

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Obtención y caracterización mediante cromatografía y espectrometría de masas de los extractos aislados de hojas y flores de *Argyreia nervosa* (Fam. Convolvulaceae).

Héctor Duván URIBE VARGAS

Proyecto de grado para optar al título de Químico

Directora:

Elena E. STASHENKO,

Química, Ph.D.

Codirector:

Cristian A. OLIVEROS,

Químico, MSc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

Agradecimientos

A mis amados padres, Omaira y Héctor, quienes han trabajado incansablemente para que pueda desempeñar mis estudios, a mis hermanas Nury y Julia, que me han apoyado y comprendido siempre, a mi hermosa y amada sobrina Victoria, quien vino al mundo para darnos alegría y amor, a mi nono Jorge, por todas sus anécdotas compartidas que me inspiraron, a mi cuñado Pacho, por todos sus consejos y motivación.

A mis amigos, Josafat, Jhon, Fabian, Tatis, Guiby, Hazard, Brayan, Santiago, Mandón, Erick y un largo etcétera. A ellos agradezco por toda la amistad, alegrías y enseñanzas compartidas.

A los profesores Elena Stashenko y Jairo René Martínez, por la inmensa e inagotable labor que realizan como maestros, motivándonos a ser grandes personas, amantes de la historia, las artes y la filosofía. A mi codirector y maestro de la vida Cristian, por todos los conocimientos y tiempo brindado en la realización de este trabajo. A los compañeros del CENIVAM, Roger, Lady, Juan C, Felipe, Andrés G, Sheilla, Katherine, por orientarme y enseñarme muchas cosas en el trabajo.

A la Universidad Industrial de Santander, a la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Química, por la formación académica.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Contenido

	Pág.
1. Introducción	13
2. Marco referencial	15
2.1. Marco conceptual	15
2.1.1. <i>Argyreia nervosa</i>	15
2.1.2. Metabolitos secundarios	16
2.1.3. Obtención de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles	19
2.1.4. Identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles.....	20
2.2. Marco de antecedentes	21
2.3. Objetivo del trabajo	27
3. Metodología	28
3.1. Reactivos	28
3.2. Recolección del material vegetal de <i>A. nervosa</i>	29
3.3. Obtención de los extractos a partir de las hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	29
3.3.1. Extracción con solvente asistida con ultrasonido	29
3.3.2. Dispersión de la matriz en fase sólida	30
3.4. Obtención de extractos a partir de las semillas de <i>A. nervosa</i>	31
3.5. Obtención de la fracción volátil a partir de las flores de <i>A. nervosa</i>	32
3.5.1. Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza.....	32
3.6. Análisis instrumental.....	33
3.6.1. Caracterización química de los compuestos volátiles en los extractos	33
3.6.2. Condiciones de análisis GC-MS.....	34
3.6.3. Caracterización química de los compuestos no volátiles en los extractos	34
3.6.4. Condiciones de análisis LC-MS	35
3.6.5. Contenido de metabolitos no volátiles en extractos de <i>A. nervosa</i>	36
4. Resultados	37
4.1. Pérdida de peso del material vegetal de hojas de <i>A. nervosa</i>	37
4.2. Influencia del tipo de solvente y la concentración sobre los rendimientos de extracción de hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	38
4.3. Caracterización de metabolitos volátiles presentes en los extractos de hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	39

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

4.3.1.	Metabolitos volátiles en hojas de <i>A. nervosa</i>	40
4.3.2.	Patrones de fragmentación por impacto de electrones (70 eV) en GC-MS de los compuestos identificados en extractos de hojas de <i>A. nervosa</i>	44
4.3.3.	Metabolitos volátiles en flores de <i>A. nervosa</i>	48
4.3.4.	Patrones de fragmentación por impacto de electrones (70 eV) en GC/MS de los compuestos identificados en extractos de flores de <i>A. nervosa</i>	50
4.3.5.	Fracción volátil de las flores de <i>A. nervosa</i>	52
4.4.	Caracterización de metabolitos no volátiles presentes en los extractos de hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	56
4.4.1.	Metabolitos no volátiles en hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	56
4.5.	Contenido de metabolitos no volátiles en los extractos de hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	68
4.6.	Alcaloides ergolínicos en <i>A. nervosa</i>	69
5.	Discusión y análisis de resultados	80
6.	Conclusiones	91
7.	Referencias	93
8.	Apéndice.....	104

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>A. nervosa</i>	16
Tabla 2. Resultados de la pérdida de peso de las hojas de <i>A. nervosa</i> secadas a la sombra.	38
Tabla 3. Identificación por GC/MS (full scan) de los extractos de hojas de <i>A. nervosa</i>	42
Tabla 4. Identificación por GC/MS (full scan) de los extractos MSPD a partir de flores de <i>A. nervosa</i>	49
Tabla 5. Identificación por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de las flores de <i>A. nervosa</i>	53
Tabla 6. Identificación por LC/MS de los compuestos no volátiles en extractos de hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	61
Tabla 7. Contenido en mg/g de extracto de los compuestos identificados en los extractos de hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	68
Tabla 8. Identificación por LC/MS de los alcaloides ergolínicos en extractos de semillas de <i>A. nervosa</i>	73

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. A. Flor; B. Hoja y C. Semillas, de plantas de <i>A. nervosa</i> que crecen en las parcelas experimentales del complejo agroindustrial piloto CENIVAM. Fotografías tomadas por el autor.	15
Figura 2. Estructuras moleculares de metabolitos secundarios reportados en <i>Argyreia nervosa</i> y algunas plantas pertenecientes a la misma familia.	18
Figura 3. Desarrollo cronológico de las publicaciones científicas sobre <i>Argyreia nervosa</i> . Nota: Base de datos Scopus (Elsivier). Periodo de observación: 2000 – 2022. Palabra clave: “ <i>Argyreia AND nervosa</i> ”. Fecha de consulta: diez de noviembre de 2022.	22
Figura 4. Top diez de revistas científicas donde se reportan publicaciones sobre <i>A. nervosa</i> . Periodo de observación: 2000 – 2022. Palabra clave: “ <i>Argyreia AND nervosa</i> ”. Fecha de consulta: diez de noviembre de 2022.	22
Figura 5. Esquema general de la metodología usada en la presente investigación.	28
Figura 6. Parcelas experimentales de <i>A. nervosa</i> en cultivo propagado por esquejes.	29
Figura 7. Montaje de la técnica extracción con solvente usada en la investigación. A. Proceso de filtrado. B. Extractos liofilizados.	30
Figura 8. Esquema metodológico de la técnica MSPD usado en la investigación.	31
Figura 9. Esquema metodológico de la técnica MSPD usado para la obtención de alcaloides ergolínicos en la investigación.	32
Figura 10. Montaje de la técnica HS-SPME usado en la investigación.	33
Figura 11. Equipos analíticos instrumentales usados en el estudio. A. GC-MS. B. UHPLC-ESI-HRMS-Q-Orbitrap.	35
Figura 12. Curva de secado de las hojas de <i>A. nervosa</i>	37
Figura 13. Rendimientos de extracción de las hojas y flores de <i>A. nervosa</i> obtenidos en cada técnica.	39
Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan) de los compuestos mayoritarios identificados en extractos de hojas de <i>A. nervosa</i> . A. Extractos MSPD obtenidos con acetona. B. Extractos MSPD obtenidos con etanol al 50 % v/v.´	41

Figura 15. Porcentaje de las familias de compuestos mayoritarios identificados en los extractos MSPD de hojas de <i>A. nervosa</i> . A. Extractos MSPD obtenidos con acetona. B. Extractos MSPD obtenidos con etanol 50 % v/v.	43
Figura 16. Espectro de masas (EI, 70 eV) del β -Sitosterol, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona.	45
Figura 17. Espectro de masas (EI, 70 eV) del β -tocoferol, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona.	46
Figura 18. Espectro de masas (EI, 70 eV) del neofitadieno, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona.	46
Figura 19. Espectro de masas (EI, 70 eV) del fitol, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona y etanol 50 % v/v.....	47
Figura 20. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto N° 17, mayoritario en los extractos MSPD de hojas obtenidos con etanol 50 % v/v. M^{+} , m/z 416, (I %): m/z 164 (98 %), m/z 147 (67 %), m/z 120 (18 %), m/z 91 (13 %) y m/z 55 (24 %).	47
Figura 21. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan) de los compuestos mayoritarios identificados en extractos MSPD de las flores de <i>A. nervosa</i>	48
Figura 22. Porcentaje de las familias de compuestos mayoritarios identificados en los extractos MSPD de las flores de <i>A. nervosa</i>	50
Figura 23. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto N° ocho, presente en los extractos MSPD de flores. (I %), m/z 164 (98 %), m/z 147 (58 %), m/z 120 (22 %), m/z 91 (13 %), m/z 73 (28 %) y m/z 57 (22 %).	51
Figura 24. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto N° 10, mayoritario en los extractos MSPD de flores. M^{+} (I %), m/z 388, (I %): m/z 164 (98 %), m/z 147 (59 %), m/z 120 (18 %), m/z 91 (13 %) y m/z 55 (14 %).	52
Figura 25. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan) de los compuestos mayoritarios identificados en la fracción volátil de las flores de <i>A. nervosa</i>	53
Figura 26. Porcentaje de las familias de compuestos mayoritarios presentes en la fracción volátil de las flores de <i>A. nervosa</i>	55
Figura 27. Perfiles cromatográficos obtenidos por LC/MS (corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas y deprotonadas ($[M+H]^{+}$, $[M-H]^{-}$) de los compuestos identificados en las hojas de <i>A. nervosa</i>	59

Figura 28. Perfiles cromatográficos obtenidos por LC/MS (corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas y deprotonadas ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) de los compuestos identificados en las flores de <i>A. nervosa</i>	60
Figura 29. A. Espectro de masas de la molécula deprotonada $[M-H]^-$ adquirido en modo SIM del ácido 1,3-dicafeonilquínico. B. Espectro de masas de la sustancia de referencia ácido 1,3-dicafeonilquínico.....	63
Figura 30. A. Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$ adquirido en modo SIM del kaemferol-3-O-rutinósido. B. Espectro de masas de la sustancia de referencia kaemferol-3-O-rutinósido.....	64
Figura 31. A. Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$ adquirido en modo SIM del triptófano. B. Patrón de distribución isotópica obtenido para el triptófano.	65
Figura 32. A. Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$ adquirido en modo SIM del posible esteroide. B. Patrón de distribución isotópica obtenido para el compuesto.	66
Figura 33. Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) observados en los espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides de tipo kaemferol-3-O-glicosilados identificados en la especie <i>A. nervosa</i>	67
Figura 34. Contenido en mg/g de los ácidos cafeoilquínicos identificados en los extractos de hojas y flores de <i>A. nervosa</i>	69
Figura 35. Perfil cromatográfico (corrientes iónicas extraídas de las masas exactas de las moléculas protonadas y deprotonadas ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) de las sustancias detectadas en los extractos de semillas de <i>A. nervosa</i>	72
Figura 36. A. Espectro de masas obtenido en modo SIM de la molécula protonada $[M+H]^+$ del material de referencia certificado LSD. B. Formación de los iones fragmento característicos para el LSD.	76
Figura 37. A. Espectro de masas obtenido en modo SIM de la molécula protonada $[M+H]^+$ de la sustancia LSA detectada en los extractos de semillas de <i>A. nervosa</i> . B. Formación de los iones fragmento característicos para el LSA.	77
Figura 38. Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) observados en los espectros de masas de los AEs de tipo ácido lisérgico identificados en la especie <i>A. nervosa</i>	78
Figura 39. Metabolitos secundarios identificados en los extractos de hojas, flores y semillas de <i>A. nervosa</i> en la presente investigación.	79

Abreviaturas y acrónimos

CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales.
CROM- MASS	Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas.
DB-5MS	Columna cromatográfica apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano).
DB-WAX	Columna cromatográfica apolar de polietilenglicol.
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> (Por ejemplo).
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
GCxGC-MS	<i>Comprehensive Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases complete acoplada a espectrometría de masas).
HCD	<i>High Energy Collision-Dissociation Cell</i> (Celda de colisiones de alta energía).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de alta resolución)
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (Es decir, esto es).
LSA	<i>D-Lysergic Acid Amide</i> (Amida de ácido lisérgico)
MS	Mass Spectrometry (Espectrómetro de masas, espectro de masas, según el contexto).
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida)
<i>m/z</i>	<i>Mass-to-Charge Ratio</i> (relación masa/carga).

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

<i>Orbitrap</i> -MS	Analizador de masas <i>Orbitrap</i>
SE	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solventes)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Resonancia magnética nuclear)
TFC	<i>Total Flavonoids Content</i> (Contenido total de flavonoides)
TPC	<i>Total Phenolics Content</i> (Contenido total de fenoles)
TOF-MS	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo, analizador de masas)
UIS	Universidad Industrial de Santander
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia)
FABMS	<i>Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry</i> (Bombardeo rápido de átomos)
EIMS	<i>Electronic Ionization Mass Spectrometry</i> (Ionización electrónica de espectrometría de masas)
AUE	<i>Assited ultrasonic solvent extraction</i> (Extracción con solvente asistida con ultrasonido)

Resumen

Título: Obtención y caracterización mediante cromatografía y espectrometría de masas de los extractos aislados de hojas y flores de *Argyrea nervosa* (Fam. Convolvulaceae).

Autor: Héctor Duván Uribe Vargas**

Palabras clave: *Argyrea nervosa*, metabolitos secundarios, LC/MS, GC/MS.

Descripción:

En esta investigación, se estudiaron los metabolitos secundarios volátiles y no volátiles presentes en los extractos de hojas y flores de la planta *Argyrea nervosa*. Para la obtención de los extractos se usaron dos técnicas, a saber: dispersión de la matriz en fase sólida y extracción con solvente asistida con ultrasonido. La identificación de los metabolitos secundarios se llevó a cabo por técnicas de cromatografía acoplada a espectrometría de masas, *i.e.*, GC/MS y UHPLC-ESI⁺-HRMS-Q-Orbitrap. Por GC/MS se compararon los índices de retención lineal obtenidos en columnas cromatográficas de fase estacionaria apolar (DB-5MS) con los reportados en la literatura y la comparación de los patrones de fragmentación obtenidos (EI, 70 eV) con los disponibles en bases de datos espectrales. El análisis por LC/MS se realizó mediante el estudio de las masas exactas de las moléculas protonadas y deprotonadas, la determinación de la fórmula molecular y el estudio de la distribución isotópica de cada compuesto. Los resultados obtenidos reflejaron variaciones en los rendimientos y la composición química de los extractos según el tipo de solvente y su polaridad. Los extractos de hojas y flores mostraron ser una fuente de metabolitos secundarios volátiles (diterpenos, triterpenos oxigenados, ácidos cinámicos y grasos, esteroides, *etc.*) y no volátiles (flavonoides, ácidos cafeoilquínicos, cumarinas, *etc.*). El alto contenido de ácido 1,3-dicafeoilquínico en los extractos mostró que la planta *A. nervosa* puede tener gran potencial, como material de partida para la incorporación y desarrollo de bioproductos en la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia, agropecuaria, entre muchas otras.

*Trabajo de investigación.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Pregrado en Química. Dirección: Elena E. Stashenko.

