita su transporte a los demás tejidos de la planta y una vez almacenados en las células de los tejidos de la planta, el enlace N-O es reducido y el alcaloide pasa a su forma base.

La biosíntesis de los PA y PANO en las plantas comienza con la síntesis de su base estructural, la necina (Mattocks A, 1986, p.175). El estudio realizado por Hartmann y col. en 1989 (Hartman, *et al.*, 1989, p.98), en plantas de *Senecio vulgaris*, demostró mediante análisis con marcaje isotópico, que la base necínica característica de los PA proviene de la arginina o de la ornitina, mientras que la parte ácida de la molécula proviene de la isoleucina. La unión de moléculas de putrescina conforma la homoespiridina por medio de la acción de la homoespiridina sintetaza, que cataliza la transferencia del grupo amino

butilo a una segunda molécula de putrescina, dando lugar a la formación de la base necínica, tal como se observa en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Esquema general de la biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos (senecionina). Adaptado de: Hartman, *et al.*, 1989, p.98.

Una característica que distingue a los PA de otros metabolitos secundarios, es su toxicidad. Los PA que contienen en su esqueleto básico retronecina, otonecina y heliotridina (Véase **Figura 5**), son altamente tóxicos; su toxicidad se incrementa cuando un éster cíclico está presente en la estructura (Mattocks A, 1986, p.175). Sin embargo, los PA no son tóxicos por sí mismos, sino por los productos de su metabolismo, ya que se transforman a pirroles, por las enzimas hepáticas Citocromo, y son los pirroles los que causan daño a nivel cromosómico (Stegelmeier, *et al.*, 1999, p.175). El estudio de toxicidad de los PA sobre los vertebrados, demostró una actividad hepatotóxica alta, así como actividades neumotóxica y genotóxica en los insectos (Macel M, 2011, p.75). Kempf *et al.* en 2010, p. 158, determinaron los niveles de toxicidad de algunos PA (Véase **Tabla 3**).

**Tabla 3.***Dosis media letal de algunos PA.*

<b>Alcaloide pirrolizidínico</b>	<b>Dosis media letal, LD<sub>50</sub> (mg/kg peso corporal)</b>
Retrorsina	34
Senecionina	50-34
Lasiocarpina	72
Riddellina	105
Monocrotalina	175
Echimdina	200
Senkirkina	220
Heliotrina	300
Licopsamina	1500

**2.2.6 Métodos de extracción de alcaloides pirrolizidínicos.** Crews *et al.*, 2010, p.327, reportan las técnicas de extracción Soxhlet y extracción en fase sólida como las más usadas para la extracción de PA y PANO en plantas de diferentes géneros. También existen reportes sobre el uso de la técnica de extracción asistida por microondas (Jiang Z *et al.*, 2009, p.539) y la técnica de extracción asistida por ultrasonido (Altamirano, 2005, p.406). En el caso de la extracción Soxhlet, en donde la matriz es lavada continuamente con el solvente para disolver los analitos, se requieren volúmenes de superiores a los 200 mL por muestra y entre 12 y 24 horas de extracción (De Castro M, 1998, p.5); en el caso de la extracción asistida por microondas o ultrasonido, la relación muestra:solvente debe ser aproximadamente 1:3, es decir, que dependiendo del tamaño de la muestra se emplearán varios mililitros de solvente (Eskilsson, 2000, p.227; Vilku, 2008, p.161). Sin embargo, la extracción en fase sólida, a diferencia de las técnicas ya nombradas, requiere volúmenes de solvente menores (10-100 mL), esto se debe al uso de materiales sorbentes que permiten hacer extracciones selectivas (Thurman E, 1998, p.147). En el presente estudio, se propone el uso de la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) (Barker, 2000, p. 115), la cual usa diferentes materiales ad/absortivos para realizar extracciones selectivas y disminuir el uso de solventes y el tiempo de análisis.

### ***2.2.6.1 Dispersión de la matriz en fase sólida.***

La técnica de extracción MSPD, fue presentada por primera vez en 1989 por Barker, 2000, p.115. La técnica consiste en homogeneizar y extraer en un solo paso las moléculas de interés de una matriz biológica sólida, semi-sólida o viscosa. El proceso de homogeneización consiste en la maceración de la muestra con un soporte sólido de naturaleza química apropiada que actúa como medio dispersante de los compuestos presentes en la matriz. Los analitos de interés se extraen de la muestra homogeneizada mediante elución con un solvente o mezcla de solventes adecuados. La ventaja de esta técnica es que emplea cantidades muy pequeñas de muestra y de solventes y es un proceso de extracción muy rápido en comparación con la técnica clásica de extracción sólido-líquido Soxhlet (Stashenko E, *et al.*, 2010, p.33). Existen algunas desventajas inherentes a la técnica, por ejemplo, el desgaste que puede generarse sobre el soporte adsorbente al realizar la fuerza mecánica para garantizar la dispersión de las partículas de la muestra, o la posibilidad de que el soporte adsorbente sea soluble en el solvente o en la mezcla de solventes seleccionados, por lo que es necesario realizar pruebas preliminares o diseños experimentales en los que se compruebe la eficacia y eficiencia del método para el objetivo propuesto (Barker, 2000, p. 115).

**2.2.6 Análisis cromatográfico.** La cromatografía es una técnica de análisis empleada para la separación de mezclas en sus componentes individuales. La repartición de componentes entre las fases, una móvil y otra estacionaria, permite que, dependiendo de la naturaleza química tanto de las fases como de los componentes, y de algunas propiedades fisicoquímicas, separarlos (Skoog D, 1980, p.814).

### ***2.2.7.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas***

La cromatografía de gases (GC, *por sus siglas en inglés*) permite la separación de mezclas complejas de compuestos neutros, volátiles, termoestables y de bajo peso molecular (hasta

500 Da), gracias a la diferencia en los puntos de ebullición y la polaridad de los compuestos (Stashenko E, 2010, p.33).

La separación de los compuestos se lleva a cabo en una columna cromatográfica, a la que ingresan los analitos volatilizados provenientes del puerto de inyección (Stashenko E, 2009, p.26). Las columnas cromatográficas modernas se conocen como columnas capilares, son cilindros huecos de sílice fundida (de 10-60 m de longitud y de 0,20-0,53 mm de diámetro interno), cuya pared interna se encuentra recubierta por un material térmicamente resistente y de polaridad determinada, conocido como la fase estacionaria.

La interacción de los analitos con la fase estacionaria se da por medio de procesos de absorción y desorción (repartición). Para que ocurra la separación, cada compuesto presente en la mezcla debe interactuar de manera diferente con la fase estacionaria antes de eluir y ser detectado (Stashenko E, 2009, p.26).

La muestra se inyecta al puerto de inyección; los analitos se arrastran hasta el detector, los analitos por la fase móvil, que es un gas inerte, por ejemplo, helio (He), o nitrógeno (N<sub>2</sub>), que tiene como función transportar los compuestos a través de la columna y hacer posible su elución de ella (Stashenko E, 2010, p.33).

El tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y la detección de cada sustancia separada, se denomina tiempo de retención ( $t_R$ ), es el tiempo que tardan todos los analitos en atravesar la columna. Los  $t_R$  dependen de variables operacionales de cada análisis cromatográfico, por ejemplo, el flujo del gas de arrastre, la temperatura programada o el modo de inyección. El  $t_R$  de cada analito permite la determinación de su índice de retención lineal (IRL), parámetro utilizado para su identificación tentativa, que se compara con valores disponibles en la literatura y en bases de datos (Stashenko E, 2009, p.26).

El acoplamiento de la cromatografía gaseosa con la espectrometría de masas permite la identificación de un compuesto mediante la obtención de su espectro de masas. Un espectro de masas es un gráfico que muestra la abundancia relativa de iones que

resultan de la fragmentación de una molécula ionizada y que permiten establecer cómo ésta se disocia, lo que hace posible elucidar su estructura, y, por ende, facilitar su identificación (Stashenko E, 2009, p.26).

El acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas (GC-MS) facilita el análisis cualitativo e incluso cuantitativo de mezclas complejas. Al salir de la columna cromatográfica, las moléculas de la sustancia que eluye, atraviesan una interfaz que consiste en un tubo termostataado que evita su condensación, entran luego a la cámara de ionización, parte del espectrómetro de masas donde tiene lugar un proceso energético en el que gran parte de las moléculas se ionizan. Luego, los iones que se forman, se separan en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ), antes de llegar al detector y generar una señal (Stashenko E, 2010, p.33).

#### ***2.2.7.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo.***

La cromatografía líquida se utiliza, principalmente, para separar y analizar moléculas con pesos moleculares elevados, presiones de vapor bajas y termolábiles (Tomer K, 2001, p297). La fase móvil, se prepara haciendo una mezcla de solventes que puede ser isocrática (composición constante) o con gradiente (composición variable). La muestra, previamente preparada, se inyecta en el puerto de inyección y se eluye con la fase móvil, que se elige, según las características del analito. Al pasar por la columna, los compuestos, se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes en la columna, se separan en bandas cromatográficas. El tiempo que tardan las bandas cromatográficas en ser eluidas, depende de la afinidad de los compuestos por las fases móvil y estacionaria. Cuando los compuestos separados eluyen de la columna, producen en el sistema de detección una señal: su intensidad se amplifica y se registra, en función del tiempo (Muller E, 2006, p. 1020).

Uno de los detectores cromatográficos más usados debido a su universalidad, sensibilidad, y diferentes modos de adquisición y procesamiento de la señal, es el detector de masas, que registra los compuestos eluidos de la columna cromatográfica, acelera los

iones formados mediante la aplicación de un campo eléctrico, los separa según su relación masa–carga ( $m/z$ ) y produce una señal eléctrica que se procesa y se convierte en un espectro de masas (Muller E, 2006, p. 1020).

La entrada de la muestra proveniente del cromatógrafo, hacia el detector de masas, se realiza mediante un dispositivo conocido como interfaz. La interfaz garantiza que los compuestos ionizados entren luego al analizador de masas, operado bajo el vacío (Muller E, 2006, p. 1020).

La interfaz más usada para LC-MS es ESI (ionización por electronebulización) (Muller E, 2006, p. 1020). ESI permite extraer iones directamente de una solución. Este método se considera una técnica suave de ionización, en la cual, el flujo de muestra proveniente del cromatógrafo se direcciona hacia un capilar metálico pequeño, que se encuentra bajo la acción de un potencial eléctrico alto (1-8 kV). La solución que emerge del cromatógrafo llega a la punta del capilar y sale en forma de niebla fina, compuesta por moléculas del analito y del solvente, eventualmente cargadas. En ESI, un flujo de gas de secado, evapora el solvente de estas gotas, de manera que las fuerzas coulómbicas de repulsión debido al aumento de la carga y la disminución de la gota aumenten, causando fisión gracias a la caída de tensión superficial. Este proceso sucede repetidas veces, hasta que se obtienen gotas que contienen una sola molécula cargada, que ingresa al analizador Tomer K, 2001, p297.

Un componente vital de cualquier detector de masas es el analizador, que separa compuestos en función de su relación  $m/z$ , de manera, que este dispositivo sea capaz de distinguir diferencias de masas muy pequeñas (Muller E, 2006, p. 1020).

Para LC-MS, uno de los analizadores más comunes, es el de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés). En él, 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 su masa, y se produce durante el recorrido de estos hacia el detector situado al final del tubo. La ventaja del TOF, es la velocidad muy alta con que se registran los espectros de masas,

alrededor de 500 espectros por segundo. Además, a diferencia de los demás analizadores, su precisión no depende de la estabilidad de campo magnético, sino del mantenimiento y estabilidad de sus circuitos eléctricos (Tomer K, 2001, p297). LC-MS como método de acoplamiento se considera herramienta útil en tareas de medición de masas exactas de moléculas para determinar de fórmulas elementales, parámetros importantes para la identificación de la molécula (Muller E, 2006, p. 1020).

### ***2.2.7.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector Orbitrap.***

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector *Orbitrap*, es una herramienta analítica reciente, que presenta ventajas comparativas con otros acoplamientos LC-MS (Stashenko E, 2010, p.33). El sistema *Orbitrap* puede alcanzar una resolución de hasta un millón; además es más sensible que otros analizadores como cuadrupolo o TOF (Makarov A, 2010, p. 3938). En el detector *Orbitrap*, los iones, obtenidos previamente en el sistema de electronebulización, ingresan por uno de los vértices del sistema de acuerdo con su relación  $m/z$ . El detector está compuesto por dos electrodos concéntricos, un electrodo axial y un electrodo central en forma de huso. Entre los electrodos, hay formación de un potencial electrostático, cuyo ecuador se encuentra en el nodo del huso. Cuando los iones interactúan con el potencial presente entre los electrodos, estos describen trayectorias de traslación alrededor del huso y trayectorias de oscilación paralelas al eje de los electrodos. La señal que se genera es medida por antenas de radiofrecuencia, que una vez detectada es transformada mediante transformada de *Fourier* para registrar el valor correspondiente de la señal  $m/z$  de los iones (Dunn, *et al.*, 2008, p.288).

Una característica de *Orbitrap*, es que se puede operar bajo diferentes parámetros, la elección adecuada de dichos parámetros para la molécula analizada permitirá a los iones de la misma permanecer dentro de la trampa de iones describiendo una trayectoria espiral casi perfecta (Tomer K, 2001, p.297). De esta forma, el campo eléctrico que tendrá forma axial debido al diseño cónico de los electrodos, empujará los iones hacia la parte más amplia de la trampa causando oscilaciones armónicas axiales a los iones (Makarov, 2010, p. 1217).

De esa forma, aquellos iones con la misma relación  $m/z$ , se moverán describiendo trayectorias en forma de anillo debido a su oscilación alrededor del eje central. La detección se lleva a cabo mediante placas receptoras ubicadas en los electrodos externos, la corriente se digitaliza y finalmente es obtenida como un espectro de masas mediante la transformada de Fourier (Lu W, 2010, p.3212).

Así, el objetivo general de esta investigación, fue estudiar el efecto de la herbivoría de *U. ornatix* en hojas de *C. nitens*, sobre la concentración de PA en hojas y raíces de la planta. Teniendo en cuenta que existen diferentes mecanismos de respuesta de una planta frente al ataque por herbivoría [21]. La hipótesis a verificar en este trabajo de investigación fue: la herbivoría con orugas *U. ornatix* causa cambios en la concentración de alcaloides pirrolizidínicos como metabolitos secundarios en hojas y raíces de plantas de la especie *C. nitens*.

La extracción de los PA se realizó con dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y su identificación y análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un detector de masas Orbitrap de alta resolución (LC-Orbitrap-MS). Con este trabajo de investigación, se pretendió ampliar el conocimiento sobre el rol de los PA como metabolitos secundarios en la de defensa química de *C. nitens* bajo estrés por herbivoría, empleando MSPD como método de extracción alternativo a los métodos de extracción clásicos (Soxhlet, extracción asistida por radiación de microondas o por ultrasonido). Entender estos mecanismos de interacción entre plantas e insectos permitirá, a futuro, generar estrategias para el control de plagas en cultivos de interés comercial y mitigar el uso excesivo de insecticidas tóxicos para el consumo humano, contaminantes del suelo y fuentes hídricas, y nocivos para el equilibrio natural de los ecosistemas.

### 3. Metodología

#### 3.1 Solventes, reactivos, materiales y equipos.

Los siguientes son los solventes, reactivos, materiales y equipos utilizados durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

#### Tabla 4.

*Solventes, reactivos, materiales y equipos empleados durante el desarrollo de la investigación.*

<b>NOMBRE</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>
<b>REACTIVOS</b>	
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 (New Jersey, Estados Unidos)
Monocrotalina	100%, Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos)
Retrorsina	95,7%, Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos)
<b>SOLVENTES</b>	
<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)
<b>MATERIALES Y EQUIPOS AUXILIARES DE LABORATORIO</b>	
Viales cromatográficos	2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, CA, EE.UU.)
Micropipetas	2-20, 20-200, 100-1000 µL; Brand (Wertheim, Alemania)
Consumibles	Jeringas plásticas 5 mL, <i>septa</i> , algodón.
Pipetas	1, 5, 10 mL
Balanza analítica	<i>Mettler-Toledo</i> PB1502-S (Nänicon, Suiza)
Baño ultrasonido	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania)
<i>Minishaker</i>	<i>IKA</i> (Hofheim, Alemania)

### 3.2 Material vegetal.

**3.2.1 Recolección de *Crotalaria nitens*.** Las plantas y semillas de *C. nitens* se recolectaron en el sitio geo-referenciado como: 6°56'41.5" N, 73°02'05.8" W, a una altura de 1144 m.s.n.m., en el municipio de Piedecuesta (km 4 vía al municipio de la Mesa de los Santos) en el departamento de Santander, Colombia.

**3.2.2 Identificación taxonómica.** La identificación botánica de la especie *C. nitens* se realizó en el Herbario Nacional del Instituto de Ciencias en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por el doctor D. Giraldo-Cañas. En la Tabla 5, se encuentra el resultado obtenido.

**Tabla 5.**

*Identificación botánica de la planta C. nitens.*

Género	Especie	Familia	Voucher
<i>Crotalaria</i>	<i>Nitens</i>	Fabácea	COL 579431

### 3.3 Orugas y polillas.

**3.3.1 Recolección de orugas *U. ornatrrix*** Las orugas (20–30 individuos) se recolectaron en la misma zona de crecimiento de *C. nitens*, en el departamento de Santander, Colombia (Véase Numeral 3.2.1). En el sitio de colecta, las orugas se colocaron en un recipiente de plástico (20 x 15 x 15 cm) con cubierta de tela tul. Se les colocaron algunas ramas de *C. nitens* y se transportaron al CENIVAM.

**3.3.2 Propagación y mantenimiento de la cría de *U. ornatix*.** Las orugas recolectadas se conservaron en el recipiente plástico sellado con tela tul y con algunas hojas y semillas de *C. nitens*, previamente sembradas en el jardín de CENIVAM. Las orugas recolectadas de su entorno natural se utilizaron para realizar la cría de nuevas orugas necesarias para los experimentos. Cuando la mayoría de las orugas pasaron a su estado de crisálida, se trasladaron a una caja sellada con tela tul en su parte superior y con una abertura en tres de sus caras (ventanas) sellada también con tela tul; se esperó hasta su transformación a polillas. Las polillas se alimentaron con una solución agua-miel al 5% dispersada sobre la cubierta de tela tul. Dentro de esta caja se dispuso una planta de *Crotalaria* sp. en cuyas hojas las polillas depositaron sus huevos. Los huevos se recolectaron y se usaron para generar una nueva población de orugas, se ubicaron en un recipiente plástico con hojas y semillas de *C. nitens* hasta su eclosión. Las orugas se alimentaban diariamente y el recipiente se limpiaba día por medio. Las orugas se usaron en el tercer instar para los experimentos de interacción planta-insecto en el presente trabajo de investigación.

### **3.4 Implementación del método de extracción.**

Se estableció como método de extracción de los PA presentes en *C. nitens*, la técnica MSPD. La implementación del método se realizó usando tres tipos de soporte sólido (arena, florisil y gel de sílice modificada con C<sub>18</sub>), se variaron los solventes de extracción [metanol y metanol acidificado con ácido fórmico (AF) al 2%]. La variable de respuesta fue la recuperación de retrorsina, un alcaloide pirrolizidínico que no está presente en las hojas de *C. nitens*.

Se tomaron hojas frescas (200 g) de plantas de *C. nitens* cultivadas previamente en el jardín de CENIVAM. Para obtener la muestra representativa, las hojas se sumergieron en nitrógeno líquido, se liofilizaron, molieron y homogeneizaron. Para los ensayos se tomaron muestras (50 mg) de las hojas molidas y se adicionó el estándar interno (200 µL, retrorsina en metanol 99,5 µg/mL). La retrorsina se preparó disolviendo 1,04 mg (95,7%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en 10 mL de metanol. La muestra con la solución de

retrorsina se homogeneizó hasta evaporar el metanol para incorporar el estándar en la muestra. Se adicionaron el soporte sólido (200 mg, relación 1:4) y 2-propanol (200  $\mu$ L). La mezcla se maceró hasta obtener un talco fino (Véase **Figura 8**), se depositó en una columna que contenía un filtro de algodón. La elución se realizó con 5 mL del solvente seleccionado. Se tomó una alícuota del extracto obtenido (50  $\mu$ L), se aforó a 1 mL con solución agua:acetonitrilo 9:1 (v/v) y ácido fórmico (0,2%), la solución se filtró y se analizó en un LC-MS. La **Tabla 7** muestra las condiciones de los seis experimentos realizados con sus respectivas réplicas.

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  $\mu$ L, 99,5  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ m) y se analizó por LC-MS, bajo las mismas condiciones que las muestras. La solución patrón se inyectó por triplicado. Se calculó el porcentaje de recuperación con la relación de áreas entre la retrorsina extraída de las muestras, que se esperaba de 199  $\mu$ g/L y la retrorsina del patrón, así:

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

Se realizó el análisis de varianza de los resultados y la comparación de medias usando el método de diferencias mínimas significativas (DMS) con un  $p < 0,05$ .



**Figura 8.** Proceso de obtención de extractos por dispersión de la matriz en fase sólida. **A.** Mortero con pistilo, **B.** Agente dispersante (soporte sólido), **C.** Material vegetal. Fuente: Samir Suárez. Lugar: CENIVAM. UIS, Bucaramanga. Fecha: 10 de noviembre de 2016.

**Tabla 6.**

*Condiciones experimentales para la estandarización del método de extracción.*

Nº Exp.	Soporte	Peso muestra, mg	Solvente
1	Arena	47,8	MeOH
2	Arena	46,5	MeOH
3	Arena	51,1	MeOH
4	Arena	51,4	MeOH_AF 2%
5	Arena	62,5	MeOH_AF 2%
6	Arena	61,7	MeOH_AF 2%
7	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub>	53,1	MeOH
8	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub>	51,5	MeOH
9	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub>	50,1	MeOH
10	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub>	59,6	MeOH_AF 2%
11	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub>	53,4	MeOH_AF 2%
12	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub>	50,5	MeOH_AF 2%
13	Florisil	53,6	MeOH
14	Florisil	60,3	MeOH
15	Florisil	55,5	MeOH
6	Florisil	60,9	MeOH_AF 2%
17	Florisil	47,3	MeOH_AF 2%
18	Florisil	45,0	MeOH_AF 2%

AF= Ácido fórmico

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), 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 C18 (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.;  $100 \times 4,6$  mm d.i.,  $2,6 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula), a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . La fase móvil constó de (A) 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% A y 5% 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 del experimento fue de 40 min. El flujo fue de  $0,2 \text{ mL/min}$  y el volumen de inyección de 20 mL. Se realizó el acoplamiento a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS 6210 Series; AT, Palo Alto, CA, EE.UU.) a través de una interfaz de electronebulización (ESI), operada en modo positivo. Se usó nitrógeno como gas secante ( $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $7 \text{ L/min}$ ) y 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  $m/z$  100-950 con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s (Figura 9). En la interfaz de electronebulización dual se usó una solución de referencia de purina ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4$ ) y hexaquis (1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoruroptoxi)-osfazeno ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{24}$ ) 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. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, UIS. Bucaramanga. Fecha: 17 de noviembre de 2017.

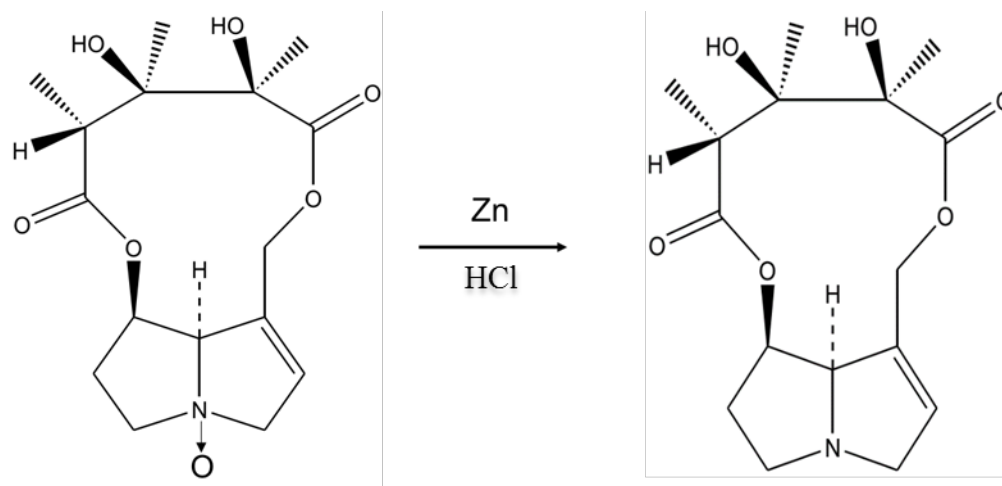
### 3.5 Composición de alcaloides pirrolizidínicos y sus *n*-óxidos en *c. Nitens*

La identificación de los PA y PANO presentes en las hojas y raíces de *C. nitens* se determinó combinando la información obtenida mediante cromatografía gaseosa y cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, LC-ESI-Orbitrap-MS). Los PA y PANO para identificación se extrajeron de raíces, hojas y semillas de plantas de *C. nitens* sembradas en el jardín de CENIVAM. Los órganos de las plantas se colectaron, se secaron a la sombra y molieron en molino de aspas SM-100 (Retsch, Haan, Alemania) con mallas de 1 mm<sup>2</sup> para homogeneización. Par la extracción MSPD se usó una muestra más grande (4 g) que la usada en el proceso de implementación del método, para lograr detectar algunos alcaloides en baja concentración. Los PANO se redujeron a PA con Zn en medio ácido para poderlos analizar por GC-MS (Véase **Figura 10**), debido a que los PANO se descomponen a la temperatura del puerto de inyección del GC. Los extractos crudos (PA y PANO) y los PA extraídos después del proceso de reducción se inyectaron por LC-MS. Los criterios de identificación para los PA en GC-MS fueron: i) determinación de los índices de retención lineales y su comparación con la literatura; ii) Comparación de espectros de masas experimentales con los de las bases de datos (NIST, WILEY) y en algunos casos con patrones de referencia. En el caso de los análisis LC-MS: iii) se

determinaron las fórmulas moleculares a partir de masas exactas de las especies protonadas  $[M+H]^+$  y iv) la interpretación de los espectros de masas y su comparación con los reportados para GC-MS (EI, 70 eV).

**3.5.1 Extracción y reducción de PANO a PA** Se tomó una porción de muestra de semilla, hoja o raíz de *C. nitens* (4 g), previamente seca y molida, se adicionó sílice- $C_{18}$  (2 g) y se maceró la mezcla hasta la obtención de un talco fino. La mezcla se depositó en una columna MSPD que contenía un filtro de algodón en el fondo. La elución se realizó con MeOH con ácido fórmico 2% (40 mL para semillas y 60 mL para hojas y raíces) en bloques de 10 mL. Para el análisis LC-Orbitrap-MS, se tomó una alícuota del extracto (200  $\mu$ L), se llevó a sequedad y se reconstituyó con una mezcla acetonitrilo:agua (1:9, v/v) con ácido fórmico (0,2%, 1 mL), la solución se filtró (0,22  $\mu$ m, PDVF, *Polyvinylidene difluoride*) y se analizó por LC-MS. Para el análisis GC-MS, los PANO se redujeron a PA con Zn metálico en polvo en medio ácido (Figura 10). La solución restante se rotoevaporó (400 mbar, 60 °C), se transfirió a tubos plásticos de 50 mL y se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso. Las muestras se re-suspendieron en una solución de ácido clorhídrico al 2,5% (10 mL). La limpieza se realizó con hexano (3x10 mL).

Se incorporó Zn en polvo (200 mg); la mezcla se agitó durante tres horas. Se adicionó  $NH_4OH$  (1 mL) al 28%, los PA se extrajeron con diclorometano (3 x 15 mL), se tomó una alícuota (100  $\mu$ L), se llevó a sequedad, se disolvió en una solución ACN:H<sub>2</sub>O 1:9 (v/v) con ácido fórmico (0,2%, 1 mL) y se filtró para su análisis LC-Orbitap-MS. 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.



**Figura 10.** Esquema de la reacción de reducción de *N*-óxido de monocrotalina a monocrotalina base, usando Zn en medio ácido [18].

El análisis GC-MS se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 *Plus* (Palo Alto, California, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5973 *Network*. 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  $\mu\text{m}$   $d_f$ , se empleó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga) como gas de arrastre, con velocidad lineal de 27 cm/s (1 ml/min, a flujo constante). 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 con energía de 70 eV. La identificación de los PA se hizo comparando los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos (NIST y WILEY) y los índices de retención lineales calculados y reportados en la literatura. Los índices de retención lineales (IRL) se calcularon con base en los tiempos de retención de patrones de hidrocarburos lineales C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> (AccuStandard, Inc. New Haven, CT, EE.UU), analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas, usando la **Ecuación 2**:

$$IRL_x = 100n + 100 \left[ \frac{t_{R_x} - t_{R_n}}{t_{R_N} - t_{R_n}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde:

IRL<sub>x</sub>: Índice de retención del compuesto de interés.

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

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

t<sub>RX</sub>: Tiempo de retención del compuesto de interés.

t<sub>Rn</sub>: Tiempo de retención del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés.

t<sub>RN</sub>: Tiempo de retención del *N*-alcano que eluye después del compuesto de interés.

**3.5.2 Análisis de extractos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector *Orbitrap*.** Las dos soluciones obtenidas (reducidas y sin reducir, Numeral 3.5.1), se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC) *Dionex™ UltiMate™ 3000* (*Thermo Scientific*, Germering, Alemania), equipado con un degasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG-3400RS), un inyector automático (WPS-300TRS) y una unidad termostatada para la columna (TCC-3000RS). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna *Hypersil GOLD™ aQ* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU) de 100 x 2.1 mm d.i., 1.9  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. La unidad termostatada se mantuvo a 30 °C. La fase móvil fue el ácido fórmico al 0,2 % en agua (A) y el 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, luego se regresó a 100% A en 1 min y se mantuvo en equilibrio durante 3 min. El flujo fue de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  y el volumen de inyección, 1  $\mu\text{L}$ . El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas *Orbitrap™ Exactive Plus* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) a través de una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II) operada en modo positivo, a 350 °C. El nitrógeno (>99%) para la HESI-II se obtuvo de un generador NM32LA (*Peak Scientific*, Scotland, Reino Unido). La temperatura del capilar fue de 320 °C y el voltaje del nebulizador fue de 3,5 kV. Los flujos de nitrógeno usados como gas *sheath* y gas auxiliar, se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. La resolución del analizador *Orbitrap* para el modo de barrido completo (*full scan*) se ajustó a 70 000 (*full-width-at-half-maximum*, a  $m/z$  200,  $R_{\text{FWHM}}$ ), usando un control de ganancia automático (AGC) de  $3 \times 10^6$  y un tiempo de inyección en la trampa de iones *C-trap* de 200 ms. Para mejorar la identificación, los compuestos se enviaron a la celda de colisiones HCD (*High-Energy Collisional Dissociation*), para la fragmentación a diferentes energías (20, 30, 40 y 50 eV) en el modo de barrido por pasos (*step scan*). Los espectros de masas se registraron en el modo AIF (*all-ion fragmentation*) para cada energía de colisión, con una resolución  $R_{\text{FWHM}}$  de 35 000, usando un AGC de  $3 \times 10^6$  y un tiempo de inyección en la trampa *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 positivo con una solución de referencia, preparada en el laboratorio, que contenía *n*-butilamina, dodecilsulfato de sodio, taurocolato de sodio hidratado, cafeína, acetato de Met-

Arg-Phe-Ala y una solución estándar *Ultramark*<sup>TM</sup> 1621 *Mass Spec*. 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*<sup>TM</sup> *Exactive Plus* (*Thermo-Fisher Scientific*, P/N 1323060, *Revision A*, 2012). Los datos obtenidos se analizaron con el software *Thermo XCalibur* v3.1 (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE.UU.).



**Figura 11.** **A.** Cromatógrafo de gases AT 6890 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas AT 5973 *Network*.; **B.** Cromatógrafo líquido (UHPLC, *Dionex Ultimate 3000*), acoplado a un espectrómetro de masas *Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific)*. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS, UIS. Bucaramanga. Fecha: 17 de noviembre de 2017.