Abstract

Title: Obtaining and characterization by chromatography and mass spectrometry of extracts isolated from leaves and flowers of *Argyreia nervosa* (Fam. Convolvulaceae).

Author: Héctor Duván Uribe Vargas**.

Keywords: *Argyreia nervosa*, secondary metabolites, LC/MS, GC/MS.

Description:

In this research, the volatile and non-volatile secondary metabolites present in the extracts of leaves and flowers of the plant *Argyreia nervosa* were studied. Two techniques were used to obtain the extracts, namely solid-phase matrix dispersion and ultrasound-assisted solvent extraction. The identification of secondary metabolites was carried out by chromatography coupled to mass spectrometry techniques, i.e., GC/MS and UHPLC-ESI+--HRMS-Q-Orbitrap. The strategy used for the identification of volatile and nonvolatile secondary metabolites consisted of the interpretation and comparison of chromatographic data with mass spectrometric data. By GC/MS, the linear retention indices obtained in apolar stationary phase chromatographic columns (DB-5MS) were compared with those reported in the literature and the fragmentation patterns obtained (EI, 70 eV) were compared with those available in spectral databases. The LC/MS analysis was performed by studying the exact masses of the protonated and deprotonated molecules, determining the molecular formula and studying the isotopic distribution of each compound. The results obtained reflected variations in the yields and chemical composition of the extracts according to the type of solvent and its polarity. Leaf and flower extracts were shown to be a source of volatile (diterpenes, oxygenated triterpenes, cinnamic and fatty acids, sterols, etc.) and non-volatile (flavonoids, caffeoylquinic acids, coumarins, etc.) secondary metabolites. The high content of 1,3-dicaffeoylquinic acid in the extracts showed that the *A. nervosa* plant has the potential to be a promising plant in Colombia, as a starting material for the incorporation and development of bioproducts in the pharmaceutical, cosmetic, food, agricultural and livestock industries, among many others.

*Graduation Project.

**Science Faculty. School of Chemistry. Undergrate in Chemistry. Direction: Elena E. Stashenko.

1. Introducción

Los usos medicinal, religioso y recreativo de las plantas son prácticas muy antiguas, en las cuales se aprovechan las propiedades biológicas, psicotrópicas, alimenticias, entre otras, que brindan los metabolitos secundarios presentes en los diferentes órganos de las plantas (Firn y Jones 2003; Petrovska, 2012).

Los metabolitos secundarios en las plantas son biosintetizados para el cumplimiento de funciones especiales, *e. g.*, polinización, adaptación, comunicación, defensa, entre otros (Mithofer y Boland, 2012; Lone y col., 2020). Las familias más representativas son los terpenos, los alcaloides, los flavonoides, entre muchos otros. Los metabolitos secundarios poseen propiedades fisicoquímicas (polaridad, temperatura de ebullición, peso molecular, *etc.*) muy diferentes, que permiten y definen el tipo de técnica para su obtención e identificación (Guo y col., 2022).

Argyreia nervosa (Fam. *Convolvulaceae*) es una liana trepadora y perenne, originaria de India, que crece en varias zonas tropicales, especialmente, en las orillas de ríos y lagos. La planta *A. nervosa* ha sido ampliamente usada por comunidades en América, Asia y África, como medicina tradicional en el tratamiento de distintos padecimientos y enfermedades (Joseph y col., 2011). Los extractos de *A. nervosa* poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, espermatogénica, entre otras (Rasool y col., 2021; Vyas y Raval, 2020; Shreedhara y col., 2009).

En este trabajo de grado, se estudiaron los metabolitos secundarios volátiles y no volátiles presentes en los extractos de las hojas y flores de *A. nervosa*. Los extractos fueron obtenidos por las técnicas de dispersión de la matriz en fase sólida y extracción con solvente. Los rendimientos obtenidos y la composición química de los extractos variaron según el tipo de solvente utilizado. El análisis por GC/MS y UHPLC/ESI⁺-HRMS-Q-Orbitrap permitió la identificación de diversas moléculas que podrían ser de interés y con alto potencial para incorporarlas en el desarrollo de bioproductos con valor agregado en la industria farmacéutica, cosmética, agropecuaria y alimenticia de Colombia y el mundo.

Los resultados parciales de esta investigación se presentaron en un evento científico:

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

3rd IBEROAMERICAN Conference on Mass Spectrometry. Rj, 2022. Modalidad póster. Trabajo titulado: LC/MS Study of ergoline alkaloids isolated from *Argyreia nervosa* (Convolvulaceae) seeds. Rio de Janeiro, Brasil, 15 de diciembre de 2022.

2. Marco referencial

2.1. Marco conceptual

2.1.1. *Argyreia nervosa*

La familia de las Convolvuláceas contiene alrededor de 55 géneros y 1600-1700 especies, crecen en los trópicos y con algunas excepciones en las zonas templadas. Asia, América y algunas regiones de África, son los sitios de origen de dicha familia. *Argyreia nervosa* ha sido utilizada como agente afrodisíaco, espermatogénico y tónico cerebral en la medicina tradicional hindú y por varias comunidades en Centroamérica. Actualmente, sus semillas son usadas de forma recreacional, debido al contenido de alcaloides ergolínicos (AEs) con propiedades psicotrópicas, como una alternativa más económica al consumo de alucinógenos, (Austin, 1997; Lo Faro y col., 2020).

A. nervosa es una liana trepadora y perenne originaria del subcontinente indio, que posee hojas reniformes que miden 10-28 cm de largo y 8-17 de ancho, sus flores son de coloración rosalila con un tamaño de 6-7 cm de largo y sus semillas levemente triangulares de color marrón, con un tamaño de 5 mm de ancho (Galani y col., 2010). Las fotografías de la flor, hoja y semillas de *A. nervosa* se muestran en la **Figura 1** y la descripción taxonómica de la planta en la **Tabla 1**.

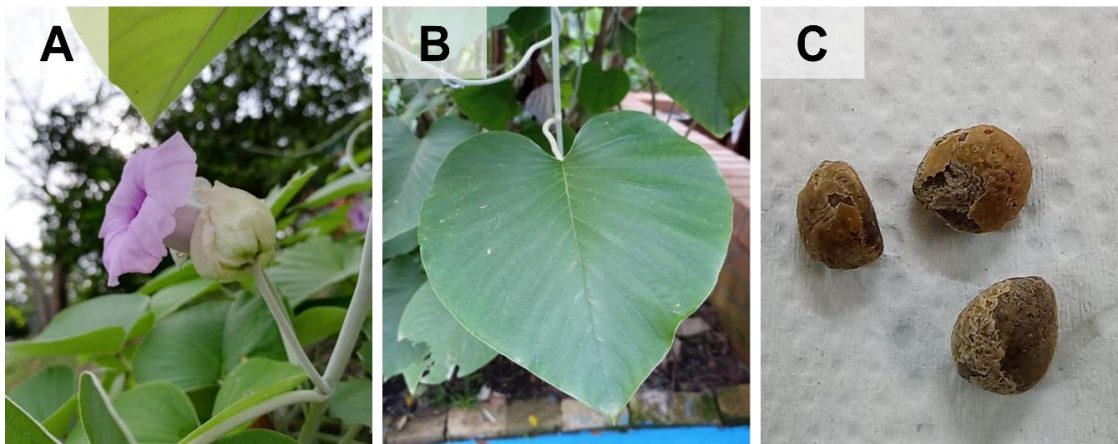


Figura 1. A. Flor; B. Hoja y C. Semillas, de plantas de *A. nervosa* que crecen en las parcelas experimentales del complejo agroindustrial piloto CENIVAM. Fotografías tomadas por el autor.

Tabla 1.*Descripción taxonómica de A. nervosa*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Super-División	Spermatophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Ateridae
Orden	Solanales
Familia	Convolvulaceae
Género	<i>Argyreia</i>
Especie	<i>nervosa</i>
Sinonimia	<i>Argyreia speciosa</i> , <i>sweet convolvulus nervosus</i> , <i>sweetconvolvulus speciosus</i> , <i>Santaloides minus</i>

2.1.2. Metabolitos secundarios

Las plantas poseen dos tipos de rutas metabólicas: primaria y secundaria. La ruta primaria produce las proteínas, aminoácidos, lípidos, entre otros; estos compuestos cumplen procesos fisiológicos básicos para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los productos generados a partir de la segunda ruta corresponden a los metabolitos secundarios, que se encargan de la relación e interacción de la planta con su entorno, para llevar a cabo procesos de comunicación, polinización, defensa ante organismos patógenos o herbívoros, estimulación en la fijación de oxígeno, entre otros. Los metabolitos secundarios son una familia amplia de compuestos y de naturaleza química diversa, agrupa a los terpenos, terpenoides, flavonas, flavonoles, antocianidinas, alcaloides, esteroides, taninos, péptidos, tocoferoles, entre otros (Salam y col., 2023).

Un grupo representativo son los terpenos, definidos como hidrocarburos construidos por unidades de isopropeno y se clasifican según el número de carbonos en su estructura, *e.g.*, monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), etc. Son de naturaleza apolar y poseen temperaturas de ebullición entre 100-220 °C, que los hace fácilmente volatilizables. Los terpenos volátiles son los principales

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

componentes en los aceites esenciales, un producto que se obtiene por técnicas destilativas a partir de las plantas (Singh y Sharma, 2015).

Los flavonoides son metabolitos secundarios que poseen el núcleo estructural de la 1,4 y 1,2-benzopirona, son de naturaleza polar, alto peso molecular y poco volatilizables. Están presentes en muchos alimentos y flores y existen numerosas investigaciones sobre su gran potencial de actividad biológica, como agentes antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, etc. Los flavonoides se obtienen por técnicas de extracción (Días y col., 2021).

Los alcaloides son otra importante familia de metabolitos secundarios, se caracterizan por poseer al menos un átomo de nitrógeno en su estructura y son, en general, de naturaleza básica (con algunas excepciones). Tienen un amplio rango de actividades farmacológicas, que incluyen, vasodilatadores, antiasmáticos, analgésicos, psicotrópicos, entre otros (Roy, 2017). Se obtienen con extracciones acuosas a pH básico y usando solventes orgánicos para aislarlos en su forma básica (sus formas ácidas a pH ácido). Las estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios reportados en plantas de *A. nervosa* y plantas del género *Argyria* se muestran en la **Figura 2**.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

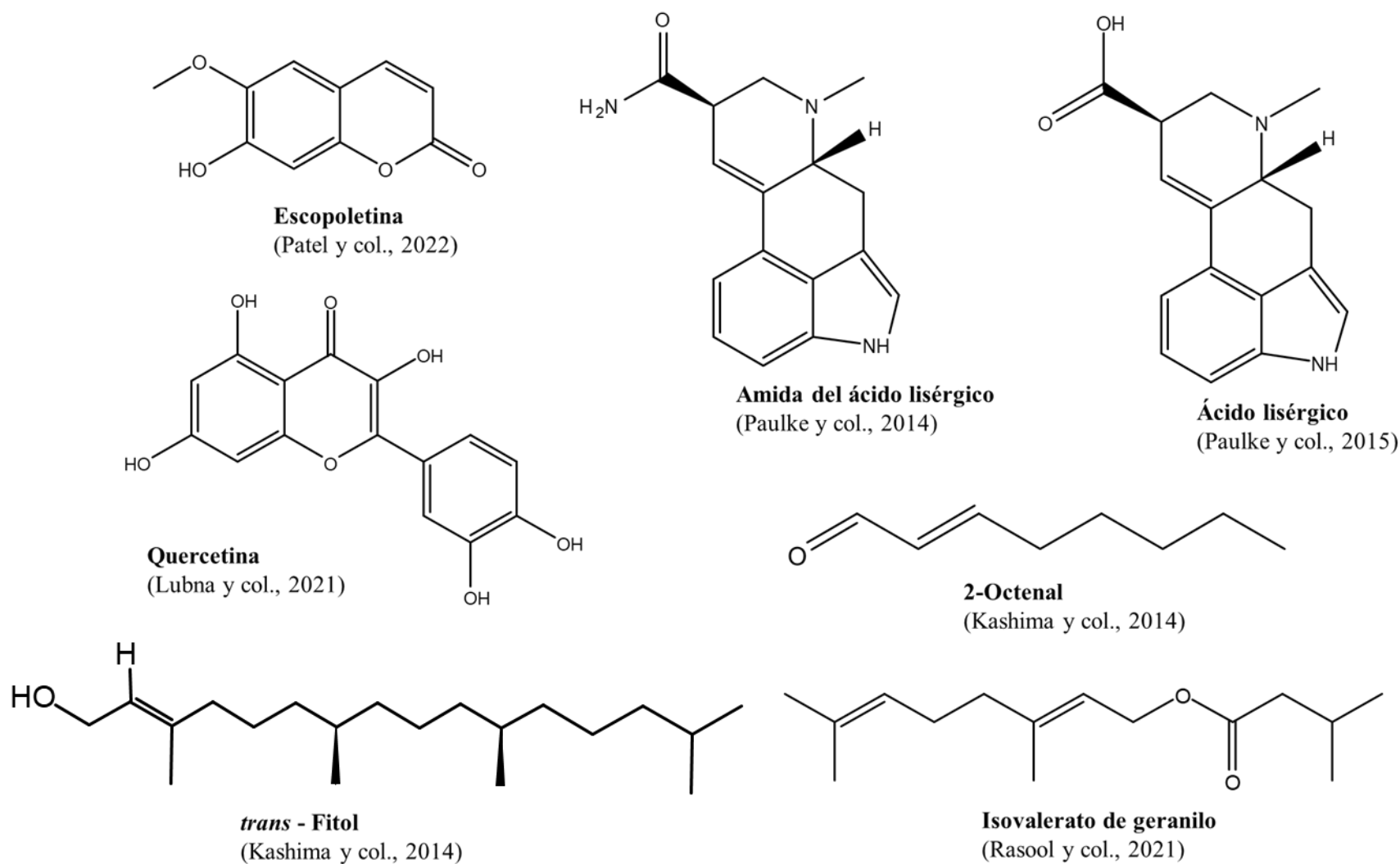


Figura 2. Estructuras moleculares de metabolitos secundarios reportados en *Argyrea nervosa* y algunas plantas pertenecientes a la misma familia.

2.1.3. Obtención de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles

De las plantas se aíslan los compuestos volátiles por medio de la destilación, en ella, el material vegetal seco o fresco se somete a un calentamiento, luego, el vapor obtenido es condensado y colectado. El producto que se obtiene es una sustancia de olor intenso y textura oleosa denominada aceite esencial. Los aceites esenciales son ricos en compuestos tipo terpenoides y resalta su uso para la fabricación de bioproductos en la industria cosmética, agropecuaria, alimenticia, de la perfumería, entre otros (Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Existen moléculas volátiles que se obtienen por técnicas de extracción, en este caso se utiliza un solvente para extraer dichos analitos (polares o apolares, dependiendo del solvente), también, existen otras técnicas que se basan en el principio de adsorción donde se usa un soporte sólido para realizar un tratamiento previo en la matriz y posteriormente realizar la elución de estos.

En la técnica de extracción con solvente (por sus siglas en inglés, SE), ocurre un proceso de extracción sólido-líquido convencional, el material vegetal es molido, macerado y filtrado, luego, el solvente es retirado por rotoevaporación o secado con un gas (nitrógeno) y llevado a liofilización para retirar la humedad. Existen modificaciones que permiten mejorar la eficiencia de extracción, como en la técnica de extracción asistida con ultrasonido (por sus siglas en inglés, AUE), allí, las ondas mecánicas de alta frecuencia rompen la matriz vegetal y permiten al solvente realizar una extracción más rápida y completa de los analitos.