### 3.6 Alcaloides pirrolizidínicos *c. Nitens* en diferentes estados de crecimiento.

Se determinó la concentración de alcaloides pirrolizidínicos en las hojas de *C. nitens* durante el tiempo de vida de la planta y la concentración de alcaloides pirrolizidínicos en raíces, hojas basales y apicales, flores y semillas verdes y maduras de la planta adulta. Los resultados permitieron determinar cuál edad de la planta se debía usar para el ensayo de herbivoría.

**3.6.1 Variación de alcaloides pirrolizidínicos en los órganos de *C. nitens* durante su crecimiento.** El cultivo de *C. nitens* se llevó a cabo por el método de propagación por semilla, en los jardines experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto, CENIVAM, ubicado en el campo principal de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Las semillas obtenidas de la colecta se sembraron en bolsas plásticas (5 L), que se llenaron con tierra extraída de los jardines de CENIVAM. En cada bolsa, se colocaron aproximadamente 10 semillas de *C. nitens*. Posterior a la germinación (10-15 días), se seleccionó una planta por bolsa y las demás se eliminaron. Las bolsas se ubicaron en un sitio (Véase Figura 12), construido con listones, alambre y tela tul para proteger las plantas de ataque de otros insectos. El terreno fue previamente aplanado y preparado para colocar las bolsas.

Las plantas en crecimiento se regaron cada dos días con 50 mL de agua, aproximadamente, en cada bolsa y se fertilizaron cada semana con 50 mL de una solución que contenía fertilizante (1 g) soluble (N, P, K, MgO: 11, 27, 12, 2%) disuelto en 1 L de agua.



**Figura 12.** Apariencia final de sitio construido para el experimento de interacción de *C. nitens* con *U. ornatix*. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2017.

Se eligieron al azar diez bolsas con plantas individuales de cuatro semanas de edad. Las plantas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de crecimiento. Se realizó muestreo de hojas durante 21 semanas y en la adultez se muestrearon flores, semillas verdes y maduras y raíces. Se tomó la hoja número cinco de la rama central de la planta contando desde el ápice a la raíz. En la semana número diez del experimento las plantas entraron en etapa de floración, el muestreo de las flores se realizó en la semana 14, cuando las plantas seleccionadas presentaron floración abundante. En la semana número 15, las plantas entraron en etapa reproductiva. Las semillas verdes se recolectaron en la semana 18, cuando la vaina alcanzó un tamaño aproximado de tres cm de largo. Las semillas maduras se obtuvieron durante la semana final del experimento (semana 21). En la semana 21 del experimento, las plantas adultas se arrancaron de raíz y se realizó el muestreo total de raíces, hojas apicales y basales, flores, semillas verdes y maduras de todas las plantas para su posterior análisis.

**3.6.2 Muestreo y análisis de alcaloides pirrolizidínicos en los órganos de *C. nitens* durante su crecimiento.** La extracción de los PA y PANO se realizó en tejido fresco mediante MSPD y su análisis por LC-Orbitrap-MS. En todos los órganos la muestra para MSPD fue de 100 mg. Las raíces se les retiró la tierra manualmente y se lavaron con abundante agua, se picaron con una tijera, se homogeneizaron y se tomó la muestra. Se llamaron basales a las hojas de la mitad hacia abajo de una rama de la planta y apicales a las hojas de la mitad superior. Las hojas basales de varias ramas de la misma planta se juntaron y sumergieron en nitrógeno líquido (Praxair, Bucaramanga) en una caja de aluminio, se trituraron con un pistilo y homogeneizaron para tomar la muestra. Lo mismo se hizo con las hojas apicales. Antes que se descongelaran las hojas trituradas se pesó la muestra sobre el mortero para la extracción MSPD. Las flores de varias ramas se homogeneizaron para tomar la muestra y las semillas verdes de varias vainas se mezclaron y homogeneizaron para el muestreo. Lo mismo se hizo con las semillas maduras. Cada muestra se mezcló con el soporte sólido (sílice-C<sub>18</sub>, 400 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  $\mu$ L para hojas, flores y raíces, o 50  $\mu$ L para semillas), se completó a 1 mL con una mezcla ACN: H<sub>2</sub>O 1:9 (v/v) con ácido fórmico 0,2%, se filtró y se analizó por UHPLC-*Orbitrap*-MS, como se describe en la **Sección 3.5.2**. 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 presentes en *C. nitens*. Se preparó una solución patrón de 550 mg/L en metanol (S1). 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  $\mu$ L) de S1 y se disolvió en metanol (10 mL) para obtener la solución de 2,8 mg/L (S2). Se tomaron alícuotas de 4, 20, 40, 80 y 200  $\mu$ L de S2 y se aforaron (1 mL) con solución H<sub>2</sub>O:ACN 9:1 (v/v) con de ácido fórmico 0,2 % para obtener cinco concentraciones de 11, 55, 110, 220 y 550  $\mu$ g/L (**Tabla 7**). Las soluciones de diferentes concentraciones se inyectaron en el LC-*Orbitrap*-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  $\mu$ 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 formula:

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

Donde:

A<sub>x</sub>: 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<sub>final</sub>: Volumen (L) de aforo de la solución final (normalmente 1 mL).

V<sub>extracción</sub>: Volumen final (mL) de la extracción MSPD (normalmente 5 mL).

V<sub>alícuota</sub>: Volumen de alícuota (mL) tomada del extracto MSPD para análisis LC-MS.

P<sub>muestra</sub>: Peso de la muestra (mg).

F: Factor de recuperación de la extracción MSPD.

**Tabla 7.***Condiciones de preparación de la curva de calibración de la monocrotalina.*

Condición	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
Volumen tomado ( $\mu\text{L}$ ) de S2	4	20	40	80	200
Volumen final (mL)	1	1	1	1	1
Concentración monocrotalina ( $\mu\text{g/L}$ )	11	55	110	220	550

### **3.7 Análisis de alcaloides pirrolizidínicos en *C. Nitens* antes y después del ataque con *U. Ornatrrix*.**

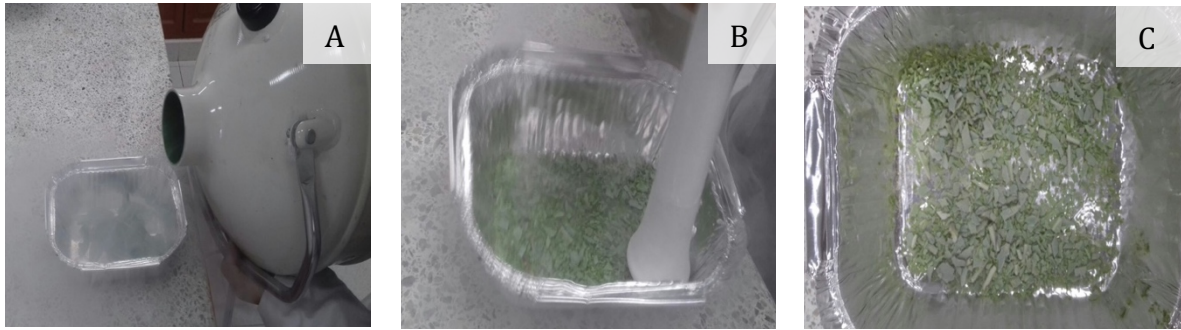
El experimento se realizó con el fin de determinar el efecto de la herbivoría de *U. ornatrrix* sobre el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en hojas y raíces de *C. nitens*. Se usaron plantas de *C. nitens* (como se describe en el **Numeral 3.6.1**). Para este experimento, el sitio de siembra se dividió en dos tratamientos, control (20 plantas) y herbivoría (20 plantas). En el día 43 de siembra, es decir, el día “cero” del experimento se tomaron diez plantas de tratamiento control y diez plantas del tratamiento con herbivoría, para determinar el contenido inicial de PA.

**3.7.1 Ataque por herbivoría a plantas de *C. nitens*.** Las diez plantas de *C. nitens* restantes, tanto del tratamiento control como del tratamiento con herbivoría se colocaron en tubos de tela tul (Véase Figura 13). A cada una de las diez plantas del tratamiento de herbivoría se les colocaron tres orugas en instar tres (15 mm de longitud, aproximadamente). Los tubos de tela tul se aseguraron con cauchos a la base de la bolsa y en el extremo superior se ataron al soporte de la estructura. Las orugas se alimentaron de la planta durante 12 días. Las diez plantas control se mantuvieron sin orugas, pero en las mismas condiciones durante los 12 días de tratamiento con herbivoría. Después del día 12, las orugas se retiraron y se muestrearon las 20 plantas de ambos tratamientos.



**Figura 13.** Protección de las plantas de *C. nitens* contra otro tipo de insectos diferentes a orugas de *U. ornatrix*. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2017.

**3.7.2 Muestreo y análisis de PA en hojas y raíces de *C. nitens*.** Para garantizar la toma de una muestra homogénea de hojas y raíces de *C. nitens*, se tomaron todas las hojas y todas las partes de la raíz después del ataque de las orugas, tanto en las plantas control como las atacadas. Las hojas se removieron del tallo y rápidamente se calcaron sobre papel transparente teniendo cuidado de reproducir los contornos de las mordidas de la oruga, para determinar posteriormente el área foliar. Posteriormente, se colocaron en bandejas de aluminio, se trataron con nitrógeno líquido (Praxair, Bucaramanga) y se maceraron de inmediato como se observa en la Figura 14. La raíz, que no se trató con nitrógeno líquido debido a su tamaño reducido, se cortó en trozos pequeños. Los PA se extrajeron usando MSPD y se cuantificaron como equivalentes de monocrotalina, tal como se describe en la Sección 3.6.2 y su análisis se realizó mediante LC-Orbitrap-MS de la misma forma descrita en la Sección 3.5.2. Se midió y registró la longitud de los tallos sin hojas para determinar el efecto de la herbivoría en el crecimiento de la planta.

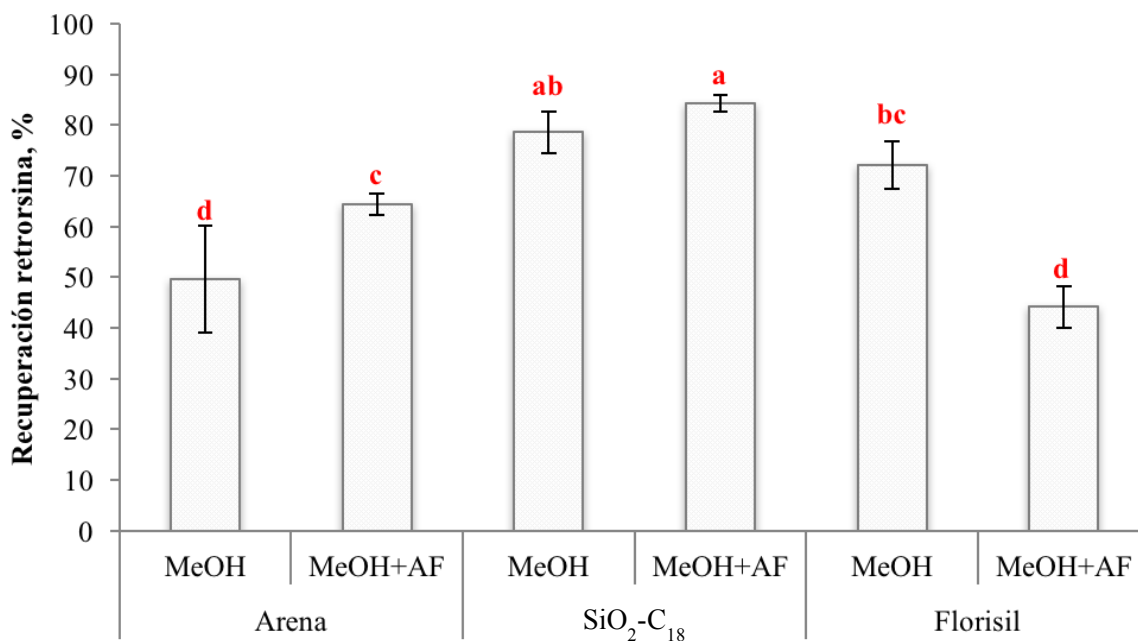


**Figura 14.** Proceso de homogeneización de las hojas de *C. nitens* muestreadas. **A.** Hojas tratadas con N<sub>2</sub> líquido; **B.** Hojas trituradas; **C.** Muestra homogeneizada. Fuente: Yesica Bautista Correa. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga, Colombia. Fecha: 12 de agosto de 2017.

#### 4. Análisis y discusión de resultados

##### 4.1 Estandarización del método de extracción

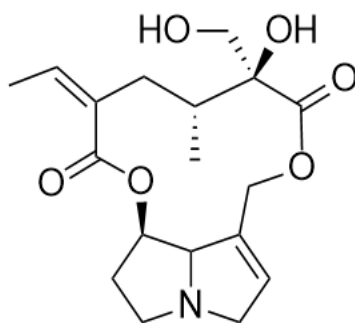
En la **Figura 15**, se observa el porcentaje de recuperación de la retrorsina en hojas secas y molidas de *C. nitens* cuando se usó florisil, arena o sílice-C<sub>18</sub> como soporte sólido y metanol o metanol acidulado con ácido fórmico (2%) como solvente de extracción. De acuerdo con la gráfica, el mayor porcentaje de recuperación de la retrorsina fue cuando se usó SiO<sub>2</sub><sup>-</sup>C<sub>18</sub> como soporte sólido y MeOH con ácido fórmico (AF) al 2% o solamente MeOH como solvente de elución.



**Figura 15.** Porcentaje de recuperación de retrorsina de hojas secas y molidas de *C. nitens* para el método de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida haciendo uso de tres tipos de soportes sólidos: arena, SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> y florisil, y metanol o metanol acidificado con ácido fórmico (AF) al 2% como solvente de extracción.

Los PA son de carácter básico debido a la presencia de un átomo de nitrógeno en su estructura, y de carácter polar debido a la abundancia de grupos hidroxilo (OH) en su esqueleto. La retrorsina, es un heterociclo con presencia de dos grupos OH en su estructura,

como se observa en la **Figura 16**, lo que explica su afinidad con el metanol (Christie, 1949, p. 1700).



**Figura 16.** Estructura de la retrorsina, alcaloide pirrolizidínico usado como estándar interno para la estandarización del método de extracción de alcaloides pirrolizidínicos en muestra de *C. nitens* usando MSPD.

El pKa [-log(Ka)] de la retrorsina es 6,07 (Fashe, 2014, p.1950). Cuando el metanol es acidificado, el pH de la solución disminuye, quedando por debajo del valor del pKa de la retrorsina. De esta forma, aumenta la concentración de protones (H<sup>+</sup>) disponibles en el medio. Así, la retrorsina protonada interactúa mediante enlaces tipo puente de hidrógeno con el solvente. La energía de los enlaces tipo puente de hidrogeno puede ser 15 veces mayor que la energía de las fuerzas de dispersión de London (Hirschfelder, 2009, p.33), por lo se consideran enlaces fuertes.

Por otro lado, los soportes sólidos florisil y arena, contienen dentro de su estructura grupos OH que pueden interactuar con los OH de los PA mediante interacciones tipo puente de hidrógeno; por lo tanto, a pesar de la afinidad del PA con el solvente, este no será eluido completamente debido a las interacciones tipo puente de hidrógeno que pueda formar con el soporte sólido; esto explica el bajo porcentaje de recuperación obtenido con la arena y con el florisil, y por el contrario, con SiO<sub>2</sub><sup>-</sup> como soporte sólido, que es gel de sílice modificado con una cadena recta de 18 carbonos (apolar), en cuya estructura se reduce la presencia de grupos OH, ya que estos son los grupos terminales de la red tridimensional del óxido de silicio (Huang T, 2003, p.83). La interacción con los PA será menor, es decir, que primará la afinidad del alcaloide con el solvente, lo que explica el

mayor porcentaje de recuperación obtenido con  $\text{SiO}_2^-$  en comparación con la arena, que es un aluminosilicato, y el florisil, que es óxido de magnesio. Se estableció, que las condiciones de extracción de los PA usando MSPD, serían usando gel de sílice modificada  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$  como soporte sólido y MeOH con AF 2% (5 mL) como solvente de elución. Estas fueron las condiciones de empleadas para los experimentos de extracción, identificación y cuantificación de los PA en *C. nitens* usadas en el presente trabajo de investigación.