La técnica de dispersión de la matriz en fase sólida (por sus siglas en inglés, MSPD), usa un soporte sólido que adsorbe los analitos de la matriz, el soporte sólido es mezclado en proporciones determinadas con el material vegetal y la mezcla se homogeneiza en un mortero para romper las paredes vegetales, con ayuda de un solvente (isopropanol) hasta lograr un polvo fino y seco, luego, la mezcla es empaquetada en un cartucho de jeringa y se realiza la elución con un solvente a través de este. La técnica de MSPD requiere cantidades muy bajas de solvente comparada con SE y es versátil para la obtención selectiva de diferentes analitos que están presentes en concentraciones muy bajas en la matriz (Barker, 2007).

La composición química de los extractos de las plantas varía dependiendo de la técnica y los solventes utilizados, en estos se pueden encontrar moléculas volátiles, *e.g.*, diterpenos, triterpenos, esteroides, tocoferoles y no volátiles, *i. e.*, flavonoides, ácidos fenólicos y algunos alcaloides, entre

muchos otros. Existen numerosas investigaciones que reportan la alta gama de actividades biológicas que poseen los extractos de las plantas como productos anticancerígenos, antioxidantes, antiinflamatorios, antifúngicos, antidiuréticos, *etc* (Veiga y col., 2020).

2.1.4. Identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles

En la caracterización química de los metabolitos volátiles se utiliza la cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, GC-MS); en GC-MS, se usa un gas como fase móvil que arrastra los compuestos y permite la separación en la columna cromatográfica según su polaridad o temperaturas de ebullición (columna polar o apolar, respectivamente), luego, el efluente llega a la entrada del espectrómetro de masas, que está a una temperatura de 250 °C y pasa a la cámara de ionización donde se ionizan y fragmentan las moléculas ser separadas y detectadas en corrientes iónicas (Marriott y col., 2001). En los extractos también existen componentes ligeramente volátiles y termoestables que se logran identificar por cromatografía de gases, en este caso, se utiliza una columna de naturaleza apolar para la separación (Vivaldo y col., 2017).

Los compuestos menos volátiles y termolábiles requieren el uso de cromatografía líquida para evitar procesos de descomposición por las altas temperaturas que trabaja GC, en este caso, se utiliza un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, LC-MS), en el cual los analitos van disueltos en la fase móvil (generalmente, una mezcla de acetonitrilo, agua y metanol) y se separan en una columna de material adsorbente. El efluente llega a una interfaz que une al cromatógrafo con el detector de masas para obtener el espectro. Para el análisis de la composición química de los extractos se usa esta técnica (Saibaba y col., 2016).

La cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (por sus siglas en inglés, UHPLC-ESI-HRMS-*Orbitrap*), permite una mayor separación de los compuestos debido a que el tamaño de partícula del material adsorbente en la columna es alrededor de 1,35 μm y maneja altas presiones, esto hace que los analitos que coeluyen a tiempos muy cercanos puedan ser diferenciables. Al salir del cromatógrafo, el efluente llega a la interfaz de electronebulización a presión atmosférica (por sus siglas en inglés, ESI), allí los analitos se ionizan

y son dirigidos por un sistema de lentes hacia el analizador, donde son filtrados según su m/z por el cuadrupolo Q-Exactive, para pasar al *C-trap* que se encarga de enviar paquetes de iones (un millón de iones) directamente a la trampa de iones (*Orbitrap*) para su separación y detección o a la cámara de colisiones activadas (por sus siglas en inglés, HCD) donde se fragmentan y generan iones producto que vuelven al detector. La alta resolución de UHPLC/ESI-HRMS-*Orbitrap* permite una clara identificación de los compuestos por sus masas exactas y bajo los criterios de la determinación del patrón isotópico, la determinación de la fórmula elemental y el estudio del patrón de fragmentación para cada compuesto (López y col., 2019).

2.2. Marco de antecedentes

La consulta sobre el estado actual de las investigaciones de *A. nervosa* se realizó usando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*). Se usó la ecuación de búsqueda (TITTLE-ABS-KEY “*Argyreia* AND *nervosa*”) para el periodo 2000-2022 y se tuvieron en cuenta tres tipos de documentos, a saber: documentos primarios (publicaciones indexadas), secundarios y patentes. La fecha de consulta fue el diez de noviembre de 2022. El número de documentos publicados sobre *A. nervosa* en función de los años para cada tipo de documento se muestra en la **Figura 3**.

Las diez revistas científicas en donde hubo mayor número de publicaciones sobre *A. nervosa* presentadas en forma decreciente fueron: *Drug Invention Today* (6), *Journal of Ethnopharmacology* (5), *Forense Science International* (4), *Phytochemistry*, *Journal of Natural Remedies* (3) y otras (**Figura 4**).

En la búsqueda se refleja la tendencia predominante hacia la identificación de los metabolitos presentes en los extractos a partir de hojas y raíces de *A. nervosa* y el estudio de su actividad biológica en diferentes medios celulares bacterianos y animales. Otro tema que destaca es el estudio los alcaloides presentes en las semillas y su estudio toxicológico debido al consumo como planta psicotrópica. A continuación, se presentan algunas de las investigaciones científicas que muestran las evidencias de dichos estudios.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

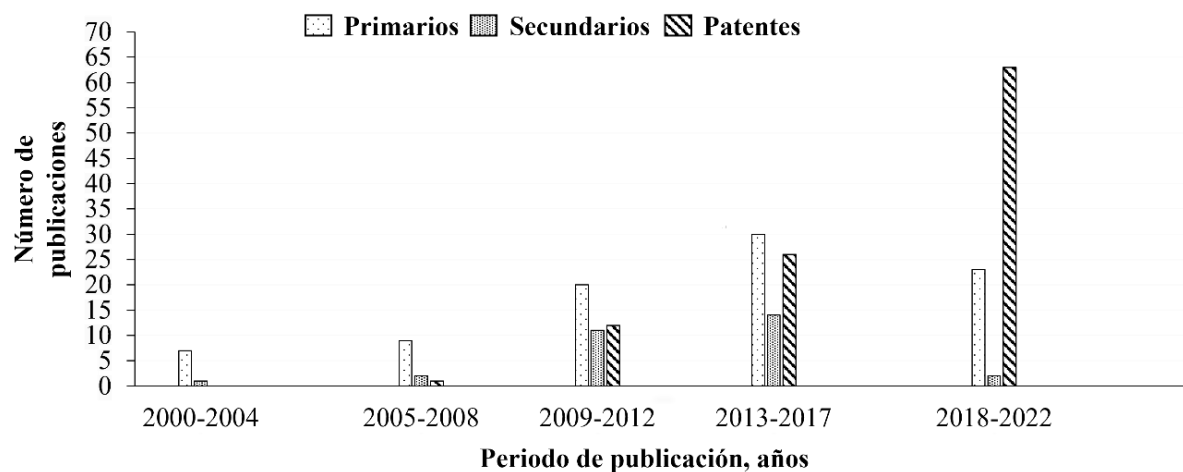


Figura 3. Desarrollo cronológico de las publicaciones científicas sobre *Argyreia nervosa*. Nota: Base de datos Scopus (Elsivier). Periodo de observación: 2000 – 2022. Palabra clave: “*Argyreia* AND *nervosa*”. Fecha de consulta: diez de noviembre de 2022.

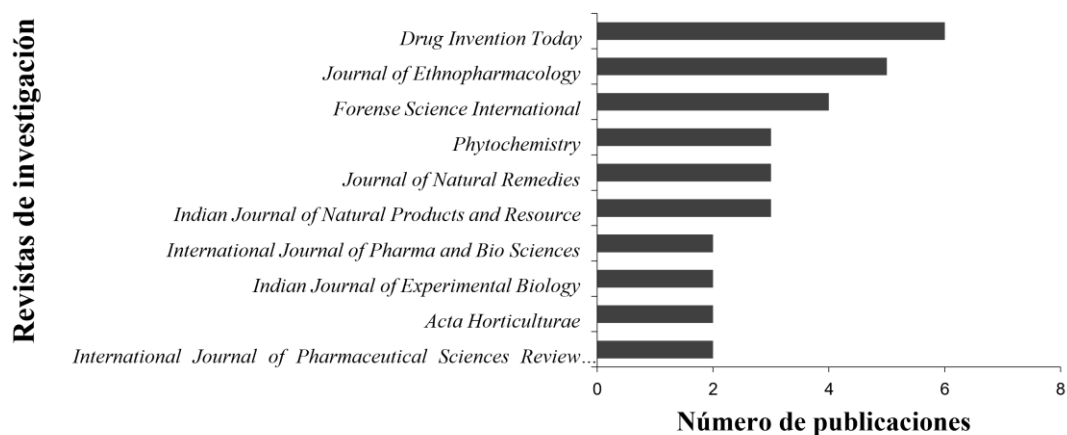


Figura 4. Top diez de revistas científicas donde se reportan publicaciones sobre *A. nervosa*. Periodo de observación: 2000 – 2022. Palabra clave: “*Argyreia* AND *nervosa*”. Fecha de consulta: diez de noviembre de 2022.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Patel y col., 2022, evaluaron los efectos de los extractos de las raíces de *A. nervosa* sobre la biosíntesis de testosterona y la espermatogénesis de ratas albinas. En la investigación, se obtuvo un extracto metanólico con 800 g de raíces y un rendimiento de 18,75 %, a partir de este extracto, se obtuvieron dos fracciones con *n*-butanol y acetato de etilo y se aisló la escopoletina de esta última. El efecto de las fracciones fue medido en diferentes muestras de tejido testicular (*in vivo*) y líneas celulares TM-3 (*in vitro*), observando la variación de ARN mensajero (ARNm) encargado de la expresión de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (por sus siglas en inglés, StAR) y la enzima 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). Con la técnica de cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa, también, determinaron la cantidad de testosterona y colesterol. Los autores observaron un incremento estadísticamente significativo en la cantidad de testosterona y de ARNm con un aumento en la actividad de la enzima 3 β -HSD en los tejidos y células. La fracción de escopoletina mostró ser un compuesto con actividad espermatogénica.

Vyas y Raval 2020, estudiaron el potencial afrodisiaco y espermatogénico de las raíces de *A. nervosa* en ratas. En este caso, obtuvieron fracciones separadas de alcaloides por cromatografía de capa fina (por sus siglas en inglés, TLC) y analizaron su influencia en la síntesis de testosterona en las células de Leydig. El peso de los órganos sexuales, la cantidad total de espermatozoides y el comportamiento sexual fueron algunos de los parámetros de estudio. Las fracciones fueron suministradas en dosis de 10, 25 y 50 mg/kg y mostraron incrementos en los sueros de testosterona (100 %) y colesterol (146,7 %) en las ratas. El resultado fue similar al reportado por Patel *et al.* (2022), los alcaloides presentes en las fracciones de las raíces de *A. nervosa* mostraron actividad espermatogénica.

Rasool y col., 2021, estudiaron la actividad anticancerígena del isovalerato de geranilo, aislado de las fracciones de acetato de etilo provenientes de los extractos acuosos de hojas de *A. nervosa*. En el estudio, utilizaron cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS, para la identificación y cuantificación del isovalerato de geranilo. Fueron usadas líneas celulares de cáncer de colon (HCT116 y HT29) para evaluar la citotoxicidad con el ensayo colorimétrico del bromuro de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Se evidenció una disminución de la viabilidad celular a medida que se aumentaba la dosis del compuesto aislado. Los extractos de

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

hojas de *A. nervosa* pueden ser material de partida para la fabricación de un medicamento alternativo en el tratamiento del cáncer de colon rectal.

Kalvakunta y col., 2021, evaluaron también la actividad antioxidante de las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos acuosos de hojas de *A. nervosa*. Para el estudio se empleó el ensayo del radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y se usó el ácido ascórbico como estándar interno. Las nanopartículas mostraron una inhibición del 69.71 % con respecto al del ácido ascórbico 70.71 %. Los resultados revelaron actividad antioxidante por parte de los extractos de *A. nervosa*.

Geetharani y col., 2020, realizaron estudios de la actividad antioxidante en extractos hidroetanólicos a partir de hojas de *A. nervosa*. La actividad fue medida por las técnicas del radical DPPH[•] y la capacidad de reducción del ion férrico (por sus siglas en inglés, FRAP). Los extractos exhibieron un porcentaje de inhibición del 60 % con respecto al estándar butilhidroxitolueno (BHT) en la técnica del radical DPPH[•] y 46 % con respecto al ácido ascórbico como estándar en la técnica FRAP. El resultado fue coherente con los mencionados anteriormente, los extractos de *A. nervosa* presentan una alta actividad antioxidante.

Otro estudio bastante robusto donde se evidencia la capacidad antioxidante de *A. nervosa* fue reportado por Shreedhara y col., 2009. En la investigación emplearon los extractos acuosos de las raíces de la planta. La actividad antioxidante fue medida con los siguientes ensayos, a saber: radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrihidracilo), decoloración del catión radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]), peroxidación lipídica, capacidad del anión superóxido, capacidad quelante de metales, capacidad antioxidante total, entre otros. Los resultados obtenidos en todos los ensayos reflejaron que los extractos poseen gran potencial antioxidante.

De los estudios anteriores, se observa una profundización sobre el estudio de la actividad biológica de la planta, lo cual permite entender el hecho que la planta haya sido utilizada desde la antigüedad por varias comunidades en la India para el uso en la medicina tradicional. No obstante, pocos estudios profundizan en la identificación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos de la planta, su separación, elucidación estructural y la implementación de técnicas de alta resolución para el estudio de la composición química en los extractos.

Mishra y col., 2015, determinaron el contenido total de flavonoides (TFC), fenoles (TPC) y evaluaron la actividad antioxidante en los extractos de las hojas de *A. nervosa*. La concentración

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

total de fenoles fue hallada por el método del reactivo de Folin-Ciocalteu y la cantidad total de flavonoides con el ensayo de cloruro de aluminio. La actividad antioxidante fue evaluada, según la metodología de Prieto y col., (1999). También, los investigadores estudiaron la influencia de los solventes agua, etanol, metanol y acetato de etilo sobre el porcentaje de extracción. El solvente con el cual se obtuvo un mayor porcentaje de rendimiento fue el agua (7.68 %), con el cuál se obtuvo el mayor contenido de fenoles TPC y flavonoides TFC expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada g de muestra 110.8 mg GAE/g y 76.6 mg GAE/g, respectivamente. La actividad antioxidante más alta se obtuvo en el extracto acuoso (1.16 mg GAE/g). Los resultados revelaron que el uso de un solvente polar permite obtener extractos de mejor calidad.

En el estudio reportado por Mann y col., 1999, se realizó la identificación de los flavonoides en los extractos metanólicos de las raíces de *A. nervosa*. En la investigación, usaron 150 g de raíces y se obtuvieron fracciones con *n*-butanol, luego, cada fracción fue separada en una columna cromatográfica de gel de sílice, usando la mezcla eluyente de acetato de etilo, metanol y agua (79:11:10). Para la identificación de los compuestos usaron espectrometría de masas con bombardeo de átomos acelerados (por sus siglas en inglés, FABMS), ionización electrónica (por sus siglas en inglés, EIMS) y resonancia magnética nuclear (por sus siglas en inglés, NMR). En los extractos de *A. nervosa*, se identificaron los compuestos kaemferol 7-metoxi-3-sulfato y quercetina 3',7-dimetoxi-3-sulfato.

Los estudios presentados muestran un enfoque hacia los extractos de las hojas y raíces de *A. nervosa*, no obstante, las semillas de *A. nervosa* también son de gran interés y se refleja en las numerosas investigaciones que abordan los temas de la problemática que existe por el consumo recreativo de estas, debido a que contienen alcaloides ergolínicos, los aspectos medicinales que poseen dichos alcaloides, la identificación, cuantificación y elucidación estructural de algunos de estos compuestos.

En la revisión de Lo Faro y col., 2020, se reportaron los estudios biomédicos de las sustancias psicotrópicas, como el LSA (amida de ácido lisérgico), harmalina, DMT (N,N-dimetiltriptamina), provenientes de las plantas *A. nervosa*, *Banisteriopsis caapi*, *Psychotria viridis*, respectivamente. Se estudió el efecto alucinógeno de la ingesta de las semillas o productos derivados que contengan sus extractos, debido al contenido de alcaloides ergolínicos como LSA, ergometrina, ergometrinina, chanoclavina, lisergol, peniclavina y otros. Los alcaloides ergolínicos y los demás

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

psicotrópicos estudiados posiblemente interactúan con receptores de la dopamina del tipo D₂, involucrados en la inhibición de la enzima adenilil ciclasa, que actúa en la formación del nucleótido cíclico adenosin monofosfato (cAMP), un importante mensajero en la trasducción de señales intracelulares.

Paulke y col., 2015 estudiaron la composición química de las semillas de *A. nervosa*, en este caso, obtuvieron los extractos con metanol:agua (60:40 % v/v). Para la identificación usaron cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de masas de ionización química a presión atmosférica (por sus siglas en inglés, APCI) y un analizador de tiempo de vuelo con doble cuadrupolo (MicroTOF-QII) de alta resolución (HPLC-MicroTOF-QII). En el experimento, obtuvieron las corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ del LSA, m/z 268,15, ergometrina o ergometrinina, m/z 326,190, chanoclavina I o chanoclavina II, m/z 257,168, peniclavina, m/z 271,148, ácido lisérgico, m/z 269,132, entre otros. En el espectro de masas del LSA observaron el ion pico base característico en m/z 223,127 $[(M+H)-CONH_2]^+$, producto de la pérdida de 45 unidades, correspondiente al grupo amida, luego, el ion m/z 208,087 $[(M+H)-CONH_2-CH_3]^+$ debido a la pérdida sucesiva de un metilo a partir de la especie $[(M+H)-CONH_2]^+$; también, observaron los iones-producto m/z 251.118 $[(M+H)-NH_3]^+$ por la pérdida de amoniaco de la molécula protonada y el ion m/z 253,121 $[(M+H)-CH_3]^+$ debido a la pérdida del radical metilo. Las semillas de *A. nervosa* son una fuente de alcaloides ergolínicos que puede ser material de partida para la fabricación de bioproductos con propiedades farmacéuticas.

En conclusión, existen muchos reportes sobre el estudio de la composición química en los extractos de *A. nervosa*, su actividad biológica y el consumo de sus semillas como alternativa psicotrópica, no obstante, no existen reportes sobre el uso de nuevas técnicas como MSPD para la obtención de los extractos, tampoco existe información sobre los metabolitos volátiles en extractos de hojas y flores ni la cuantificación de nuevos metabolitos no volátiles en sus extractos. Por ello, se realizó un estudio de la composición química volátil y no volátil en los extractos de *A. nervosa* con la finalidad de aportar en la identificación y caracterización de los posibles metabolitos responsables de las propiedades ya estudiadas en la planta.

2.3. Objetivo del trabajo

El objetivo de esta investigación fue obtener los extractos a partir de hojas y flores de la planta *A. nervosa* utilizando diferentes técnicas de extracción y estudiar su composición química mediante técnicas de LC-MS y GC-MS. En el estudio se utilizaron las técnicas de extracción con solvente asistida con ultrasonido y dispersión de la matriz en fase sólida para la obtención de los extractos. Se determinó la composición química de los extractos. Se estudió la variación de los metabolitos presentes en cada órgano de la planta, se estudió la influencia de las técnicas de extracción sobre el rendimiento de los extractos y su composición química. Se compararon los metabolitos que fueron identificados por las técnicas de GC-MS y LC-MS. Se determinó si el tipo de solvente y la técnica de extracción influyeron sobre los diferentes metabolitos obtenidos.

3. Metodología

A continuación, en la **Figura 5** se muestra el esquema metodológico general, realizado en la presente investigación.

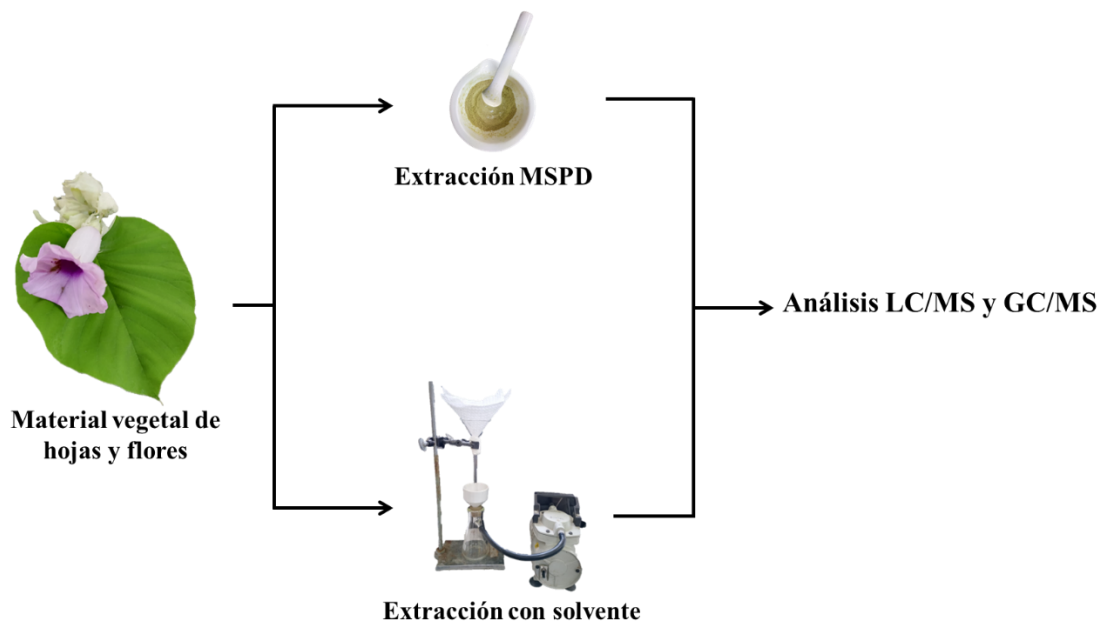


Figura 5. Esquema general de la metodología usada en la presente investigación.

3.1. Reactivos

El etanol absoluto (96 %) fue obtenido de laboratorios SUQUIM (Bucaramanga, Santander, Colombia). El metanol grado reactivo, n-hexano, carbón activado, acetona grado reactivo, carbonato de calcio, metanol grado LC-MS, formiato de amonio (99 %), ácido fórmico grado HPLC fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El gel de sílice C₁₈ modificada fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Los gases nitrógeno, helio y aire (99.995 %) usados en GC fueron de Linde (Bucaramanga, Colombia).

3.2. Recolección del material vegetal de *A. nervosa*

Se recolectaron hojas y flores de plantas de la especie *A. nervosa* cultivadas en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), ubicado en el campus central de la Universidad Industrial de Santander (**Figura 6**). Las hojas recolectadas se secaron a la sombra y las flores fueron liofilizadas. El material vegetal de hojas y flores se molió en un molino SM100 (Retsch, Haan, Alemania).



Figura 6. Parcelas experimentales de *A. nervosa* en cultivo propagado por esquejes.

3.3. Obtención de los extractos a partir de las hojas y flores de *A. nervosa*

3.3.1. Extracción con solvente asistida con ultrasonido

Los extractos de las hojas secas y molidas se obtuvieron por la técnica de extracción con solvente asistida con ultrasonido. La extracción se realizó con etanol al 50, 70 y 96 % v/v, relación material vegetal-solvente (1:20). Los extractos de las flores liofilizadas se obtuvieron con el mismo solvente a las tres concentraciones diferentes. El material vegetal de las hojas (4 g) fue colocado en un

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

recipiente, macerado en 80 mL de solvente y sometido a ultrasonido por una hora a 45 °C. La mezcla se filtró y el solvente fue retirado por rotoevaporación. Los extractos fueron liofilizados y almacenados a una temperatura de -10 °C. Para las flores (0,5 g) se usó el mismo procedimiento. En la **Figura 7**, se muestra el montaje usado.

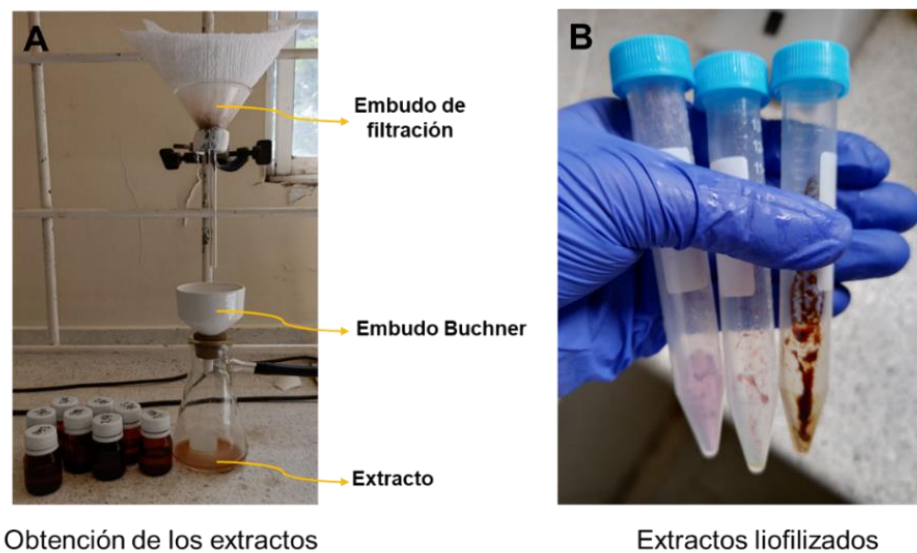


Figura 7. Montaje de la técnica extracción con solvente usada en la investigación. **A.** Proceso de filtrado. **B.** Extractos liofilizados.

3.3.2. Dispersión de la matriz en fase sólida

Para la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida se usó gel de sílice C₁₈ modificada como agente dispersante. El agente dispersante (0,6 g) y las diferentes muestras de material vegetal de hojas y flores (0,2 g) se colocaron en un mortero en proporción (1:3) y se mezclaron hasta obtener un polvo seco y homogéneo. La mezcla se empaquetó en un cartucho de jeringa que contenía en el fondo un filtro de algodón adsorbente. Las extracciones fueron realizadas con dos solventes diferentes (acetona, mezcla hidroalcohólica al 50, 70 y 96 % V/V). Los extractos fueron llevados a sequedad con corriente (N₂) y posteriormente liofilizados. La extracción para cada muestra se realizó por triplicado. La **Figura 8** muestra el esquema metodológico.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

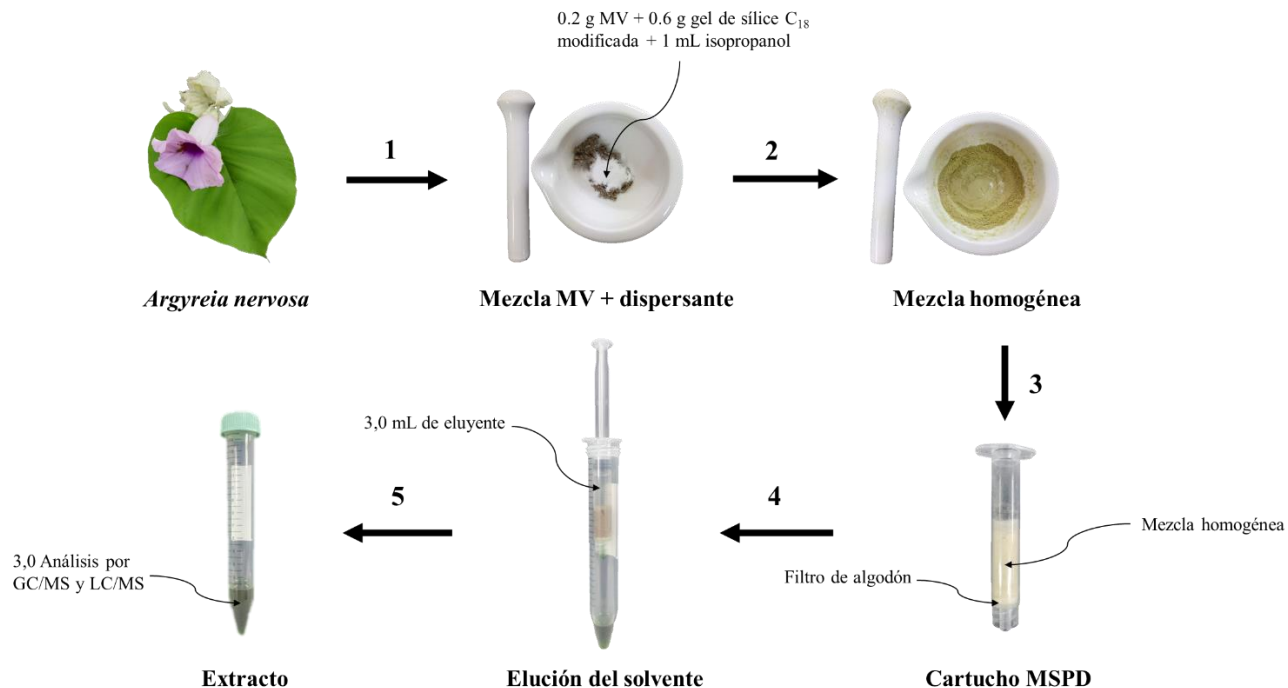


Figura 8. Esquema metodológico de la técnica MSPD usado en la investigación.

3.4. Obtención de extractos a partir de las semillas de *A. nervosa*

De forma complementaria, se obtuvieron los extractos a partir de las semillas de *A. nervosa* mediante la técnica de MSPD. Se usó gel de sílice C₁₈ modificada y acetona como solvente de elución. La extracción se realizó siguiendo la metodología mencionada en la sección 3.3.2. Los extractos obtenidos fueron analizados por LC/MS. En la **Figura 9** se muestra el esquema metodológico.