#### 4.2 Identificación y cuantificación de los alcaloides pirrolizidínicos en *c. Nitens*.

Se realizó la identificación tentativa de PA presentes en *C. nitens* usando GC-MS y LC-*Orbitrap*-MS. Los espectros de masas y los índices de retención lineales de los picos cromatográficos obtenidos por GC-MS se compararon con los reportados en la literatura [18,19], en las bases de datos WILEY y NIST y en el caso de la monocrotalina, con un estándar de referencia. La identificación tentativa de los PANO presentes en *C. nitens* se realizó por LC-*Orbitrap*-MS, se tuvieron en cuenta factores como: i) masas exactas con 15.99491 u.m.a. mayores que los correspondientes PA encontrados por GC-MS, que corresponden a la adición del oxígeno en *N*-óxido, 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  $\text{Zn}/\text{H}^+$ ; iii) la interpretación de sus espectros de masas obtenidos LC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS en modo *step scan* a diferentes valores de energía de la HCD. La cuantificación de los extractos se realizó con base en lo explicado en el **Numeral 3.5.1**, haciendo uso de la **Ecuación 2**.

**4.2.1 Análisis de extractos MSPD por GC-MS.** Con el perfil cromatográfico de las muestras y los *n*-alcanos se calcularon los IRL. Se obtuvieron los espectros de masas en modo *full scan*, con impacto de electrones a 70 eV, para el extracto MSPD de semilla de *C. nitens* (Véanse Tabla 8 y Figura 17). Se encontraron tres picos cromatográficos principalmente, correspondientes a crispatina, monocrotalina e integerrimina.

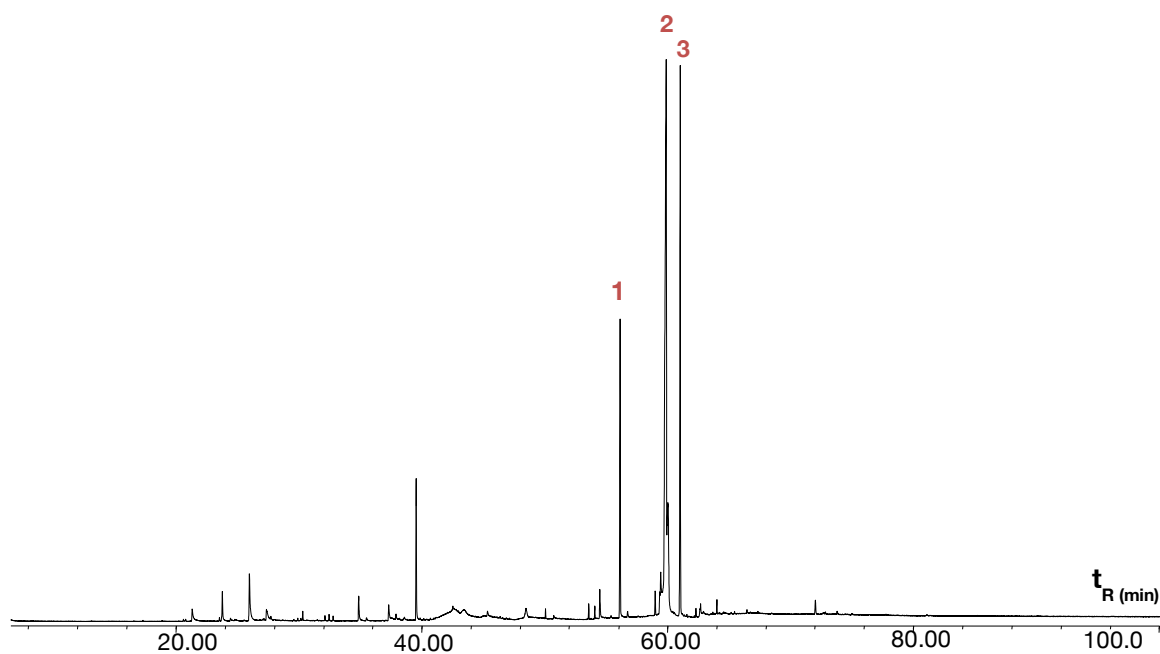
En la **Figura 18** se observa el perfil cromatográfico GC-MS del patrón de *n*-parafinas C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> usado para la cuantificación de los PA, y en la **Figura 19** la superposición de dicho perfil con el perfil cromatográfico GC-MS del extracto MSPD de semillas de *C. nitens*

**Tabla 8.**

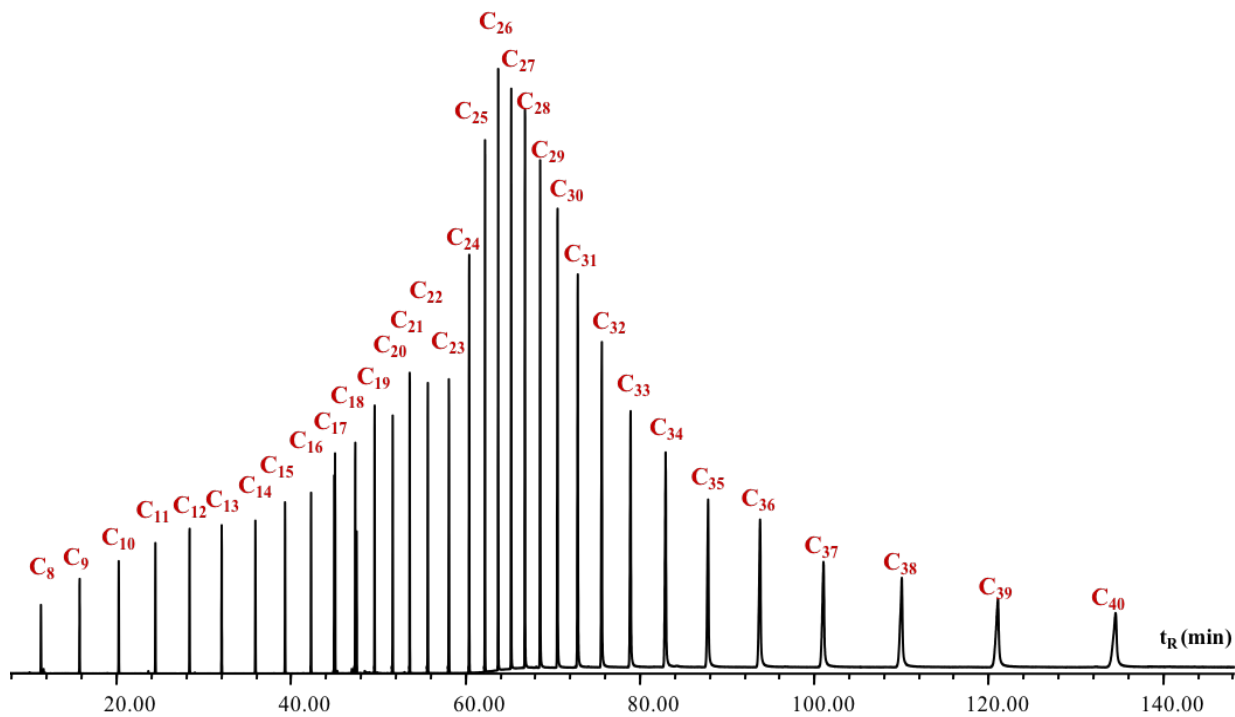
*Alcaloides pirrolizidínicos identificados por GC-MS en el extracto de semillas de C. nitens obtenido por MSPD.*

N° pico [Fig 17]	Alcaloide	Fórmula	IRL- Columna DB-5		[M] <sup>+</sup> m/z	m/z (I, %)	*Crit. Ident
			Exp.	Lit. [18]			
1	Crispatina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	2220	2231	309	309 (2), 138 (28), 137 (22), <b>136 (76)</b> , 121 (25), <b>120</b> <b>(79)</b> , 119 (100), 108 (18), 95 (45), 94 (55), <b>93 (65)</b> , 80 (35), 55 (21)	a, b
2	Monocrotalina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	2386	2338	325	325 (1), 236 (48), 138 (11), 137 (16), <b>136 (54)</b> , <b>120</b> <b>(100)</b> , 95 (13), 94 (31), <b>93</b> <b>(47)</b> , 80 (23)	a, b, c
3	Integerrimina	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	2435	2414	335	335 (3), 248 (8), 220 (16), 138 (43), <b>136 (92)</b> , <b>120</b> <b>(100)</b> , 109 (21), 94 (69), <b>93</b> <b>(93)</b> , 80 (41), 67 (19), 55 (17)	a, b

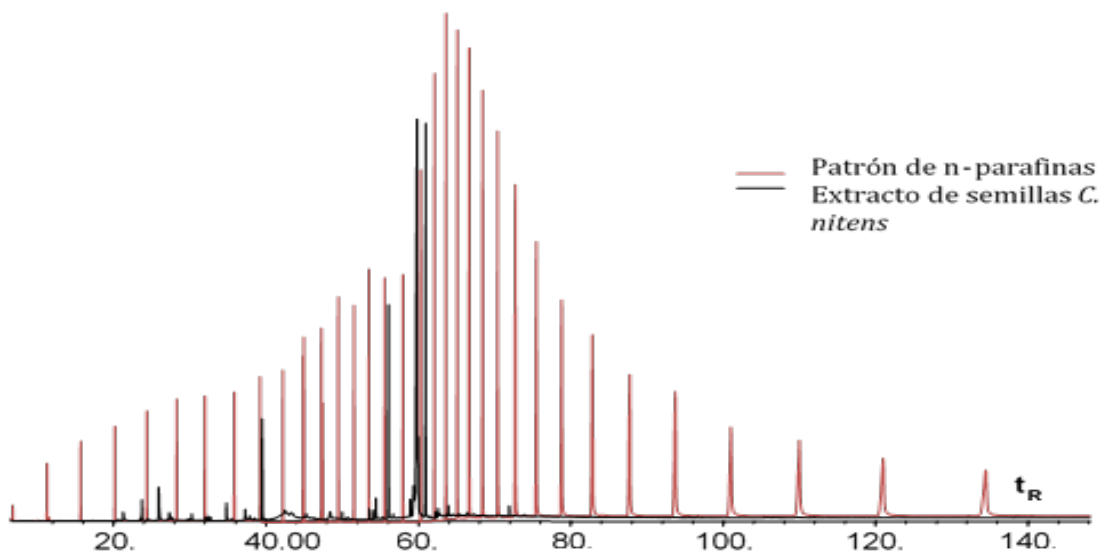
\*Criterio de identificación: **a.** Índices de retención lineales; **b.** Coincidencia de espectro de masas con los de las bases de datos (WILEY y NIST) y **c.** Patrón certificado.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico GC-MS del extracto MSPD de semillas de *C. nitens*. La identificación de picos aparece en la **Tabla 6**.

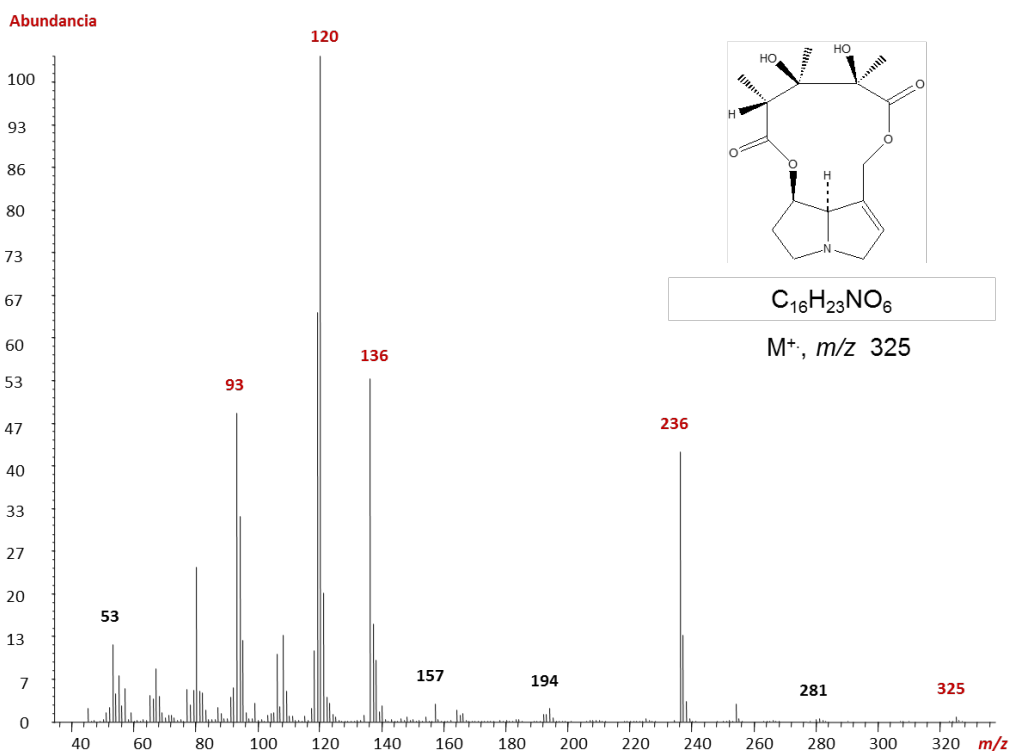


**Figura 18.** Perfil cromatográfico GC-MS del patrón de *n*-parafinas C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>.

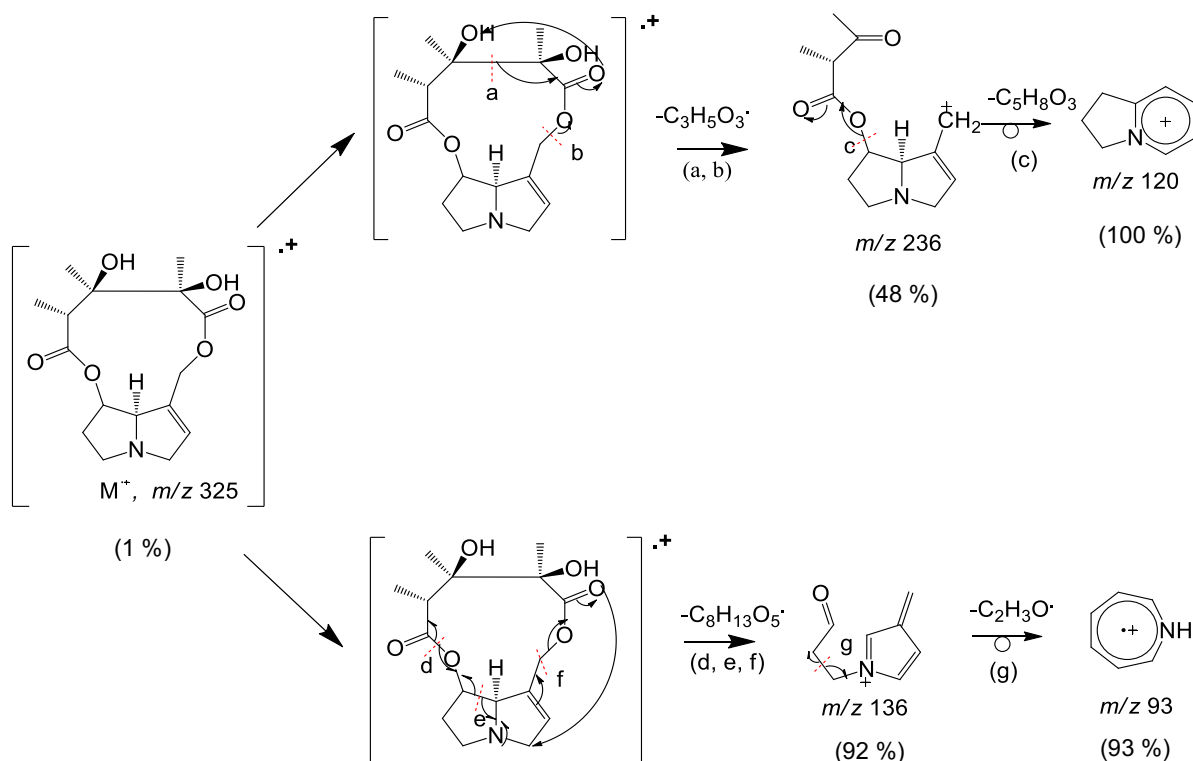


**Figura 19.** Superposición del perfil cromatográfico del patrón de *n*-parafinas C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> (rojo) y del perfil cromatográfico GC-MS del extracto MSPD de semillas de *C. nitens* (negro).