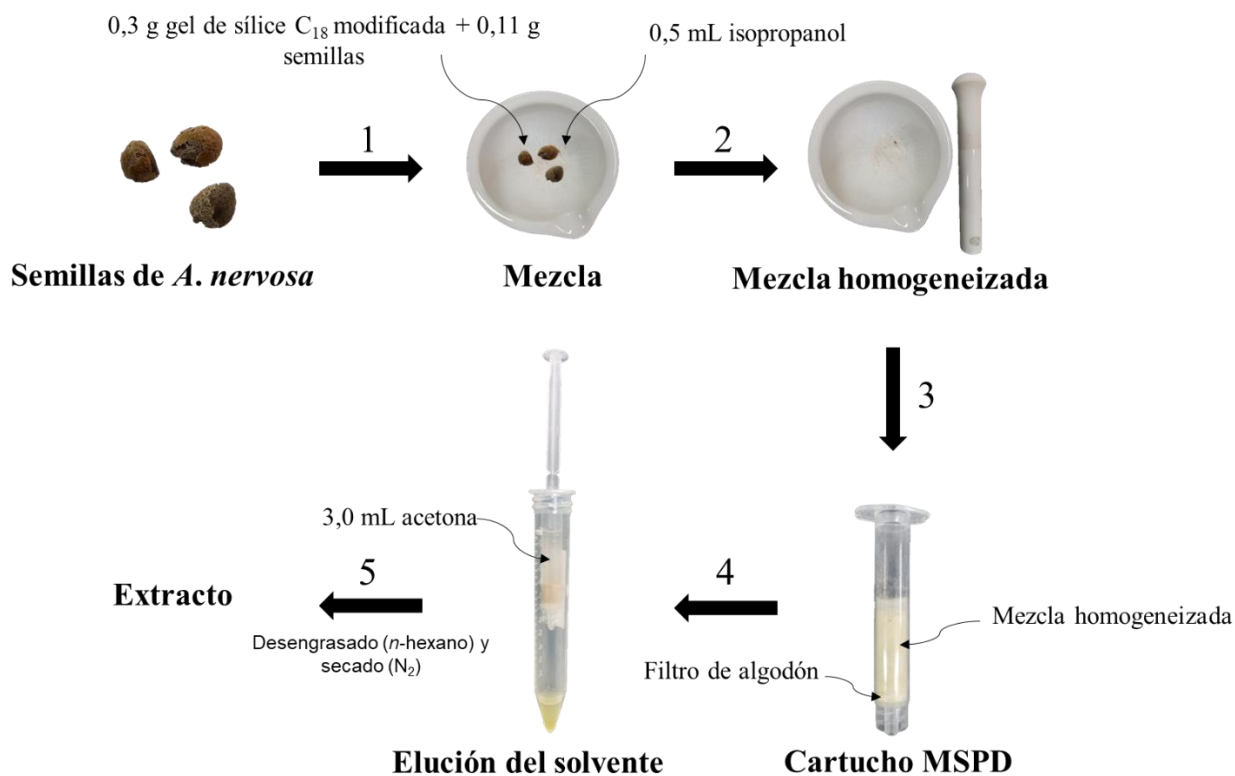


Figura 9. Esquema metodológico de la técnica MSPD usado para la obtención de alcaloides ergolínicos en la investigación.

3.5. Obtención de la fracción volátil a partir de las flores de *A. nervosa*

3.5.1. Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza

Se usó la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza para el análisis de las fracciones volátiles del material vegetal proveniente de las flores frescas de *A. nervosa*. Se usó una fibra rosada *Assembly* de 65 μm revestida con PDMS/DVB, Supelco, Bellefonte, EE.UU. La fibra se expuso previamente (5 s, 50 °C) al espacio de cabeza de un vial de 2 mL que contenía *n*-tetradecano (5 mg) como estándar interno y luego se expuso durante 30 min al espacio de cabeza de un vial de 4 mL que contenía 300 mg del material vegetal fresco. Los volátiles adsorbidos se

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

desorbieron durante 10 min en el puerto de inyección del GC-MS operado en modo *splitless* (columna DB-5MS). En la **Figura 10**, se muestra el montaje realizado para la técnica.

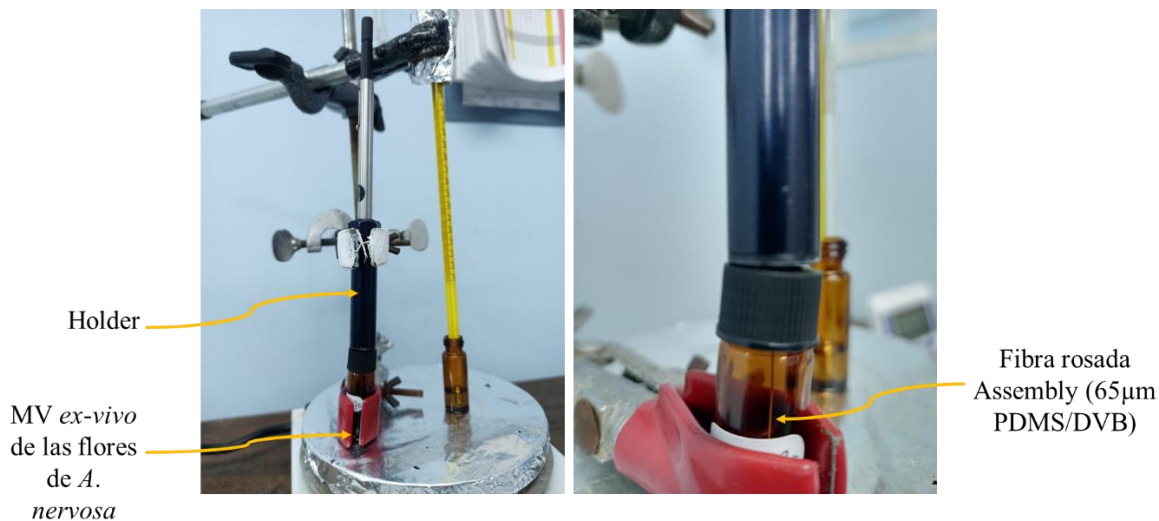


Figura 10. Montaje de la técnica HS-SPME usado en la investigación.

3.6. Análisis instrumental

3.6.1. Caracterización química de los compuestos volátiles en los extractos

Los compuestos volátiles en los extractos de *A. nervosa* fueron analizados por GC/MS, para este caso, se tomaron 5 mg de muestra, se disolvieron en metanol (1 mL) y se desengrasaron con n-hexano (3 x 1 mL). Los extractos desengrasados fueron llevados a sequedad (N₂) y el resultante se reconstituyó en metanol grado análisis (1 mL) para inyectar en el equipo GC-MS. La fracción volátil de las flores también se analizó por GC-MS, en este caso, los compuestos adsorbidos en la fibra se desorbieron en el puerto de inyección del cromatógrafo.

3.6.2. Condiciones de análisis GC-MS

Los compuestos volátiles en los extractos de *A. nervosa* se analizaron en un equipo (GC 6890 Plus, *Agilent technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector de espectrometría de masas AT 5973N (EI, 70 eV) operado en modo *splitless*. Como fase estacionaria se usó una columna capilar de sílice fundida ZB-5MS (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.), 60 m x 0,25 mm de d.i., recubierta con 5 %- fenil-PDMS (0,25 μm d_f). Las temperaturas en el puerto de inyección, la línea de transferencia y la cámara de ionización fueron, 250 °C, 285 °C y 230 °C, respectivamente. Como gas de arrastre se usó helio (99,995 %) a una velocidad lineal de 25 cm/s (1 mL/min, a flujo constante). Se usó una mezcla de *n*-alcanos C₈–C₄₀ para determinar los índices de retención lineales, siguiendo la ecuación establecida por Van Den Dool y Kratz. Los compuestos volátiles presentes en los extractos de *A. nervosa* se identificaron tentativamente con la información complementaria obtenida de los espectros de masas de GC-MS reportados en la literatura y los índices de retención lineales obtenidos con fase estacionaria apolar reportados, usando los datos disponibles en (Babushok y col., 2011) y las bases de datos espectrales (NIST, Adams, Wiley). Los datos fueron analizados mediante el *software MSDChemStation* de ATG1701DA.

3.6.3. Caracterización química de los compuestos no volátiles en los extractos

Los compuestos no volátiles y termolábiles presentes en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa* fueron analizados por UHPLC/ESI⁺-*Q-Orbitrap*-HRMS. Para el análisis se tomaron 2 mg de cada extracto y se disolvieron en 1 mL de la fase móvil de metanol/agua al 0.1 % v/v de ácido fórmico y 5 mM de formiato de amonio. Las soluciones se agitaron en un vórtice durante 1 minuto a 3000 rpm, se llevaron a ultrasonido durante 30 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 6000 rpm. Todas las muestras fueron filtradas (0,22 μm) y puestas en viales para la inyección en el equipo.

3.6.4. Condiciones de análisis LC-MS

Para la caracterización de los extractos se usó un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia *Dionex™ Ultimate™ 3000* (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y desgasificador (SRD-3400). Se usó una columna *Hypersil GOLD™ aQ* (Thermo Scientific, Sunnyvale, EE. UU.) 100 mm x 2.1 mm d.i., 1,9 μm de tamaño de partícula a una temperatura de 30 °C.

La fase móvil utilizada fue una mezcla de (A) metanol con ácido fórmico al 0.1 % v/v y 5 mM de formiato de amonio; (B) agua con ácido fórmico al 0.1 % v/v y 5mM de formiato de amonio, a un flujo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ y volumen de inyección de 1 μL . El cromatógrafo fue acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución *Orbitrap Exactive Plus* (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.), con una fuente de ionización por electronebulización termostataada (HESI-II), operada en modo de iones positivos y negativos a 350 °C. El voltaje manejado en el capilar fue de 3.5 kV. El rango de masas utilizado fue de m/z 80-1000. Para la fragmentación de las moléculas protonadas y deprotonadas se usaron voltajes de 20, 30, 40, 50, 60 y 70 eV en la HCD.



Figura 11. Equipos analíticos instrumentales usados en el estudio. A. GC-MS. B. UHPLC-ESI-HRMS-Q-Orbitrap.

3.6.5. Contenido de metabolitos no volátiles en extractos de *A. nervosa*

El contenido de metabolitos no volátiles se determinó por LC-MS mediante la construcción de curvas de calibración con cada una de las sustancias de referencias certificadas disponibles para ocho compuestos. Los resultados fueron expresados en miligramos de compuesto por cada gramo de extracto (mg/g). Las áreas cromatográficas de cada compuesto se obtuvieron extrayendo las corrientes iónicas de las masas exactas protonadas o deprotonadas ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) obtenidas en modo SIM para cada compuesto. Las figuras de mérito calculadas, junto con las curvas de calibración y las ecuaciones obtenidas, se muestran en la **Tabla A9** del apéndice.

4. Resultados

4.1. Pérdida de peso del material vegetal de hojas de *A. nervosa*

La pérdida de peso de las hojas de *A. nervosa* se midió construyendo una curva de secado del material vegetal en función del número de días después de la cosecha. Para la curva se cosecharon nueve hojas de *A. nervosa* con dimensiones aproximadamente iguales (16-17 cm de ancho y 17-18 cm de largo) y se distribuyeron en tres lotes conformado cada uno por tres hojas. El peso de los tres lotes fue registrado por triplicado desde el día cero de la cosecha hasta el día 15. El peso promedio de cada lote fresco fue de 18 g. El porcentaje de humedad para cada lote fresco fue de 83 %. En el día 14 se consideró que el material vegetal estaba seco. En la **Figura 12**, se muestra la curva de secado realizada. En la **Tabla 2**, se muestran los datos registrados en dicho proceso.

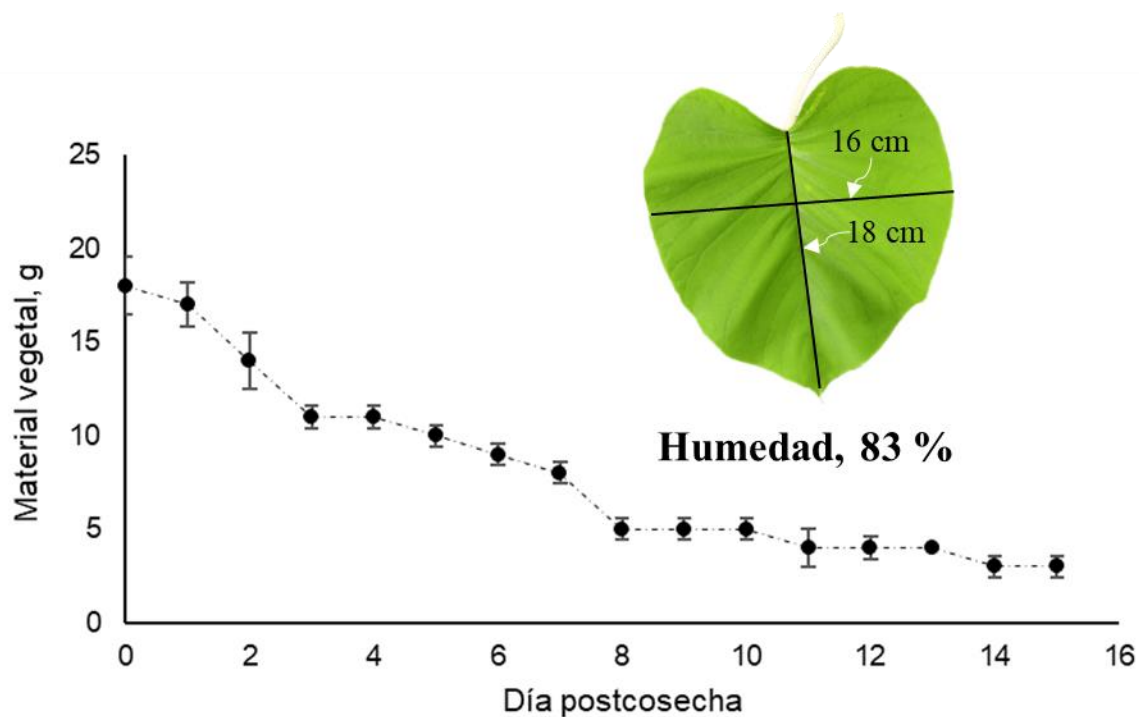


Figura 12. Curva de secado de las hojas de *A. nervosa*.

Tabla 2.Resultados de la pérdida de peso de las hojas de *A. nervosa* secadas a la sombra.

Día postcosecha	Peso del material vegetal, g			Promedio
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
0	18	20	17	18
1	16	18	16	17
2	14	13	16	14
3	11	12	11	11
4	12	11	11	11
5	9	10	10	10
6	8	9	9	9
7	8	9	8	8
8	5	5	4	5
9	4	5	5	5
10	5	5	4	5
11	5	3	4	4
12	4	4	3	4
13	4	4	4	4
14	3	3	4	3
15	3	4	3	3

Humedad: 36 – 58 %. Temperatura: 26,3-28,4 °C.

4.2. Influencia del tipo de solvente y la concentración sobre los rendimientos de extracción de hojas y flores de *A. nervosa*

Para evaluar la influencia del tipo de solvente y su concentración en los rendimientos de extracción obtenidos en cada técnica para las hojas y flores de *A. nervosa*, se usaron dos solventes: acetona y etanol, este último, a tres concentraciones diferentes (50, 70 y 96 % v/v). Para la técnica de AUE solo se usó el etanol a sus tres concentraciones. Los rendimientos de extracción más altos en hojas

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

y flores se obtuvieron con etanol al 50 % v/v. En la **Figura 13**, se muestran los rendimientos obtenidos para cada técnica.

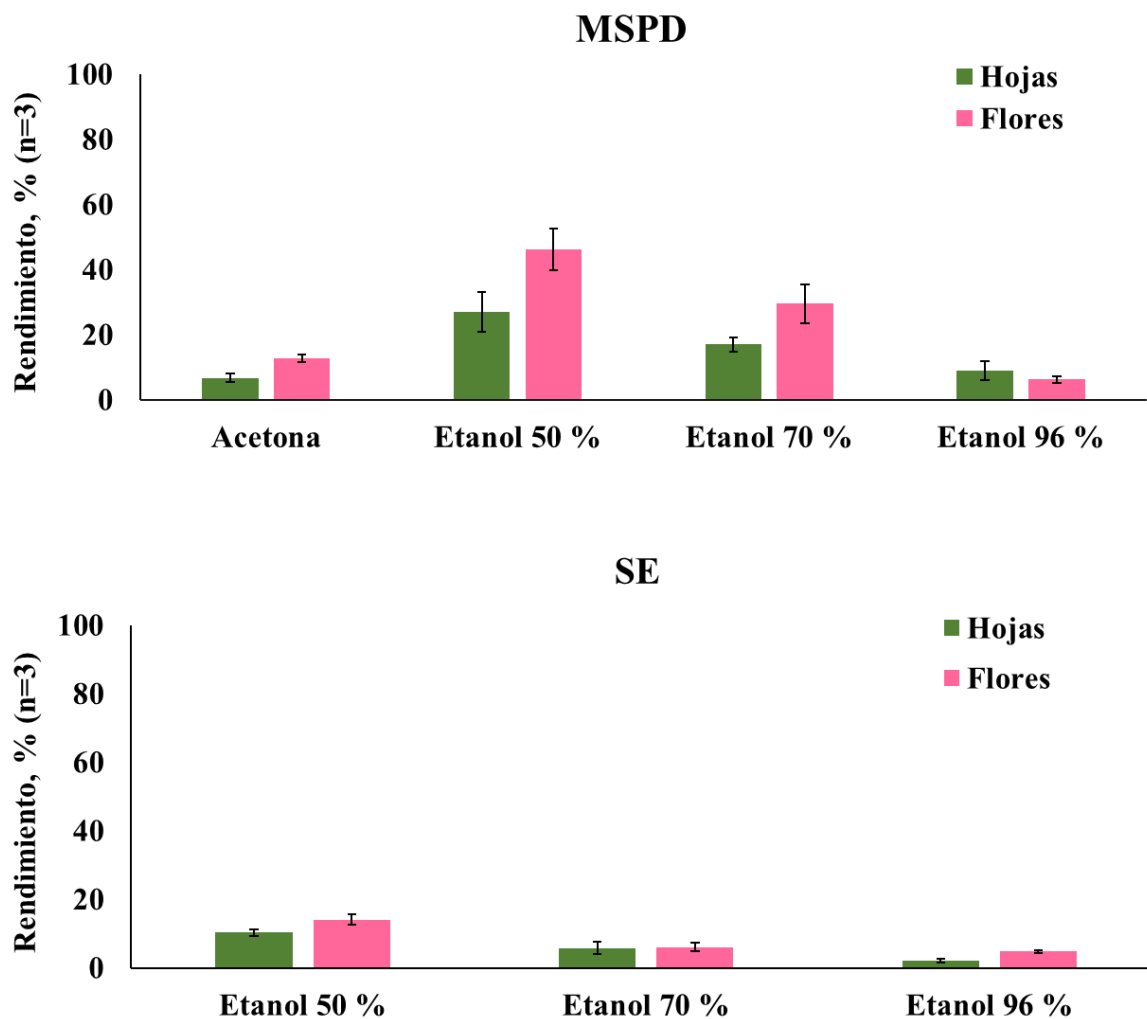


Figura 13. Rendimientos de extracción de las hojas y flores de *A. nervosa* obtenidos en cada técnica.

4.3. Caracterización de metabolitos volátiles presentes en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*

4.3.1. Metabolitos volátiles en hojas de *A. nervosa*

Los metabolitos volátiles presentes en los extractos obtenidos por MSPD a partir de hojas de *A. nervosa* se analizaron por GC/MS (*full scan*) utilizando una columna apolar DB-5MS, siguiendo la metodología presentada en la sección 3.4.1. En la **Figura 14** se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (*full scan*) de los compuestos mayoritarios identificados en extractos MSPD de hojas con etanol (50 % v/v) y acetona.

Se identificaron 25 compuestos volátiles en los extractos de hojas de *A. nervosa* obtenidos mediante la técnica de MSPD usando acetona y etanol (50 % v/v) como solventes de elución (véase la **Tabla 3**). En el extracto proveniente de la elución con etanol, se identificaron mayoritariamente hidrocarburos oxigenados (29,9 %) y ácidos carboxílicos (16,5 %). El extracto obtenido con acetona contiene hidrocarburos ramificados (67 %) y triterpenos oxigenados (14,2 %). En la **Figura 15**, se muestran las diferentes familias de compuestos obtenidos para cada extracto.

Los compuestos mayoritarios en los extractos obtenidos con acetona fueron el 13-metilheptacosano con un área de 67,0 % y fitol 11,0 %. Otros compuestos como el indol (0,2 %), formilindol (0,1 %), lupeol (2,0 %), β -sitosterol (0,9 %) y β -tocoferol (0,5 %), fueron identificados en menor proporción. En los extractos obtenidos con etanol se identificaron como compuestos mayoritarios un posible tocoferol (33,5 %) y el ácido dodecanoico (7,4 %). El compuesto fitol fue identificado en los dos extractos.

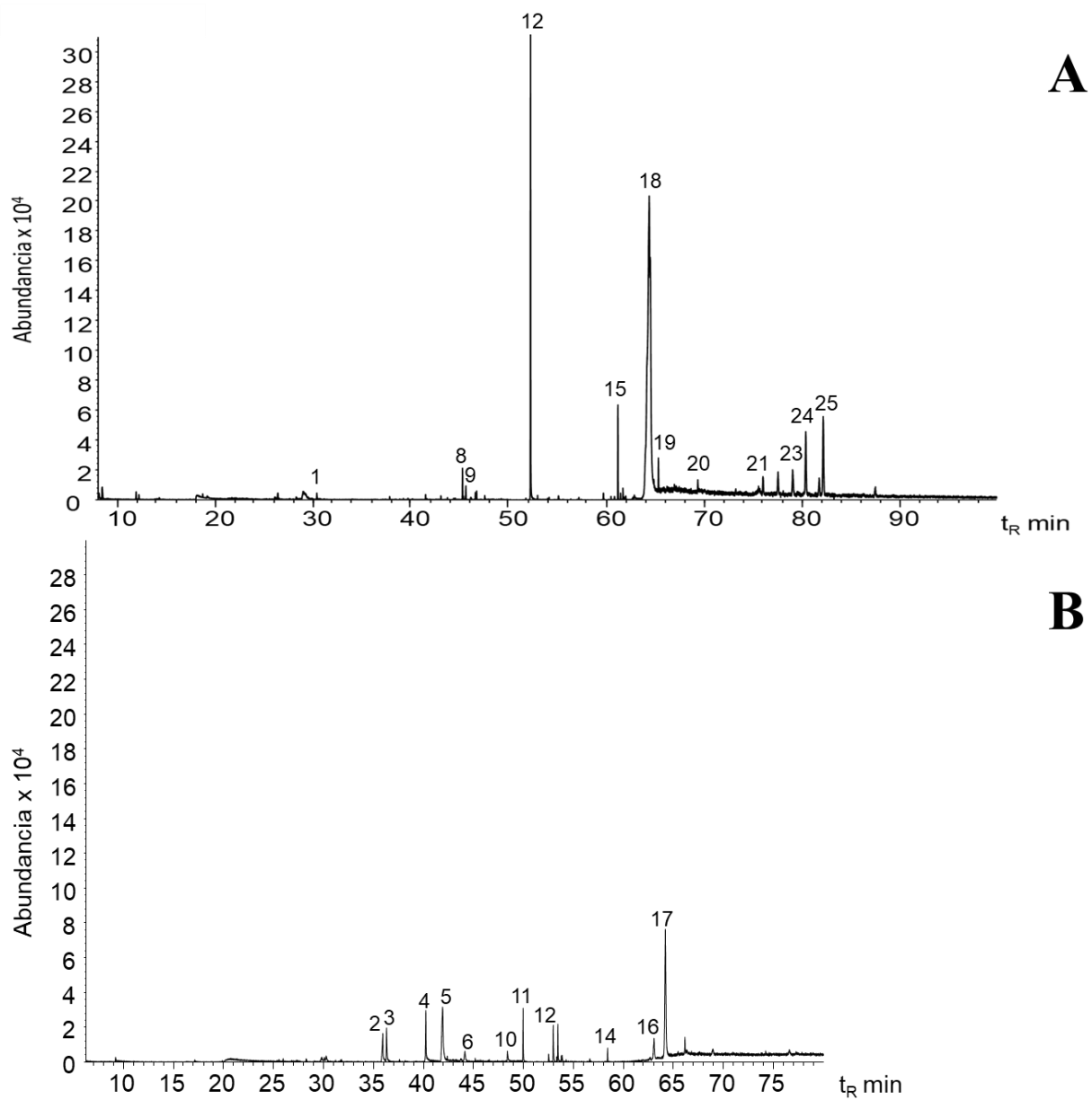


Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) de los compuestos mayoritarios identificados en extractos de hojas de *A. nervosa*. **A.** Extractos MSPD obtenidos con acetona. **B.** Extractos MSPD obtenidos con etanol al 50 % v/v.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*
Tabla 3.

 Identificación por GC/MS (*full scan*) de los extractos de hojas de *A. nervosa*.

Fig N° 14	Compuesto	Columna DB-5MS		Área relativa GC, %	
		IRL _{exp}	IRL _{lit}	MSPD acetona	MSPD etanol
1	Indol ^{a,b}	1298	1290 [1]	0,2	-
2	Ácido cinámico ^{a,b}	1424	1435 [1]	-	7,2
3	C ₈ H ₈ O ₂	1435	-	-	5,5
4	Ácido dodecanoico ^{a,b}	1557	1567 [1]	-	7,4
5	Compuesto oxigenado	1614	-	-	19,8
6	Compuesto oxigenado	1698	-	-	2,8
7	Dehidrovomifoliol ^{a,b}	1791	1800 [2]	0,5	-
8	Formilindol ^{a,b}	1813	1816 [2]	0,1	-
9	Neofitadieno ^{a,b}	1834	1836 [2]	0,2	-
10	1-Hexadecanol ^{a,b}	1881	1880 [2]	-	1,8
11	Ácido hexadecanoico ^{a,b}	1956	1958 [1]	-	5,3
12	Fitol ^{a,b}	2109	2114 [2]	11,0	4,2
13	Ácido octadeca-9,12,13-trienoico ^{a,b}	2134	2139 [2]	-	3,8
14	9-Octadecenamida ^a	2362	-	-	1,5
15	Ftalato de di (2-etilexilo) ^{a,b}	2532	-	2,3	-
16	Ácido acetoxicinámico ^a	2612	-	-	5,0
17	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	2693	-	-	33,5
18	13-Metilheptacosano ^{a,b}	2745	2741 [2]	67	-
19	Escualeno ^{a,b}	2812	-	0,9	-
20	β-Tocoferol ^{a,b}	3054	3062 [2]	0,5	-
21	β-Sitosterol ^{a,b}	3327	3321 [2]	0,9	-
22	C ₃₀ H ₅₀ O	3375	-	1,7	-
23	Lupeol ^a	-	3451 [2]	2,0	-
24	Acetato de β-amirenilo ^a	-	3458 [2]	4,8	-
25	Acetato de lupelilo ^a	-	3525 [2]	5,7	-

Tabla 3. Continuación.

Criterios de identificación:

^a Identificación tentativa basada en los datos espectrales (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90 %).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-5MS (1. Adams, 2007; 2. NIST, 2011).

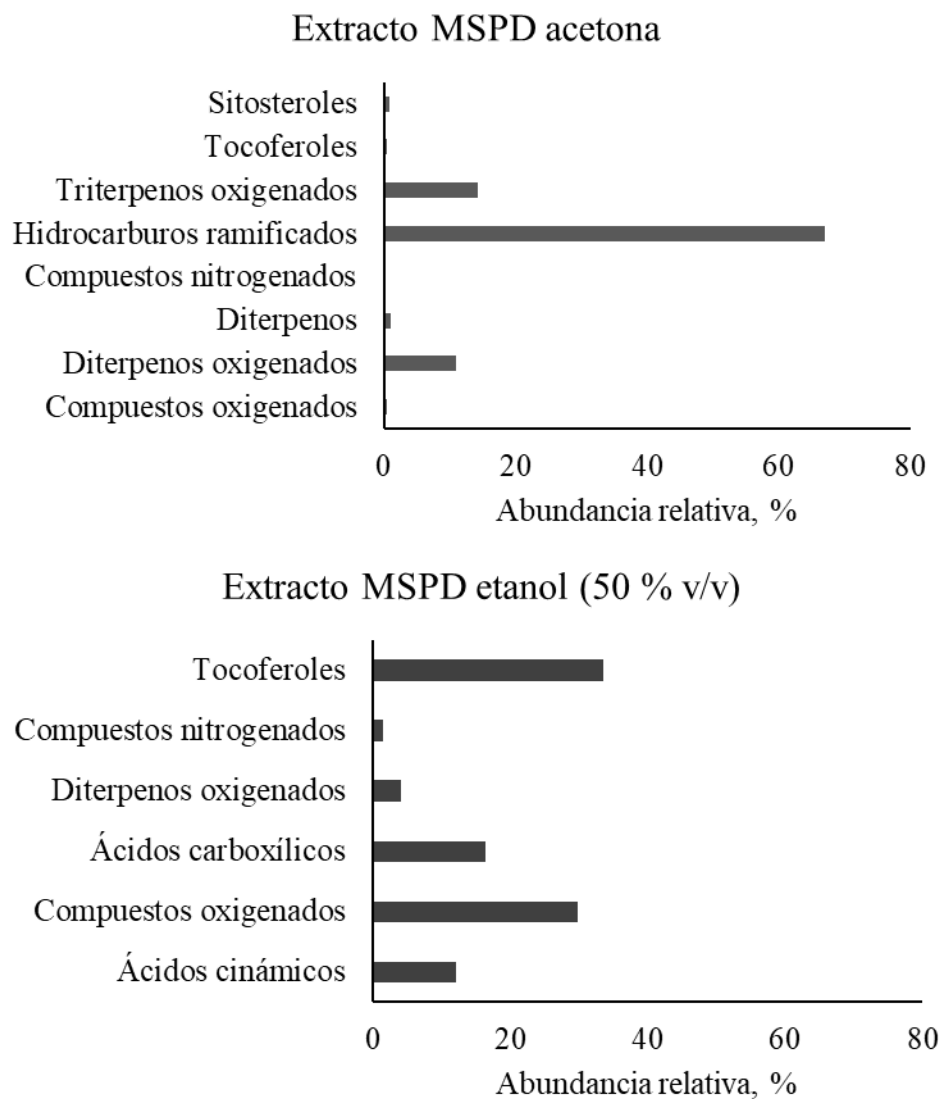


Figura 15. Porcentaje de las familias de compuestos mayoritarios identificados en los extractos MSPD de hojas de *A. nervosa*. **A.** Extractos MSPD obtenidos con acetona. **B.** Extractos MSPD obtenidos con etanol 50 % v/v.