En la **Figura 20** se observa el espectro de masas de la monocrotalina. La señal del ion molecular, correspondiente a un catión-radical, aparece en  $m/z$  325; en el caso de crispatina e intergerrimina en  $m/z$  309 y 335 respectivamente. Estos valores impares de  $M^+$  sugieren la presencia de nitrógeno en estas estructuras (Silverstein, 2014, p.37). En la **Figura 21**, se observa el esquema de fragmentación propuesto por Neuner-Jehle *et al.*, 1965, p.321 para la monocrotalina, en donde se explica procedencia de los tres picos característicos en su espectro de masas, *i.e.*,  $m/z$  93, 120 y 136.



**Figura 20.** Espectro de masas de la monocrotalina ( $M^+$ ,  $m/z$  325). Ionización por impacto de electrones (EI, 70 eV).



**Figura 21.** Posible esquema de fragmentación de monocrotalina, origen de los iones característicos  $m/z$  93, 120 y 136. Adaptado de: Neuner-Jehle *et al.*, 1965, p.321.

#### 4.2.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con detector

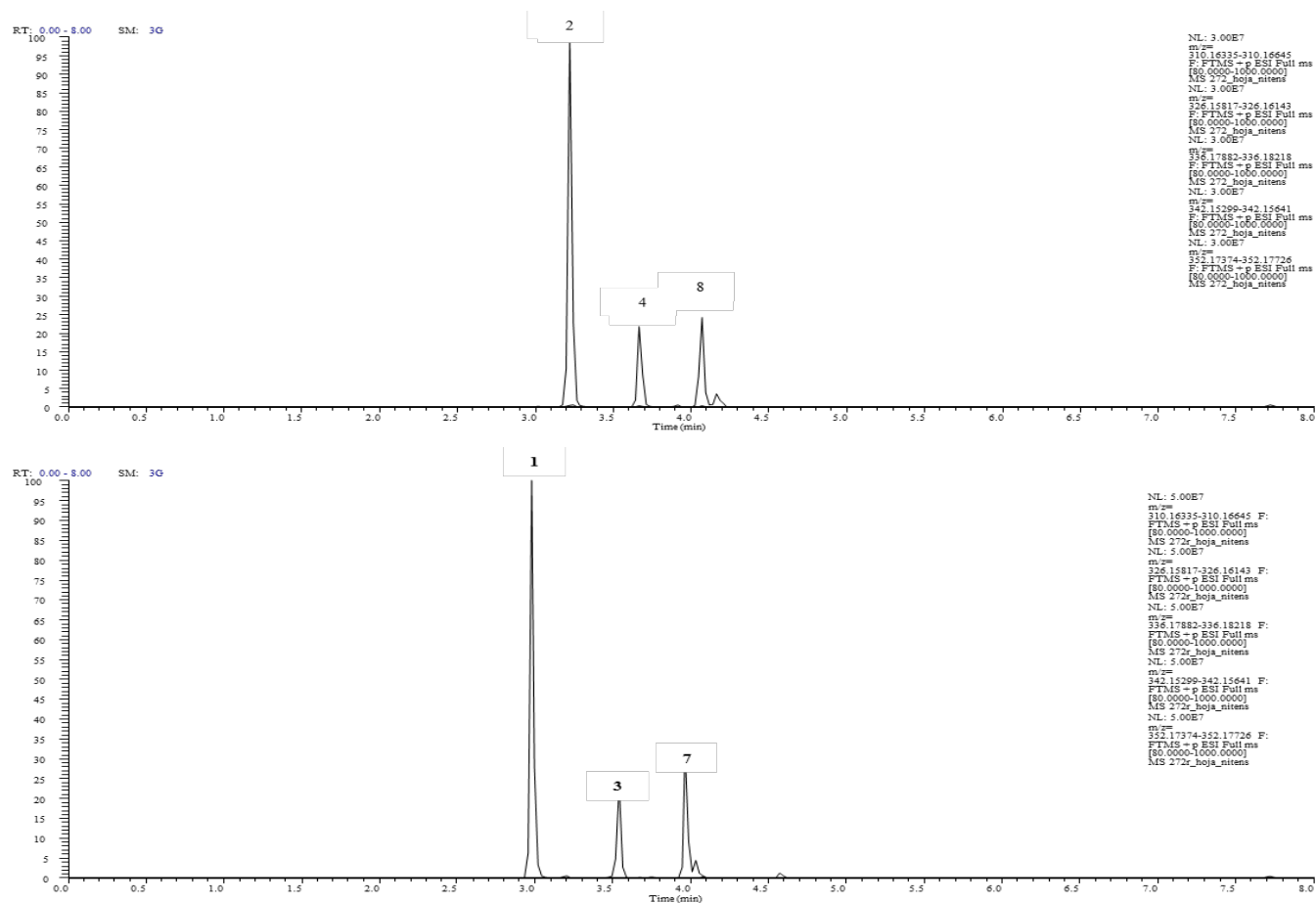
**Orbitrap:** Usando UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los extractos de hojas y raíces de *C. nitens*. Para ayudar a identificar los picos correspondientes a los PA y aquellas sustancias correspondientes a los PANO en hojas, se realizó la reducción de sustancias (PANO) en los extractos obtenidos usando  $Zn/H^+$  según el procedimiento descrito en el Numeral 3.5.1.

En la **Figura 22**, se observa el perfil cromatográfico obtenido de los extractos MSPD de hojas de *C. nitens* antes y después de la reducción con  $Zn/H^+$ . En la **Tabla 9** se observan los PA y los PANO identificados por UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS en hojas y en raíces de *C. nitens*.

**Tabla 9.**

*Masas exactas e iones característicos de los PA y los PANO obtenidos por UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS, en el análisis de los extractos de hojas y raíces de C. nitens.*

N° Pico Fig. 22 y 23	t <sub>R</sub> (min)	Alcaloides	Fórmula	Masas [M+H] <sup>+</sup>		Δ ppm	E <sub>HCD</sub> , eV	m/z (I, %)
				Calculada	Experim.			
1	3,0	Monocrotalina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	326,15981	326,15903	0,4	40	326,15903 (9), 194,11778 (18), 138,09167 (16), 120,08124 (100), 94,06551 (47)
2	3,2	Monocrotalina N-óxido	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	342,15473	342,15363	1,1	40	342,15363 (100), 236,12886 (18), 157,08591 (12), 137,08350 (56), 136,07588 (30), 120,08113 (36), 119,07336 (41), 108,08086 (15), 94,06440 (25)
3	3,5	Crispatina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	310,1649	310,16469	0,2	30	310,16469 (100), 282,16469 (29), 156,10219 (3), 138,08121 (27), 94,06572 (21)
4	3,7	Crispatina N-óxido	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	326,15981	326,15984	0,1	50	326,15984 (100), 298,16364 (1), 136,07610 (50), 120,08118 (69), 94,06570 (75), 93,05789 (39)
5	3,8	9-Angeloilretronecina	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	238,14377	238,14267	1,0	30	238,14276 (5), 138,09158 (5), 120,08105 (15), 94,06558 (100), 83,04956 (5,0)
6	3,9	9-Angeloilretronecina N-óxido	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	254,13868	254,13812	0,6	50	254,13812 (88), 154,08661 (29), 138,09087 (21), 136,07594 (33), 126,09117 (16), 108,08124 (16), 94,06563 (83), 93,05782 (100), 83,04961 (15)
7	4,0	Integerrimina	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	336,18055	336,18173	1,18	40	336,18173 (36), 308,18610 (23), 220,13392 (5), 138,09164 (65), 120,08121 (100), 94,06549 (71)
8	4,1	Integerrimina N-óxido	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	352,17546	352,17505	0,41	50	352,17505 (50), 136,070608 (47), 120,08101 (68), 118,0653 (64), 106,06538 (22), 94,06580 (100)



**Figura 22.** Cromatogramas obtenidos por UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS de los extractos MSPD de hojas de *C. nitens*. **A.** Los PANO en los extractos sin reducción con Zn/H<sup>+</sup> y **B.** Los PA en los extractos reducidos con Zn/H<sup>+</sup>. Ver identificación de los picos en la **Tabla 9**.

En la **Figura 22** se puede evidenciar, que después del tratamiento con Zn (H<sup>+</sup>), los PANO extraídos de la planta mediante MSPD se reducen a su forma de amina libre alcanzando porcentajes de conversión de hasta 100 %. El porcentaje de conversión de la reacción (Véase **Tabla 10**), se calculó con base en las áreas cromatográficas obtenidas para cada compuesto mediante UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS, así:

$$\text{Conversión (\%)} = \frac{\text{Área PANO antes de trat.} - \text{Área PANO desp. de trat.}}{\text{Área PANO antes de trat.}} * 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

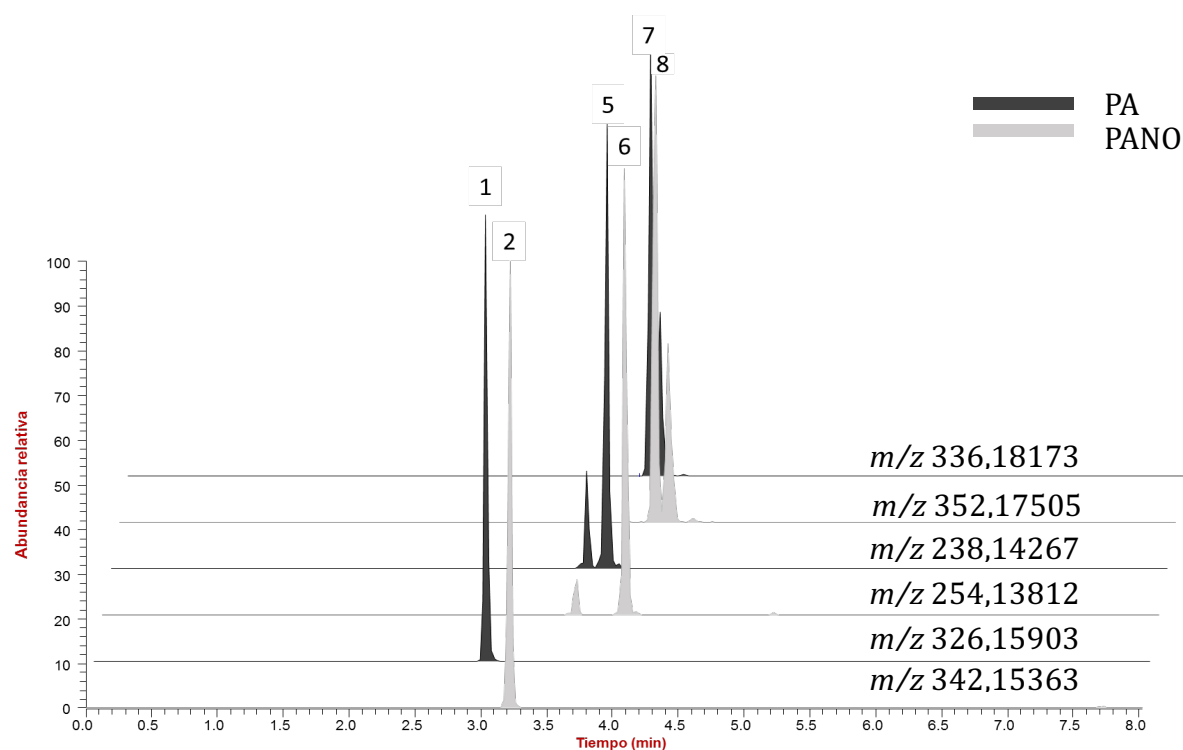
**Tabla 10.**

*Porcentaje de conversión de PA a PANO después del tratamiento de reducción de los extractos MSPD de hojas de C. nitens.*

Pico	Nombre	Área, cuentas		Conversion, %
		Antes del tratamiento con Zn/H <sup>+</sup>	Después del tratamiento con Zn/H <sup>+</sup>	
1	Monocrotalina	No detectado	49437804	
2	Monocrotalina N-óxido	53823114	306347	99
3	Crispatina	291051	10856345	
4	Crispatina N-óxido	13578174	No detectado	100
7	Integerrimina	338556	17185538	
8	Integerrimina N-óxido	17783649	127110.5	99

De esa forma, se identificaron tres estructuras correspondientes a los PA y tres estructuras correspondientes a los PANO presentes en los extractos MSPD de *C. nitens*: monocrotalina, crispatina e integerrimina y sus respectivos N-óxidos.

En la **Figura 23** se observa el fragmentograma de los extractos MSPD de raíces de *C. nitens* obtenidos por MSPD.

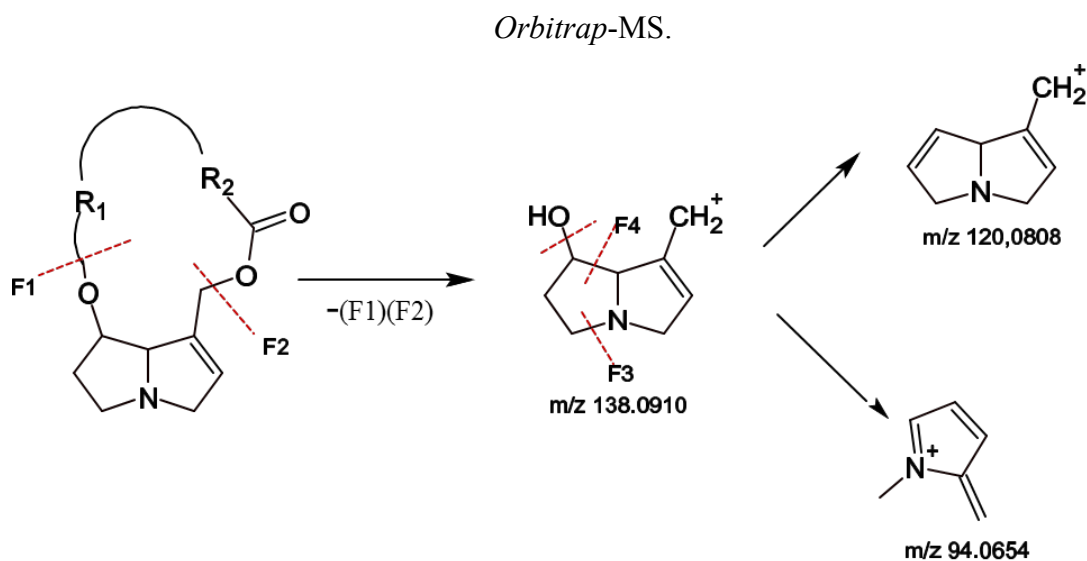


**Figura 23.** Fragmentogramas de iones extraídos obtenidos por UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS del extracto MSPD de raíces de *C. nitens*. Identificación de los picos aparece en la **Tabla 9**.

En raíces se encontraron tres estructuras correspondientes a los PA y tres correspondientes a los PANO como se observa en la **Figura 21**, la monocrotalina, 9-angeloilretronecina y la intergerrimina y sus respectivos *N*-óxidos.

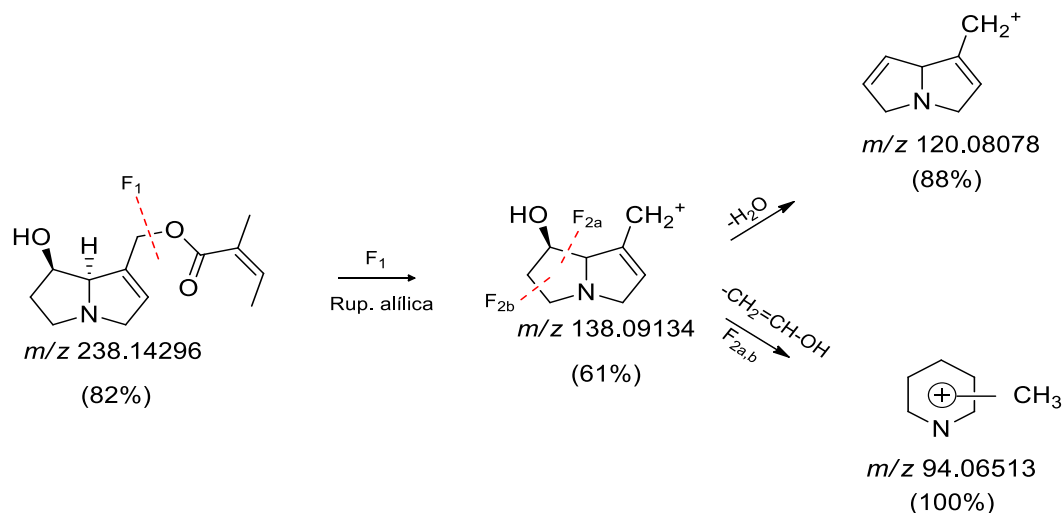
En las hojas de *C. nitens* no se encontró la 9-angeloilretronecina, mientras que en las raíces no se detectó la crispatina; sin embargo, es posible, que, aunque estas estructuras moleculares se encuentren presentes en estas partes de la planta, su concentración es menor al límite de detección (0,4 ng/mL, véase **Tabla 11**) del método en el equipo analítico utilizado, UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS.