4.3.2. Patrones de fragmentación por impacto de electrones (70 eV) en GC-MS de los compuestos identificados en extractos de hojas de *A. nervosa*

El análisis cromatográfico por GC-MS permitió la identificación de 25 compuestos en los extractos MSPD a partir de hojas de *A. nervosa*. El β -sitosterol, con IRL 3327 (M^+ , m/z 414). En su espectro de masas se observó el fragmento m/z 329 que se formó a partir del ion molecular, mediante la ruptura simple del enlace entre los carbonos C(23)-C(24). El fragmento m/z 396 ($M^+ - H_2O$) surgió a partir del ion molecular debido a la pérdida de agua en el enlace del carbono C(3) en el ciclo. En la **Figura 16** se observa el espectro de masas obtenido para el β -Sitosterol.

El β -Tocoferol, con IRL 3054 (M^+ , m/z 416) también fue observado. En su espectro de masas (**Figura 17**) se aprecia el fragmento m/z 191 que se formó a partir de la pérdida neutra de la cadena carbonada ($-C_{16}H_{33}$), debido a la ruptura simple en el carbono C(2) perteneciente al ciclo y su sustituyente C(1'). El fragmento m/z 151, se observó por la doble ruptura en el heterociclo, entre los enlaces O(1)-C(2) y C(3)-C(4), llamada ruptura retro-Diels-Alder (RDA). Las dos rupturas presentadas son características para los tocoferoles, según lo reportado por Bartosinska y col., 2016.

Uno de los diterpenos identificados fue el neofitadieno, con IRL 1834. En su espectro de masas no se observó el ion molecular, sin embargo, se observaron los fragmentos m/z 123 formado a partir de la ruptura simple en el enlace entre los carbonos C(7)-C(8) y el m/z 95, originado de la ruptura simple en los carbonos C(6)-C(7). El espectro de masas no se asemeja al descrito por Restrepo y col., 2013, ya que el ion pico base obtenido difiere con el de los autores. En la **Figura 18** se muestra el espectro de masas obtenido para el diterpeno neofitadieno.

Se observó el diterpeno oxigenado fitol, con IRL 2109. Se observaron fragmentos en m/z 123, m/z 111, m/z 95, m/z 81 y el ion pico base en m/z 71 ($C_5H_{11}^+$), característico para el fitol, debido a la ruptura simple entre los carbonos C(12)-C(13). El espectro de masas obtenido fue muy similar al reportado por reportado por Alzurfi y col., 2021 en plantas de *Ceratophyllum demersum*. En la **Figura 19** se muestra su espectro de masas.

Para el compuesto N° 17, con IRL 2693, mayoritario en los extractos obtenidos con etanol (50 % v/v), se observó su ion molecular en (M^+ , m/z 416), con fragmentos en m/z 164, m/z 147, m/z 120,

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

m/z 91 y m/z 55. El fragmento m/z 164 ion pico base, pudo ser formado a partir del ion molecular, debido a la pérdida del fragmento neutro ($-C_{18}H_{36}$). El catión m/z 147 podría originarse a partir del fragmento m/z 164, debido a la pérdida de un radical hidroxilo ($-OH$). El catión radical m/z 120 podría ser formado por la pérdida neutra de 44 unidades del fragmento m/z 164, correspondiente al ($-CO_2$). El catión radical m/z 120 es característico para compuestos que poseen en su estructura un anillo bencénico enlazado a una cadena alquílica oxigenada. El ion tropilio m/z 91 ($C_7H_7^+$) fue observado producto de la pérdida de 29 unidades del ion m/z 120, correspondiente al radical ($-COH$). El ion tropilio es típico para los compuestos alquilbencénicos y es coherente con la existencia del ion m/z 120. El compuesto también tiene insaturaciones en su estructura, ya que el ion m/z 55 característico para hidrocarburos insaturados, también fue observado. Este compuesto podría tratarse de un tocoferol de $C_{28}H_{48}O_2$. En la **Figura 20** se observa su espectro.

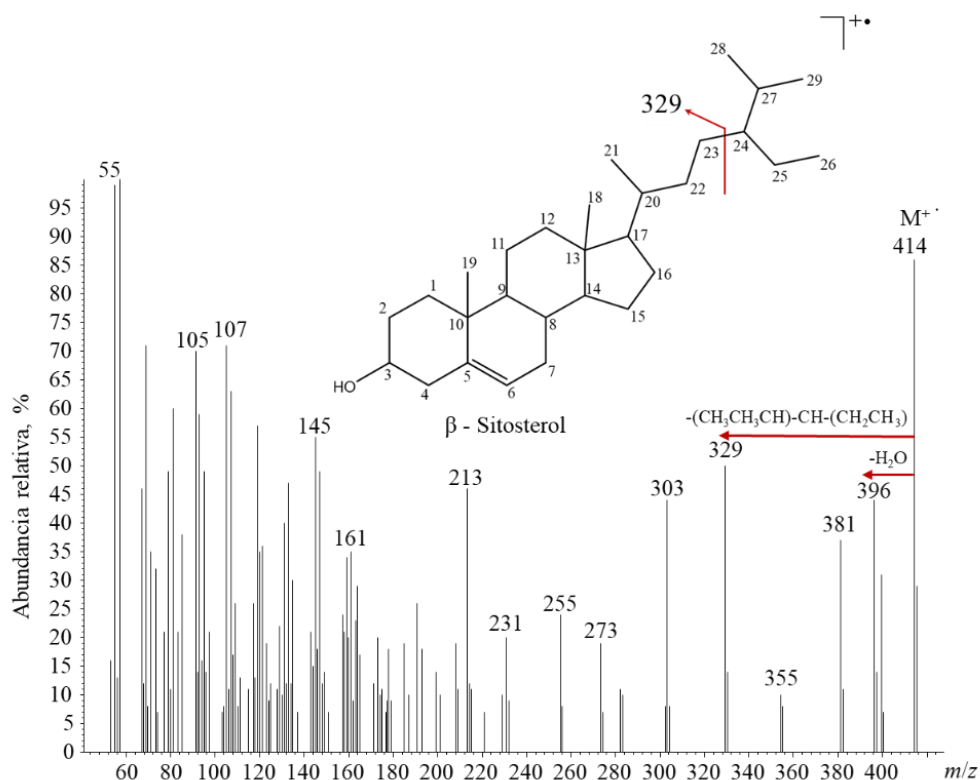


Figura 16. Espectro de masas (EI, 70 eV) del β -Sitosterol, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

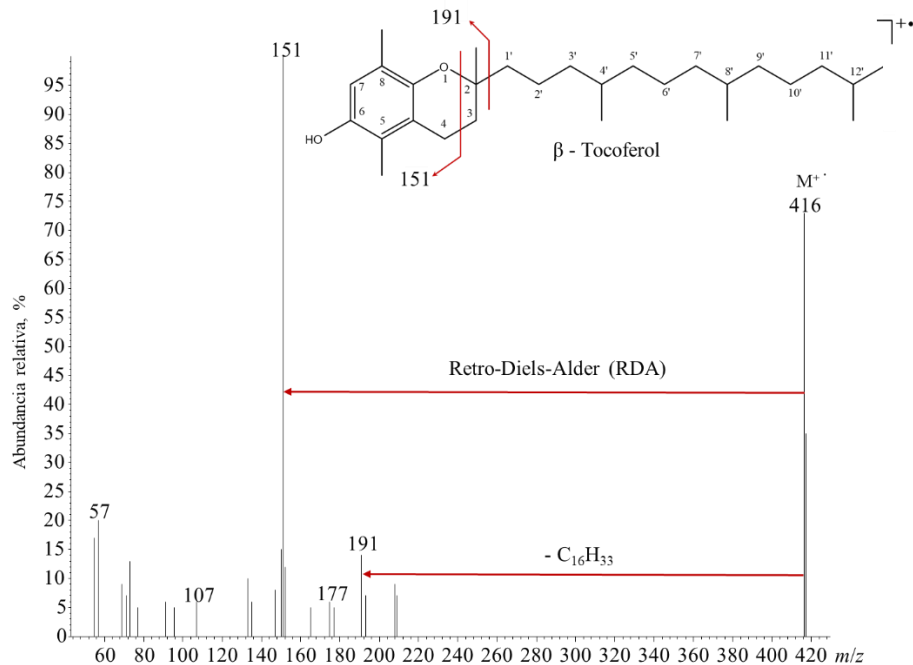


Figura 17. Espectro de masas (EI, 70 eV) del β -tocoferol, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona.

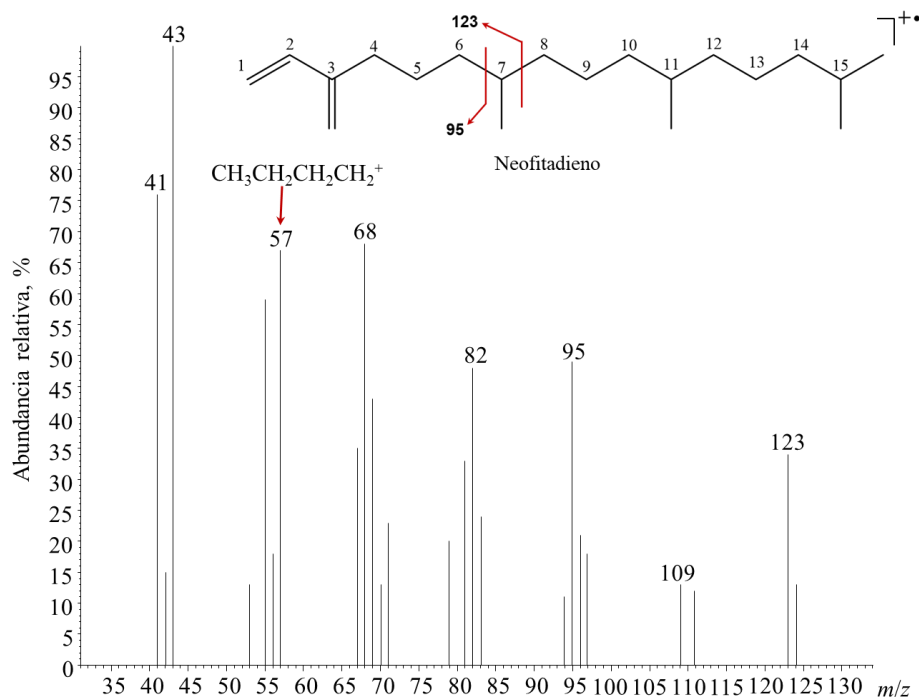


Figura 18. Espectro de masas (EI, 70 eV) del neofitadieno, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

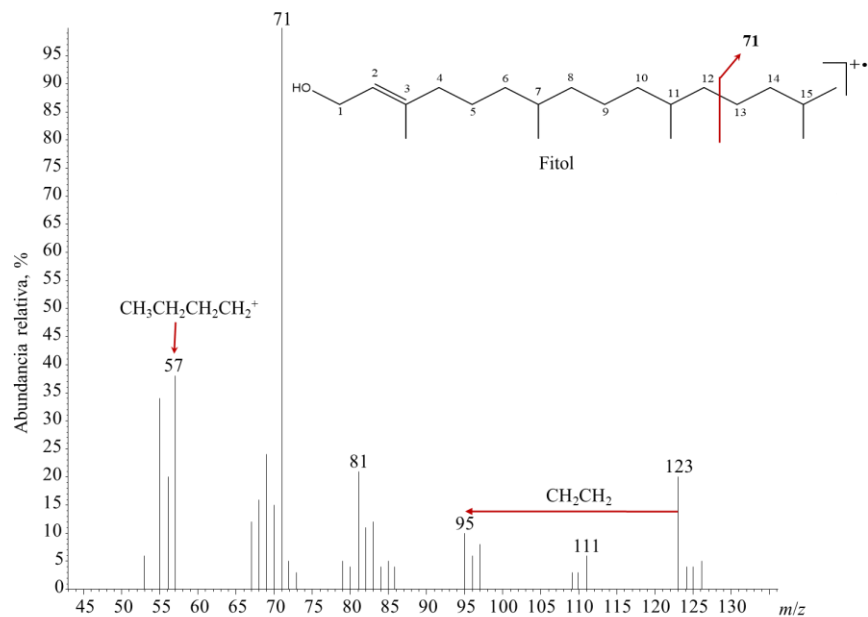


Figura 19. Espectro de masas (EI, 70 eV) del fitol, compuesto presente en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona y etanol 50 % v/v.

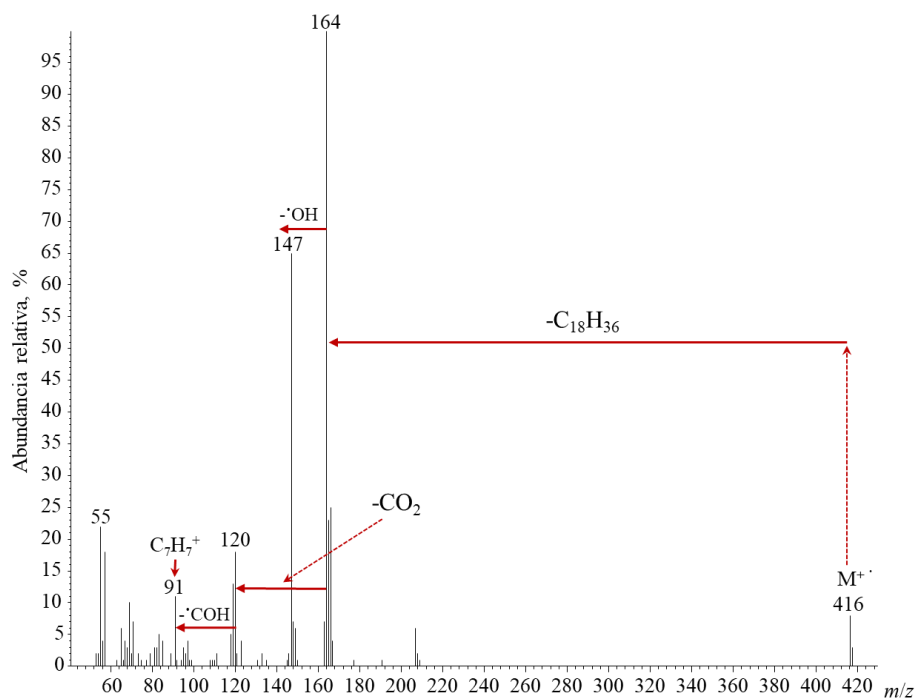


Figura 20. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto N° 17, mayoritario en los extractos MSPD de hojas obtenidos con etanol 50 % v/v. M^+ , m/z 416, (I %): m/z 164 (98 %), m/z 147 (67 %), m/z 120 (18 %), m/z 91 (13 %) y m/z 55 (24 %).