En la **Figura 24**, se observa un esquema general de fragmentación propuesto por Zhang et al., 2017, p.361, para alcaloides pirrolizidínicos analizados por UHPLC- Cuadrupolo-

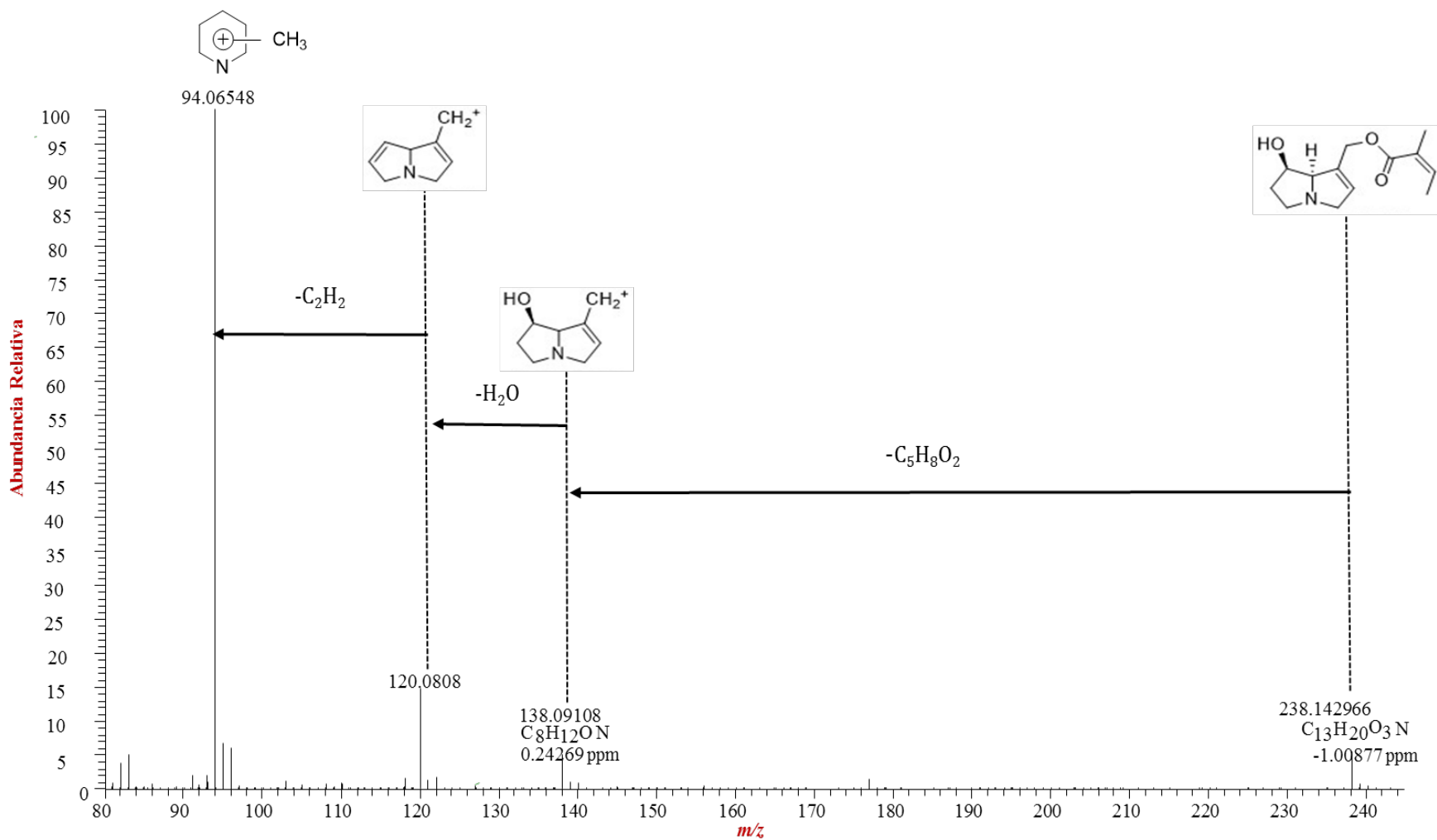


**Figura 24.** Posible esquema general de fragmentación de PA macrocíclicos con base retronecina analizados por UHPLC-ESI(+)-Cuadrupolo-*Orbitrap*-MS, adaptado de: Zhang et al., 2017, p.361.

Con base en el esquema presentado en la **Figura 24**, se propone el patrón de fragmentación de la estructura molecular del PA identificado, tentativamente, como 9-angeloilretronecina, en los extractos de raíces de *C. nitens* (Véase **Figura 25**). En la **Figura 26** se muestra el espectro de masas de la 9-angeloilretronecina obtenido mediante UHPLC-ESI(+)-.



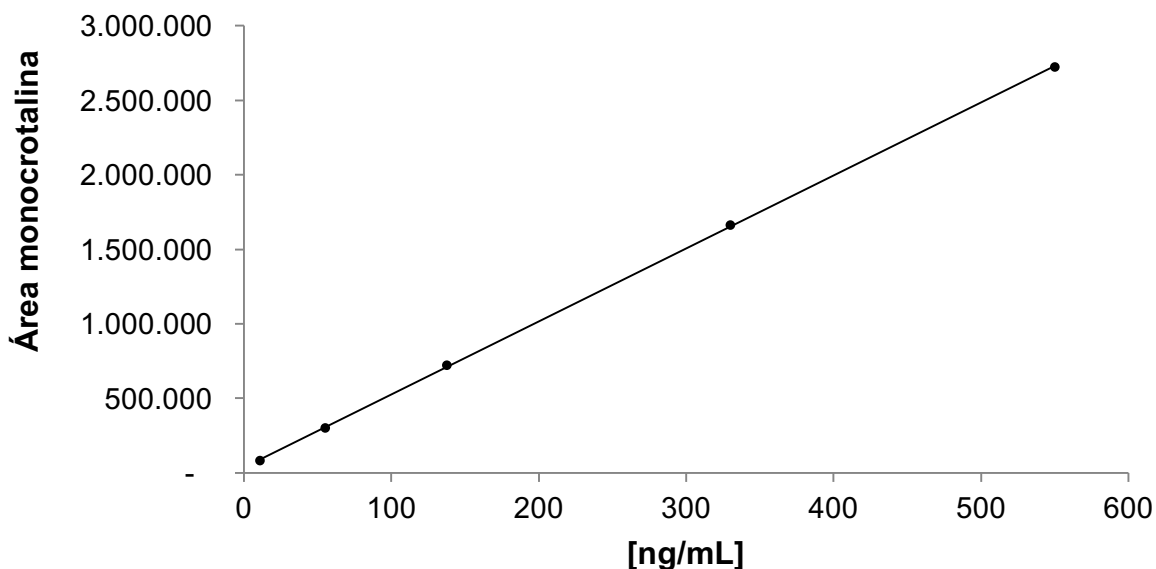
**Figura 25.** Esquema general de fragmentación de la 9-angeloilretronecina, molécula identificada tentativamente mediante por UHPLC-ESI(+)-*Orbitrap*-MS.



**Figura 26.** Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI(+)-Orbitrap-MS, operado modo *step scan* (HCD, 30 eV) de la 9-angeloilretronecina.

Se puede observar (**Figuras 25 y 26**), que el ion molecular correspondiente a la señal en  $m/z$  238.1427 corresponde a la molécula de 9-angeloilretronecina protonada  $[M+H]^+$ . El fragmento en  $m/z$  138.0915 se obtiene por ruptura alílica, debido a la pérdida de  $C_5H_8O_2$  ( $F_1$ ). Una pérdida de  $H_2O$  ( $F_{2a}$ ) da lugar a la aparición del ion en  $m/z$  120.0810, y una pérdida sucesiva de  $H_2O$  y de  $C_2H_2$  ( $F_{2b}$ ) produce la señal correspondiente al ion en  $m/z$  94.0655.

**4.2.3. Cuantificación de los PA y PANO, usando LC-Orbitrap-MS:** La cuantificación de los PA y los PANO presentes en las hojas y raíces de *C. nitens* se realizó en el LC-Orbitrap-MS. Los valores de contenido de PA y PA se reportan como equivalentes de monocrotalina. La curva de calibración de la monocrotalina se construyó entre 11 y 550 ng/mL (**Figura 27**).



**Figura 27.** Curva de calibración de la monocrotalina para la cuantificación de PA y PANO en extractos de hojas y raíces de *C. nitens* mediante LC-ESI(+)-Orbitrap-MS.

Se determinó el rango de linealidad, la pendiente, el intercepto, el coeficiente de determinación lineal ( $R^2$ ), el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), como se observa en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.**

*Parámetros de la curva de calibración de la monocrotalina*

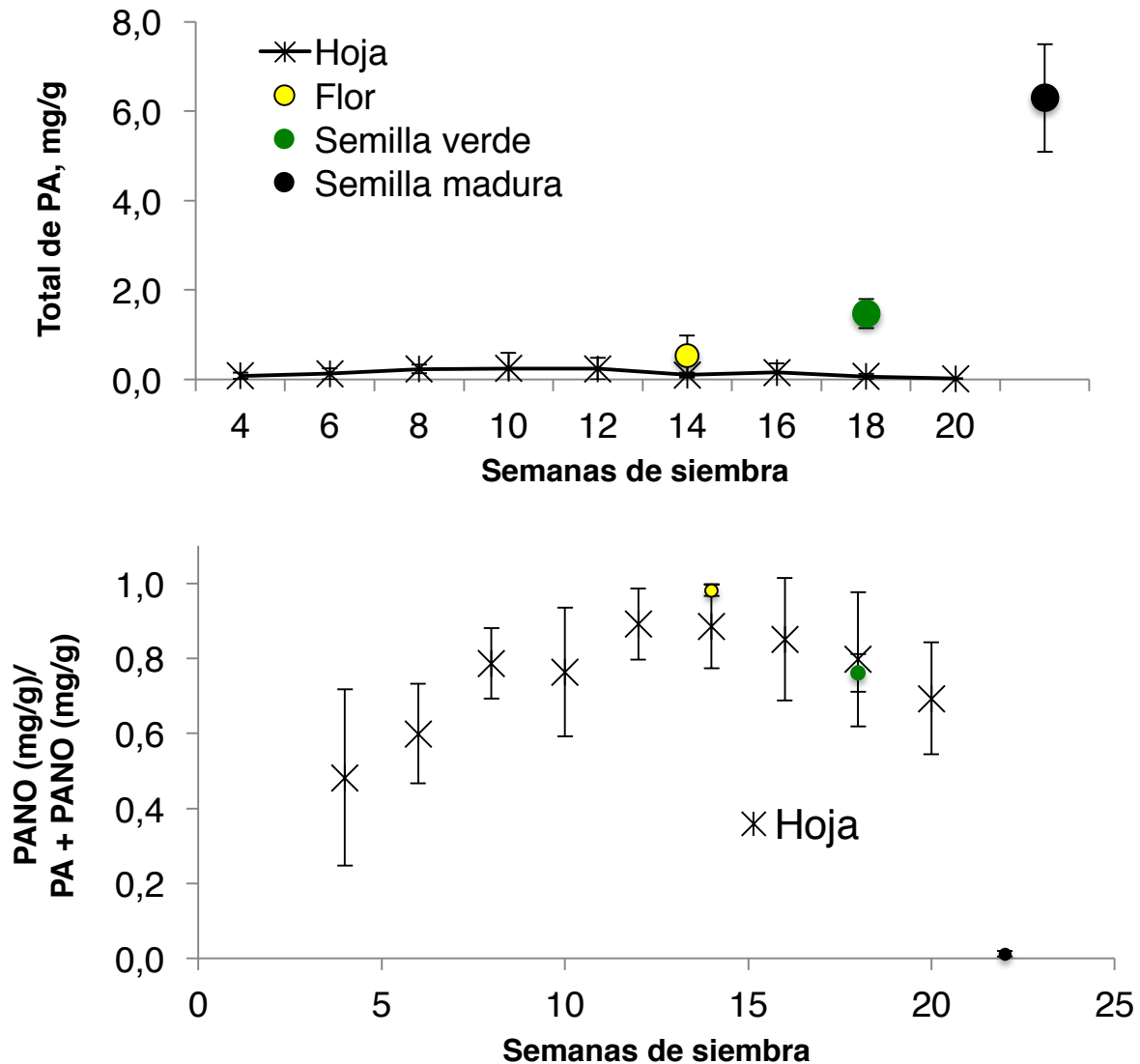
Alcaloide	Rango linealidad. ng/mL	Pendiente $\pm$ desviación estándar	Intercepto $\pm$ desviación estándar	R <sup>2</sup>	LOD, ng/mL (S/N)	LOQ, ng/mL
Monocrotalina	11-550	9,71 x10 <sup>3</sup> $\pm$ 2,1 x10 <sup>1</sup>	2,8 x10 <sup>4</sup> $\pm$ 5,4 x10 <sup>3</sup>	0,998	0,4 (4,1)	1,2

**4.3 Alcaloides pirrolizidínicos en diferentes estados de crecimiento de *C. Nitens*.**

En la **Figura 28** se muestra la variación de la concentración de PA (mg de PA/g de muestra), durante las 22 semanas de muestreo de las diez plantas de *C. nitens* cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM.

Según Hartmann T, 1989, p.177, la biosíntesis de los PA se lleva a cabo en la raíz de la planta, en donde ellos se encuentran principalmente como *N*-óxidos. Los PA en forma de *N*-óxidos se caracterizan por ser moléculas polares, solubles en agua. Estas características facilitan su transporte vía floema hacia las vacuolas de las células de los demás tejidos de la planta. Hartmann afirma que, a pesar de que el mecanismo de rompimiento del enlace N-O característico de los *N*-óxidos de los PA no está establecido claramente, dicha ruptura puede atribuirse a factores enzimáticos o a procesos naturales de envejecimiento de la planta, por lo que se espera que la concentración de PA aumente en los tejidos maduros de la planta; esto se observó (**Figura 28**), cuando la semilla madura presentó mayor concentración de PA (6 mg/g), mientras que en los tejidos verdes, *e.g.*, hojas, flores y raíces, la concentración de PA no superó los 2 mg/g.

El caso contrario se observa en el apartado B de la **Figura 28**, en donde la relación de PANO/PA en los tejidos verdes de la planta varió entre el 0,50 y 0,90, mientras que, para la semilla madura, la relación de PANO/PA puede considerarse despreciable. Las variaciones de los PA y de PANO en hojas de *C. nitens* durante las 22 semanas de muestreo no fueron significativas, tal como se observa en la **Figura 28**.



**Figura 28.** A. Variación de la concentración de PA (mg/g) en diferentes órganos de *C. nitens*. B. Relación PANO/PA en diferentes órganos de *C. nitens*. Datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10 plantas).

Por otro lado, la concentración de PA para hojas apicales de *C. nitens* (0,3 mg/g), fue significativamente más que en las hojas basales (**Tabla 12**) de esta misma especie (0,05 mg/g). Hasta donde los autores tienen conocimiento, en la literatura no existen reportes sobre la concentración de PA en tejidos de *C. nitens*; sin embargo, para especies como *C. spectabilis*, la concentración de PA en hojas se encuentra en un rango de 0,03-0,88 mg/g. Estudios realizados en Australia y Brasil (Fletcher, 2008, p. 311; Flores, 2009, p.459) han determinado la concentración de PA en taxones de diversas especies de *Crotalaria*. Los rangos de concentración

de los PA totales se encuentran entre 0 y 22 mg/g. Según Vrieling K, 1993, p.1141, la concentración de metabolitos secundarios en los tejidos de una planta puede variar dependiendo de la edad o de la posición de dichos tejidos. El análisis de hojas de la planta de *Senecio vulgaris* demostró que la concentración de PA en hojas apicales (1,49 mg/g) superaba significativamente la concentración de PA en hojas basales (0,05 mg/g). Otros estudios como el realizado por Cabrera *et al.*, 2017, p.53, en plantas de *Moringa oleifera*, demostraron, que dependiendo de la edad y de la altura de las plantas existe variación de la concentración de diversos metabolitos secundarios, entre ellos, alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos.

Los alcaloides totales respecto a la edad de la planta no variaron significativamente: 0,68 mg/g, a los 12 meses, y 0,65 mg/g, a los 18 meses; sin embargo, la variación se hizo significativa cuando se analizó respecto a las hojas apicales (0,73 mg/g) y basales (0,68 mg/g). Braeckman *et al.*, 1999, p.231, atribuyeron esta variación de la concentración de metabolitos secundarios en tejidos jóvenes y tejidos maduros de las plantas, al uso de las defensas móviles (cualitativas), y al uso de defensas inmóviles (cuantitativas). Según Braeckman *et al.*, 1999, p.231 el autor los tejidos jóvenes requieren defensas que garanticen su rápido crecimiento (móviles), mientras que los tejidos maduros requieren defensas de tipo lignina o taninos, cuya presencia sea constante, garantizando su protección y un gasto energético mínimo. Esto demostró la influencia de la edad y posición de las hojas respecto a la concentración de metabolitos en las plantas, específicamente, de los alcaloides, que son los analitos de interés en este trabajo. La **Tabla 12** muestra la cuantificación de PA totales y el porcentaje de PANO presentes en los distintos tejidos de las plantas de *C. nitens*, entre ellos, hojas apicales y hojas basales.

**Tabla 12.**

*Concentración de PA y relación de PANO/PA en distintas partes de plantas de C. nitens.*

Parte de la planta	Total PA, mg/g	PANO/(PA+PANO)
Semilla madura	6 ± 3,4	0,01
Semilla verde	2 ± 2,4	0,7
Flor	0,9 ± 0,7	1,0
Hoja apicales	0,3 ± 0.1	0,9
Hoja basal	0,05 ± 0,02	0,8
Raíz	0,3 ± 0,2	0,8

Esta primera fase del experimento mostró que no hay variación notoria en la concentración de PA en hojas de *C. nitens* durante el crecimiento de la planta. Sin embargo, se observó variación de la concentración de PA según la posición de las hojas en la rama (basales o apicales). Este resultado mostró que el ensayo de herbivoría se podía hacer en cualquier edad de la planta, pero se debían muestrear todas las hojas de la planta para evitar dispersión de datos causada por la variación en el contenido de PA entre las hojas apicales y basales.

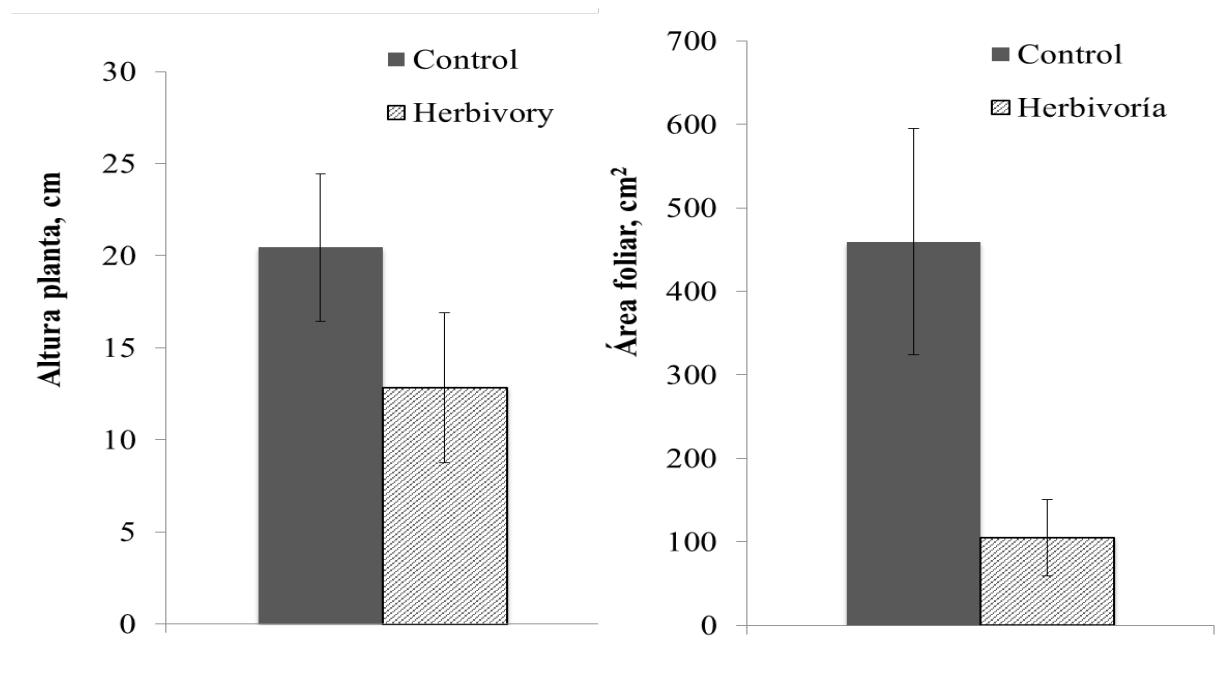
#### **4.4 Efecto de la herbivoría con *u. Ornatix* sobre el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en *c. Nitens***

En este experimento, se usaron plantas de 43 días de edad, se dejaron 12 días en interacción con la oruga *U. ornatix* y se muestrearon de nuevo a los 55 días de edad. Se monitorearon la altura, el área foliar y la concentración de los PA en las plantas control y en las plantas atacadas por herbivoría.

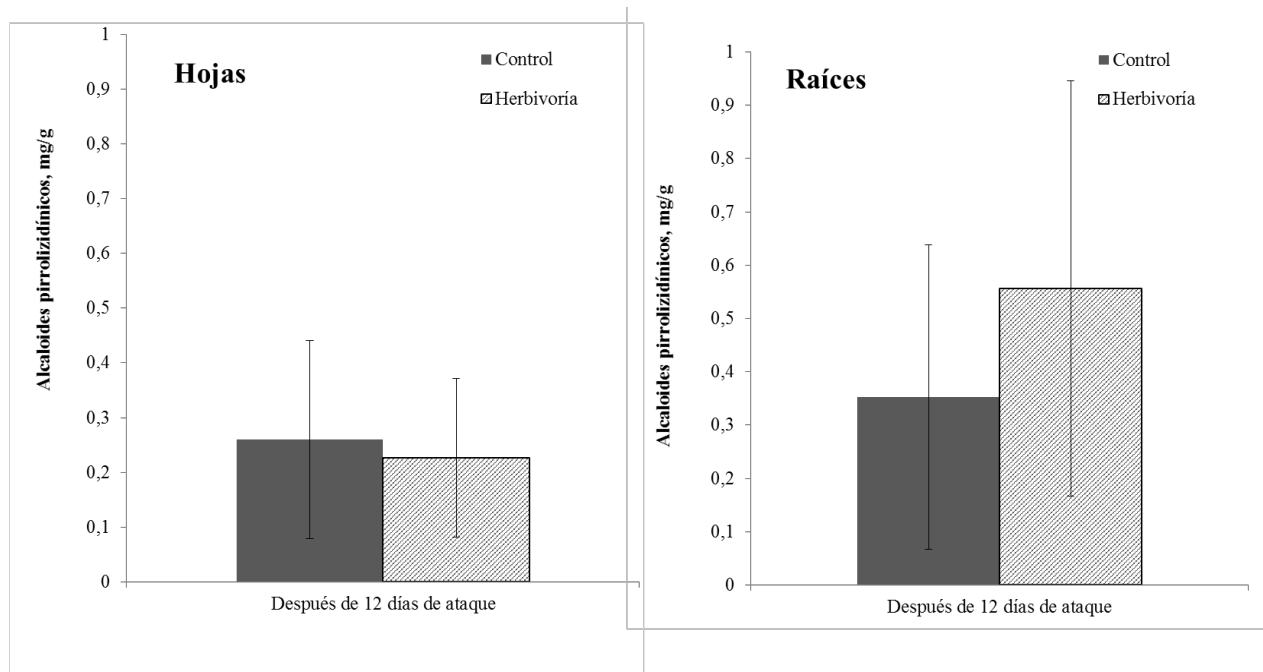
Según Granados D, 2008, p.51, la herbivoría debida al ataque de cualquier insecto, parasito u hospedero, es un proceso que afecta significativamente los procesos metabólicos de la planta, tanto primarios como secundarios, compromete su valor adaptativo relacionado con procesos fisiológicos como el crecimiento, área foliar y germinación de la vaina anticipada, entre otros.

En la **Figura 29**, se observa que bajo las condiciones del experimento existe una disminución significativa en la altura y en el área foliar de aquellas plantas que se sometieron a herbivoría respecto a las de control. Las plantas control alcanzaron alturas promedio de 20 cm, mientras que las atacadas por herbivoría apenas llegaron a los 13 cm, hubo un retraso en su crecimiento de 7 cm en promedio. Las plantas sin ataque presentaban hojas verdes y grandes con área foliar promedio superior de 400 cm<sup>2</sup>, mientras que las atacadas por las orugas *U. ornatrix* perdieron más de la cuarta parte de las hojas presentando un área foliar promedio de 100 cm<sup>2</sup>. Esto demuestra que después de los 12 días de ataque, las orugas consumieron, en promedio, más de la cuarta parte de las hojas de la planta, afectando su proceso de crecimiento.

La **Figura 29** muestra que el ataque de la oruga sobre la planta generó cambio en el área foliar antes y después del ataque. Sin embargo, en la **Figura 30** se observa la variación en la concentración de PA en hojas y raíces de *C. nitens* antes y después del ataque con *U. ornatrix*.



**Figura 29.** Comparación del área foliar y la altura de las plantas de *C. nitens* sin ataque (control) y atacadas por orugas *U. ornatrix* (herbivoría). Datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10 plantas), intervalo de confianza: 90%.



**Figura 30.** Variación de la concentración de PA en: **A.** Raíces y **B.** Hojas de plantas de *C. nitens* antes y después del ataque con *U. ornatrix*. Datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10 plantas).

Según la **Figura 30**, a pesar del ataque de las orugas a las plantas de *C. nitens* no hubo un incremento significativo de la concentración de alcaloides pirrolizidínicos en hojas ni en raíces de las plantas bajo las condiciones del experimento. Es posible que la planta haya adoptado otros mecanismos de defensa contra este insecto especializado o siga otros patrones de adaptación, incluso, puede que haya existido *priming* proveniente de los volátiles de las plantas vecinas atacadas (Savvides, 2016, p. 329).

Según Berryman, 1988, p.39, este comportamiento puede explicarse por medio de la *teoría de asignación de recursos*, que sugiere que la capacidad defensiva de una especie se debe a la necesidad que esta tiene de reemplazar sus partes perdidas con base en los recursos a su disposición. En ese caso, la planta se enfocaría en los procesos que garanticen su supervivencia, es decir, crecer e incrementar su capacidad fotosintética. De esa forma, lo que la planta busca, es realizar procesos que involucren un costo energético bajo. Zangerl *et al.*, 1997, p. 433, afirman, que la síntesis de toxinas en la planta implica un costo energético muy alto a largo plazo, ya que la planta invierte no solo en su síntesis sino en su distribución y liberación. Esto quiere decir, que

la planta preferirá, bajo cualquier circunstancia, evitar un compromiso entre el gasto energético defensivo y el gasto energético reproductivo, siendo este segundo aquel que prime en sus procesos bioquímicos, lo que explica el hecho de que no exista variación significativa de la concentración de PA en *C. nitens*, antes y después del ataque por herbivoría.

## 5. Conclusiones

Se establecieron condiciones eficientes de extracción de PA por la técnica de extracción de dispersión de la matriz en fase sólida así; soporte sólido: gel de sílice modificada SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>; solvente de elución: MeOH con ácido fórmico al 2% (5 mL), y una relación muestra/soporte sólido 1:4.

Se identificaron usando GC-MS y LC-Orbitrap-MS cuatro alcaloides pirrolizidínicos en las plantas de *C. nitens*: moncorotalina, crispatina, integerrimina y 9-angeoil-retronecina y sus respectivos *N*-óxidos usando GC-MS y LC-Orbitrap-MS.

No se encontró variación en el contenido de PA durante el crecimiento de la planta; sin embargo, hubo variación significativa en el contenido de PA en las hojas apicales (0,05 mg/g) y basales (0,3 mg/g) de las plantas. Las semillas maduras contienen mayor concentración de PA respecto a semillas verdes, hojas, flores y raíces.

La siguiente concentración se determinó en diferentes partes de las plantas de *C. nitens* así: flores semillas maduras y verdes, hojas apicales y basales y raíces 0,9; 6,0; y 0,3; 0,05 y 0,3 y 0,3 mg/g de PA, respectivamente. En las semillas maduras no se encontraron PANO, mientras que en los demás órganos predominaron los *N*-óxidos.

Bajo las condiciones a las cuales se realizaron los experimentos de este trabajo de investigación, la herbivoría en hojas de *C. nitens* no alteró el contenido de PA en hojas y raíces de la planta. Sin embargo, después del ataque de las orugas *U. ornatix*, disminuyó el crecimiento de la planta en un 60% y se redujo su área foliar en 25%.

## 6. Recomendaciones

Realizar un análisis de la variación de la concentración de PA en plantas de *C. nitens*, antes y después de el estrés por herbivoría, bajo diferentes condiciones, por ejemplo, bajo ataques de estrés cortos (1-3 días), o utilizando un método de ataque diferentes a *U. ornatrix* (secreciones salivales de la oruga).

### Referencias

- Adams, R.; Gianturco, M. (1956). Crotalaria alkaloids: the structure of junceine. *Journal of the American Chemical Society*, 78(9), 1926-1928.H11:H15
- Altamirano, J. C., Gratz, S. R., Wolnik, K. A. (2005). Investigation of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in commercial comfrey-containing products and botanical materials by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 88(2), 406-412.
- Álvarez T. (2003). Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloidales en plantas del género *Crotalaria* y alimento contaminado para aves. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga-Colombia pp. 1-141.
- Asres, K., Sporer, F., Wink, M. (2004). Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(10), 915-930.
- Atal, C. K.; Sawhney, R. S. (1973). The pyrrolizidine alkaloids from Indian *Crotalarias*. *Indian J. Pharm.*, 35(1), 1-12.
- Baldwin, I.T., and Ohnmeiss, T.E. 1993. Alkaloid response to damage in *Nicotiana* sp. native to North America. *Journal of Chemical Ecology* 19:1143-1153.
- Barker, S. A. (2000). Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885(1), 115-127.
- Bennett, R. N.; Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617-633.
- Benson, W. W.; Brown Jr, K. S.; Gilbert, L. E. (1975). Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution*, pp. 659-680.

- Berryman, A. A. (1988). Towards a unified theory of plant defense. New York: Springer. pp. 39-55.
- Bowles, D. J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry*, 59(1), 873-907.
- Braeckman, B.; Smagghe, G.; Brutsaert, N.; Cornelis, R.; Raes, H. (1999). Cadmium uptake and defense mechanism in insect cells. *Environmental research*, 80(3), 231-243.
- Cabrera, J. L.; Jaramillo-Jaramillo, C.; Dután-Torres, F.; Cun-Carrión, J.; García, P. A.; de Astudillo, L. R. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*, 29(1), 53-60.
- Camarena Gutiérrez, G. (2009). Señales en la interacción planta - insecto. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 15(1), 81-85.
- Carius, H. J.; Little, T. J.; Ebert, D. (2001). Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55(6), 1136-1145.
- Carreras, M.; Pascualides, A.; Planchuelo, A. (2001). Comportamiento germinativo de las semillas de *Crotalaria incana* L. (Leguminosa) en relación a la permeabilidad de la cubierta seminal. *Agricultural Scientia*, 18(1), 45-50,
- Castellanos, I.; Espinosa F.J. (1997). Plants secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology* 25:591-602.
- Céspedes, A., Lapuente, C. (2003). Estudio comparativo de los efectos farmacológicos y toxicológicos atribuibles a alcaloides contenidos en plantas del género *Crotalaria*, en un modelo experimental murino. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(3), 41-44.

- Chennaveeraiah, M. S.; Patil, B. C. (1973). Chromosome number and karyotype study in eight species of *Crotalaria*. *Cytologia*, 38(1), 73-79.
- Christie, S. M.; Kropman, M.; Leisegang, E. C.; & Warren, F. L. (1949). 364. The senecio alkaloids. Part III. The structure of retrorsine and isatidine, and the isomerism of retronecic acid and isatinecic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1700-1702.
- Cogni, R., Futuyma, D. J. (2009). Local adaptation in a plant herbivore interaction depends on the spatial scale. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(3), 494-502.
- Conner, W. E.; Eisner, T.; Vander Meer, R. K.; Guerrero, A.; Meinwald, J. (1981). Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatix*): role of a pheromone derived from dietary alkaloids. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 9(3), 227-235.
- Cortez, V. (2013). Ecología química y perspectivas de su aplicación en la conservación de la biodiversidad. *Cuadernos de Biodiversidad*. 41(1), 16-21.
- Crawley, M. J. (1983). *Herbivory. The dynamics of animal-plant interactions*. London, UK: Blackwell, pp. 437.
- Crews, C., Berthiller, F., Krska, R. (2010). Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 327-338.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319.
- DaCosta, M. A. (2007). Phylogenetic studies of *Utetheisa* Hubner, the Rattle Box Moth, and Other Arctiines. *Zootaxa*, 1025: 1-94. 63.
- Dalin, P.; Ågren, J.; Björkman, C.; Huttunen, P.; Kärkkäinen, K. (2008). Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. Netherlands: Springer. pp. 89-105.

- De Castro, M. L., Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica acta*, 369(1-2), 1-10
- Dirzo, R.; Domínguez, C. A. (1995). Plant-herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forests. In: Bullock SH, Mooney HA, Medina E., eds. *Seasonal Dry Tropical Forests*. Cambridge: Cambridge University Press, 304–25.
- Dirzo, R.; Thompson, J. N. (2009). La coevolución y las enseñanzas de Darwin. *Ciencia Hoy*, 19(113), 43-48.
- Doss, R. P.; Oliver, J. E.; Proebsting, W. M.; Potter, S. W.; Kuy, S.; Clement, S. L.; DeVilbiss, E. D. (2000). Bruchins: insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU*, 97, 6218-6223.
- Dübecke, A.; Beckh, G.; Lüllmann, C. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 348-358.
- Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Brown, M.; Baker, P. N.; Redman, C. W.; Kenny, L. C.; Kell, D. B. (2008). Metabolic profiling of serum using ultra performance liquid chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 288-298.
- Edwards, R.; Gatehouse, J.A. (1999). Secondary metabolism. In: P.J. Lea., and R.C. Leegood (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. 384 p.
- Eloff, J. N.; van Rijssen, F. J.; Naudé, T. W.; Joubert, J. P. J. (2003). What levels of potentially toxic seed should be allowed in grains in South Africa? I. Background and pyrrolizidine alkaloid-containing plants. *South African Journal of Science*, 99(7-8), 337-344.

- Eskilsson, C. S., Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:29-66.
- Fashe, M. M.; Juvonen, R. O.; Petsalo, A.; Rahnasto-Rilla, M.; Auriola, S.; Soininen, Pasanen, M. (2014). Identification of a new reactive metabolite of pyrrolizidine alkaloid retrorsine:(3H-pyrrolizin-7-yl) methanol. *Chemical Research in Toxicology*, 27(11), 1950-1957.
- Feinsinger, P. (1983). Coevolution and pollination; in: *Coevolution* (Eds) D. J. Futuyma and M. Slatkin. Sunderland UK: Sinauer. pp. 282-310.
- Fenny, P. (1975). Biochemical coevolution between plants and their insect herbivores. *Coevolution of animals and plants*. University of Texas Press, Austin, *Journal of Animal Ecology*, 13(24), 1-8.
- Fischler, M.; Wortmann, C.; Feil, B. (1999). *Crotalaria* (*C. ochroleuca* G. Don.) as a green manure in maize-bean cropping systems in Uganda. *Field Crops Research*, 61(2), 97-107.
- Fletcher, M. T., McKenzie, R. A., Blaney, B. J., Reichmann, K. G. (2008). 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., de Azevedo Tozzi, A. M. G., Trigo, J. R. (2009). Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 459-469.
- Flores, A. S.; Tozzi, A. (2008). Phytogeographical patterns of *Crotalaria* species (Leguminosae-Papilionoideae) in Brazil. *Rodriguésia*, 9: 477-486.

- Forbes, W. (1960). *Lepidoptera of New York and neighboring states. Part IV. Agaristidae through Nymphalidae*. New York: Cornell University. pp. 187-188.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M. W. (2004). Pyrrolizidine alkaloids—genotoxicity,
- González, A.; Rossini, C.; Eisner, M.; Eisner, T. (1999). Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5570-5574.
- Granados, D.; Ruíz-Puga, P.; Barrera-Escorcía, H. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 14(1), 51-64.
- 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.
- Henry Yesid Bernal M. (1986). *Flora de Colombia: 4. Crotalaria*. Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia: Editoriales de la Imprenta Nacional, pp. 3-93.
- Hirschfelder, J. O. (Ed.). (2009). *Advances in Chemical Physics, Volume 12: Intermolecular Forces (Vol. 24)*. John Wiley & Sons.
- Hodkinson I.D. (2012). *Insect Herbivory*. New York, USA: Chapman & Hall, pp. 77.
- Huang, T. T., Geng, T., Akin, D., Chang, W. J., Sturgis, J., Bashir, R., Ladisch, M. R. (2003). Micro-assembly of functionalized particulate monolayer on C18-derivatized SiO<sub>2</sub> surfaces. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(4), 416-427.
- Jiang, Z., Liu, F., Goh, J. J. L., Yu, L., Li, S. F. Y., Ong, E. S., Ong, C. N. (2009). Determination of senkirkinine and senecionine in *Tussilago farfara* using microwave-assisted extraction and

pressurized hot water extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 79(2), 539-546.

Jolivet, P. (1986). Insects and plants: parallel evolution and adaptations. *Flora & Fauna Publications*. 2(1), 187-189.

Karsholt, O.; Razowski, J. (1996). *The Lepidoptera of Europe: a distributional checklist*. Strenstpur, Dinmark: Apollo Books. pp. 91-96.

Kempf, M.; Reinhard, A.; Beuerle, T. (2010). Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), 158-168.

Kempf, M.; Wittig, M.; Reinhard, A.; von der Ohe, K.; Blacquièrre, T.; Ræzke, K. P.; Beuerle, T. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 332-347.

Komarova, E. L., & Tolkachev, O. N. (2001). The chemistry of peptide ergot alkaloids. Part 1. Classification and chemistry of ergot peptides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 35(9), 504-513.

Kutchan, T. M. (1995). Alkaloid biosynthesis [mdash] the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell*, 7(7), 1059.

Levin, D. A., & York, B. M. (1978). The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6(1), 61-76.

Linneo, C. (1958). *Species plantarum*. London, The Royal Society: Laurentii Salvii, pp.169-237.

Lu, W.; Clasquin, M. F.; Melamud, E.; Amador-Noguez, D.; Caudy, A. A.; Rabinowitz, J. D. (2010). Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 82(8), 3212-3221.

- Luna, L. H. (2009). Descripción del ciclo biológico de *Utetheisa ornatrix venusta* (Dalm) (Lepidoptera: Arctiidae) con una dieta artificial. *Centro Agrícola*, 36(4), 79-84.
- Macel, M. (2011). Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant–insect interactions. *Phytochemistry Reviews*, 10(1), 75-82.
- Macel, M.; Vrieling, K.; Klinkhamer, P. G. (2004). Variation in pyrrolizidine alkaloid patterns of *Senecio jacobaea*. *Phytochemistry*, 65(7), 865-873.
- Makarov, A.; & Scigelova, M. (2010). Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 3938-3945.
- Mattocks, A. R. (1986). Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Georgia, USA: Academic Press, (pp 175 -242).
- Mc Lean, E. K. (1970). The toxic actions of pyrrolizidine (Senecio) alkaloids. *Pharmacological Reviews*, 22(4), 429-483.
- McNaughton, S. J. (1983). Physiological and ecological implications of herbivory. In *Physiological Plant Ecology III* (pp. 657-677). Springer Berlin Heidelberg.
- metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, 36(1), 155.
- Miller, R. (1967). *Crotalaria* seed morphology, anatomy, and identification (Nº. 1373). Washington DC, US: Department of Agriculture, pp. 205-215.
- Mithöfer, A.; Boland, W.; Maffei, M. E. (2009). Chemical Ecology of plant-insect interactions. In: Parker, J. (Ed.), *Annual Plant Reviews, Molecular Aspects of Plant Disease Resistance*. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell. pp. 261-291.

- Müller, E. C. (2006). Mass Spectrometry: ESI. In: Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. Springer: Berlin, Heidelberg, pp. 1020-1022.
- Neal, W. M., Rusoff, L. L., Ahmann, C. F. (1935). The Isolation and Some Properties of an Alkaloid from *Crotalaria spectabilis* Roth. *Journal of the American Chemical Society*, 57(12), 2560-2561.
- Neuner-Jehle, N., Nesvadba, H., Spiteller, G. (1965). Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt: Pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 96(2), 321-338.
- Pease Jr, R. W. (1968). Evolution and hybridization in the *Utetheisa ornatrix* complex (Lepidoptera: Arctiidae). I. Inter-and intrapopulation variation and its relation to hybridization. *Evolution*, 22(1), 719-735.
- Pilbeam, D. J.; Lyon-Joyce, A. J.; & Bell, E. A. (1983). Occurrence of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline in *Crotalaria* seeds. *Journal of Natural Products*, 46(5), 601-605.
- Quiroz, A. D. (1978). Venoms of Lepidoptera. In *Arthropod Venoms*. Berlin Heidelberg: Springer. pp. 555-611.
- Reichelt, M.; Brown, P. D.; Schneider, B.; Oldham, N. J.; Stauber, E.; Tokuhisa, J.; Gershenzon, J. (2002). Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 59(6), 663-671.
- Roberts, M. F. (2013). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.
- Rosenthal, G. A.; Berenbaum, M. R. (2012). *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites: Ecological and Evolutionary Processes*. Lexington, Kentucky. Academic Press. pp. 291-299.

- Roughgarden, J. (1976). Resource partitioning among competing species a coevolutionary approach. *Theoretical Population Biology*, 9(3), 388-424.
- Salazar Yepes, M.; Buriticá Céspedes, P. (2008). Nuevas especies para la uredobiota neotropical. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 61(1).
- Sancho, F.; Cervantes, C. (1997). El uso de plantas de cobertura en sistemas de producción de cultivos perennes y anuales en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 21(1), 111-120.
- Savvides, A., Ali, S., Tester, M., Fotopoulos, V. (2016). Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible? *Trends in Plant Science*, 21(4), 329-340.
- Schaller, A. (2010). *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Stuttgart, Alemania: Springer, pp. 462.
- Sepúlveda-Jiménez, G.; Porta-Ducoing, H.; Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-362.
- Signoretti, A. G. C., Nava, D. E., Bento, J. M. S., Parra, J. R. P. (2008). Biology and thermal requirements of *Utetheisa ornatrix* (L.) (Lepidoptera: Arctiidae) reared on artificial diet. *Braz. Archives of Biology and Technology*, 51, 447-453.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L. (2014). Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons; New York, EE-UU, pp. 37-120.
- Sippel, W. L. (1964). Crotalaria poisoning in livestock and poultry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 111(1), 562-570.

- Skoog, D. A.; West, D. M. (1980). Principles of instrumental analysis. Philadelphia: Saunders College. (pp. 814-816).
- Slatkin, M. (1970). Selection and polygenic characters. Proceedings of the National Academy of Sciences, 66(1), 87-93.
- Sourakov, A.; Locascio, L. M. (2013). Exotic *Crotalaria* species (Fabales: Fabaceae) as host plants of the ornate Bella moth, *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Erebidae), in Florida. Florida Entomologist, 96(2), 344-350.
- Stashenko, E. (2011). Productos “sin químicos” y algunas hazañas e historias de los químicos. Innovación y Ciencia (Colombia), 18(1), 42-58.
- Stashenko, E. (2011). Productos sin químicos y algunas hazañas e historias de los químicos. Innovación y Ciencia, 3(1), 41-58.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R. (2010). GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. Scientia Chromatographica, 2(3), 33-59.
- Stashenko, E., Martínez, J. (2009). ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica. Scientia Chromatographica, 1, 23-33.
- Stashenko, E.; Martínez, J. R.; Castrillón, J. (2014). Aplicación del método de dispersión de matriz en fase sólida al aislamiento de hidrocarburos de rocas bituminosas. Boletín de Geología, 36(1), 29-35.
- 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.

Storey, G. K.; Aneshansley, D. J.; Eisner, T. (1991). Parentally provided alkaloid does not protect eggs of *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae) against entomopathogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology*, 17(4), 687-693.

Suquilanda, M. (1996). *Agricultura orgánica, alternativa tecnológica del futuro*. Edic. UPS, Fundagro. Quito-Ecuador, 185-186.

Thurman, E. M. (1998). *Solid-phase extraction: principles and practice*. Chemical analysis; 147.

Tilman, D.; Reich, P. B.; & Isbell, F. (2012). Biodiversity impacts ecosystem productivity as much as resources, disturbance, or herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10394-10397.

Tomer, K. B. (2001). Separations combined with mass spectrometry. *Chemical Reviews*, 101(2), 297-328.

translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 177(1), 98-107.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.

Villar, D. (2007). Factores que predisponen a la ingestión de plantas tóxicas por el ganado. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2).

Vrieling, K.; de Vos, H.; van Wijk, C. A. (1993). Genetic analysis of the concentrations of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio jacobaea*. *Phytochemistry*, 32(5), 1141-1144.

Wagner, G. J. (1991). Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*, 96(1), 675-679.

- Westoby, M.; Falster, D. S.; Moles, A. T.; Vesk, P. A.; Wright, I. J. (2002). Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 125-159.
- White, G. A.; Haun, J. R. (1965). Growing *Crotalaria juncea*, a multi-purpose legume, for paper pulp. *Economic Botany*, 19(2), 175-183.
- Wiedenfeld, H.; Röder, E.; Bourauel, T.; Edgar, J. A. (2008). Pyrrolizidine alkaloids: structure and toxicity.
- Williams, M. C.; Molyneux, R. J. (1987). Occurrence, concentration, and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed Science*, 36(1), 476-481.
- Windler, D. R. (1974). A systematic treatment of the native unifoliolate *Crotalaria*s of North America (Leguminosae). *Rhodora*, 76(806), 151-204.
- Wink, M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M. Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 p.
- Wink, M.; and Schimmer, O. (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. pp. 17-134. In: M. Wink M. (ed.). *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic Press. Sheffield, England.
- Wink, M.; Meisner, C.; & Witte, L. (1995). Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38(1), 139-153.
- Zangerl, A. R.; Arntz, A. M.; Berenbaum, M. R. (1997). Physiological price of an induced chemical defense: photosynthesis, respiration, biosynthesis, and growth. *Oecologia*, 109(3), 433-441.

Zhang, W.; Huai, W.; Zhang, Y.; Shen, J.; Tang, X.; Xie, X.; 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 Standards. *Phytochemical Analysis*. 28(5), 361-473.

## APÉNDICES

**Anexo A.** Espectros de masas de **i) Crispatina** ( $M^+$ ,  $m/z$  309) y **ii) Intergerrimina** ( $M^+$ ,  $m/z$  335). Ionización por impacto de electrones (EI, 70 eV).

## i) Crispatina