4.3.3. Metabolitos volátiles en flores de *A. nervosa*

Los metabolitos secundarios volátiles presentes en los extractos MSPD obtenidos con acetona de las flores de *A. nervosa*, también fueron analizados por GC/MS siguiendo la metodología presentada en la sección 3.4.1. Se identificaron 13 compuestos (Véase la **Tabla 4**). Los compuestos mayoritarios fueron un posible tocoferol (76,8 %), el ácido octadeca-9,12-dienoico (6,2 %), el ácido hexadecanoico (4,7 %) y el β -sitosterol (3,8 %). Otros compuestos como el isofucoesterol (0,8 %), ergostenol (0,7 %) y hexadecanol (0,4 %) se identificaron en menor proporción. El perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) del extracto MSPD de las flores de *A. nervosa* se muestra en la **Figura 21**, la **Figura 22** muestra las familias de los compuestos mayoritarios identificados.

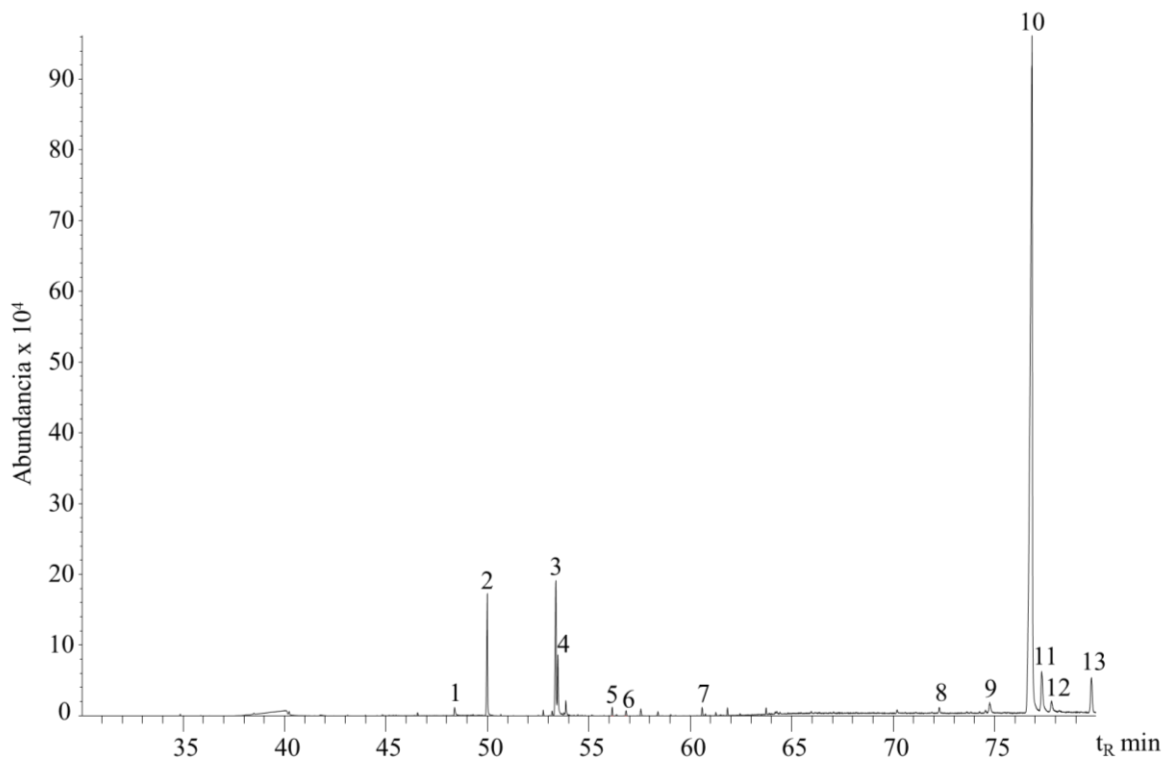


Figura 21. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) de los compuestos mayoritarios identificados en extractos MSPD de las flores de *A. nervosa*.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Tabla 4.

Identificación por GC/MS (*full scan*) de los extractos MSPD a partir de flores de *A. nervosa*.

Fig N° 21	Compuesto	Columna DB-5MS		
		IRL _{exp}	IRL _{lit}	Área relativa GC, %
1	Hexadecanol ^{a,b}	1881	1880	0,4
2	Ácido hexadecanoico ^{a,b}	1958	1963	4,7
3	Ácido oca-deca-9, 12-dienoico ^{a,b}	2130	2133	6,2
4	Ácido octadeca-9, 11, 13-trienoico ^{a,b}	2136	2139	2,6
5	6,9-Tricosadieno ^{a,b}	2267	2252	0,3
6	Derivado sulfurado	2299	-	0,2
7	2-Metiltetracosano ^{a,b}	2464	2462	0,3
8	Compuesto oxigenado	3150	-	0,3
9	Ergostenol ^{a,b}	3245	3243	0,7
10	Derivado de tocoferol	3315	-	76,8
11	β- Sitosterol ^{a,b}	3329	3321	3,8
12	Isofucosterol ^{a,b}	3343	3343	0,8
13	Compuesto oxigenado	-	-	3,0

Criterios de identificación:

^a Identificación tentativa basada en los datos espectrales (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90 %).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] NIST, 2011).

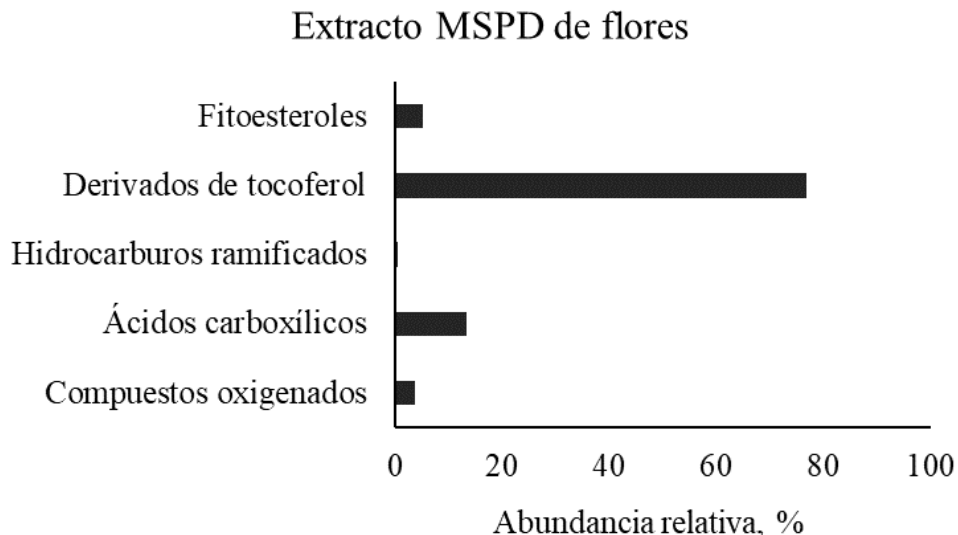


Figura 22. Porcentaje de las familias de compuestos mayoritarios identificados en los extractos MSPD de las flores de *A. nervosa*.

4.3.4. Patrones de fragmentación por impacto de electrones (70 eV) en GC/MS de los compuestos identificados en extractos de flores de *A. nervosa*

El análisis por GC/MS permitió la identificación en los extractos MSPD de las flores de *A. nervosa*, de ácidos carboxílicos, fitoesteroles, un posible derivado de tocoferol y otros compuestos oxigenados. Para el compuesto N° ocho (**Figura 23**), con IRL 3150, se observaron el catión radical m/z 164, correspondiente al ion pico base y los fragmentos m/z 147, m/z 133, m/z 120, m/z 91 y m/z 57. El espectro fue muy similar al obtenido para el compuesto N° 17 en hojas (véase la **Tabla 3**), sin embargo, para el compuesto en interés, se observó el catión m/z 133, posiblemente formado del ion pico base m/z 164, por la pérdida de 31 unidades, correspondiente al radical metoxi ($-\text{CH}_3\text{O}^\cdot$). Esta pérdida es característica en el grupo funcional metiléster. El compuesto N° diez (**Figura 24**), con IRL 3315, fue mayoritario en los extractos a partir de flores, se observó su ion molecular M^+ , en m/z 388 (9 %) y los fragmentos m/z 164 (98 %), m/z 147 (59 %), m/z 120 (18 %), m/z 91 (13 %) y m/z 55 (14 %).

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

La comparación de los espectros de masas de los compuestos N° 12 en hojas (véase **Tabla 3**) y N° ocho y 17 en las flores (**Tabla 4**), muestra que existe gran similitud en los patrones de fragmentación y que presentan iones-producto e intensidades similares (m/z 164, m/z 147, m/z 120 y m/z 91), esto permite inferir, que se trata de compuestos con estructuras análogas, posiblemente isómeros o cuerpos estructurales comunes con más o menos sustituyentes.

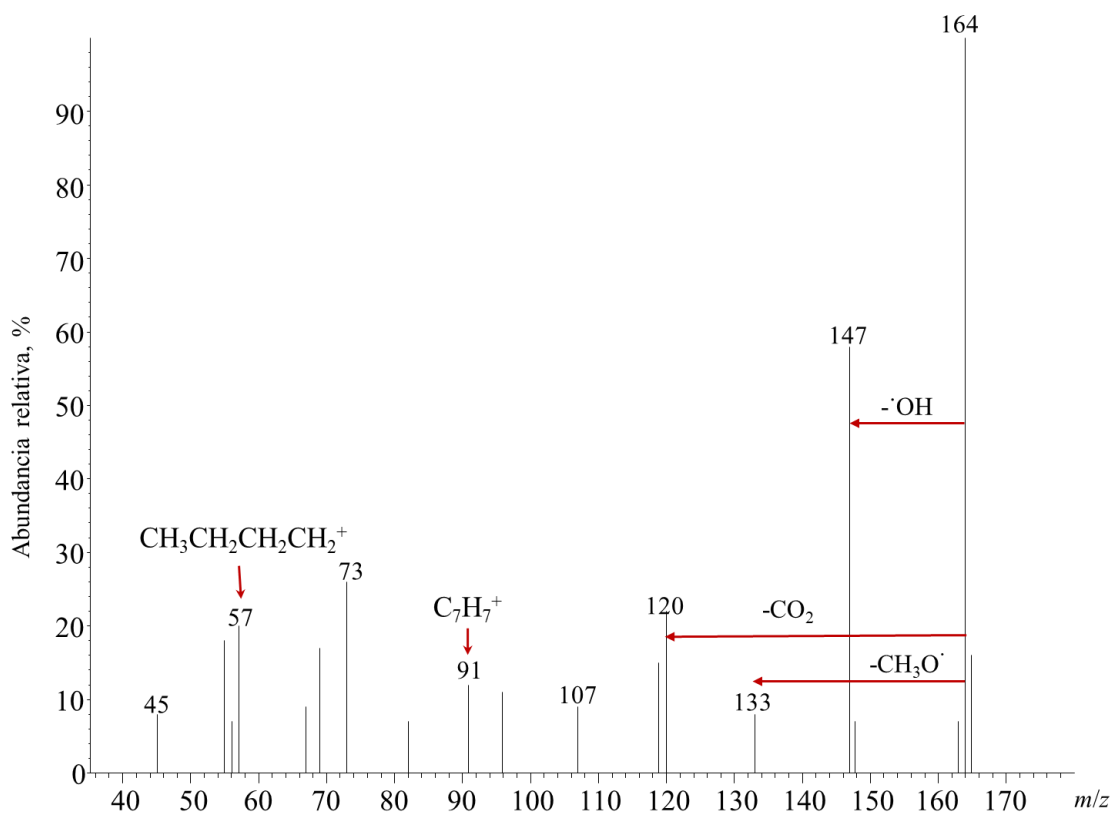


Figura 23. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto N° ocho, presente en los extractos MSPD de flores. (I %), m/z 164 (98 %), m/z 147 (58 %), m/z 120 (22 %), m/z 91 (13 %), m/z 73 (28 %) y m/z 57 (22 %).

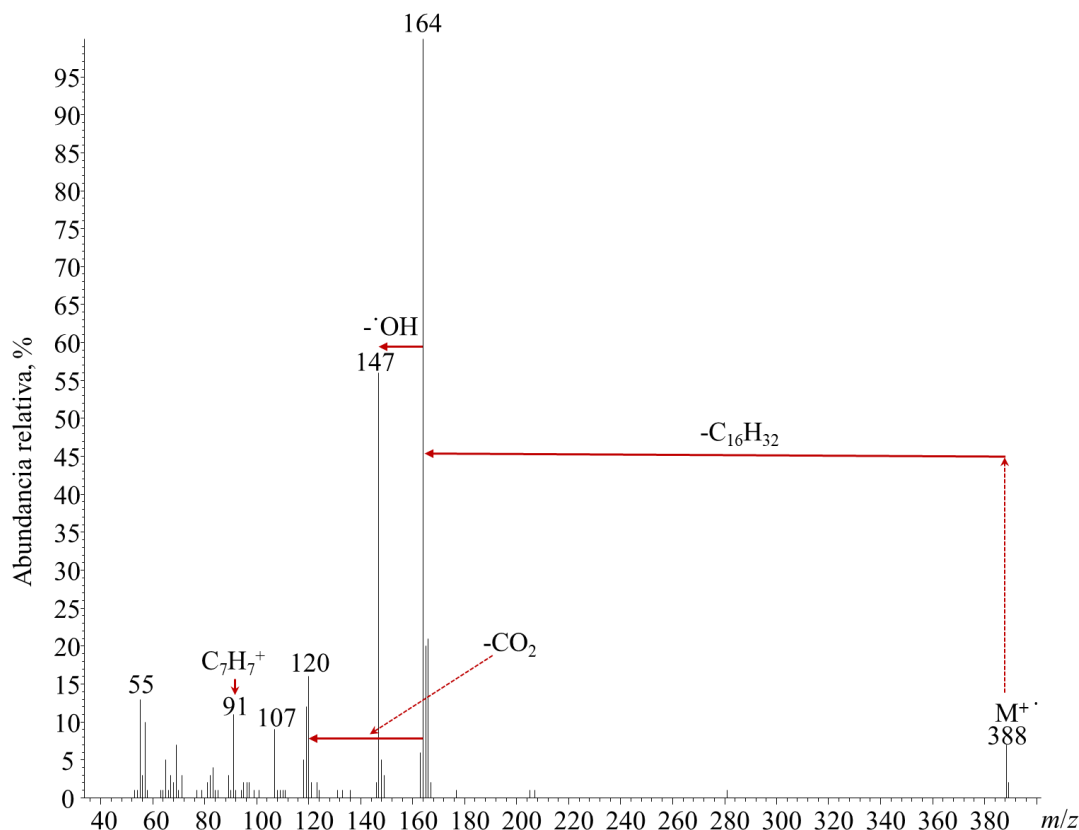


Figura 24. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto N° 10, mayoritario en los extractos MSPD de flores. M^+ (1 %), m/z 388, (1 %): m/z 164 (98 %), m/z 147 (59 %), m/z 120 (18 %), m/z 91 (13 %) y m/z 55 (14 %).

4.3.5. Fracción volátil de las flores de *A. nervosa*

Los metabolitos secundarios presentes en la fracción volátil del material vegetal fresco de *A. nervosa* también fueron analizados por GC/MS (**Figura 25**), siguiendo la metodología presentada en la sección 3.5.2. Se identificaron un total de 24 compuestos (Véase la **Tabla 5**). En la fracción volátil se encontraron mayoritariamente compuestos de tipo hidrocarburos sesquiterpénicos (86 %) y monoterpenos oxigenados (5,5 %). La **Figura 26** muestra las familias de los compuestos mayoritarios encontrados en los extractos. Los compuestos mayoritarios presentes en la fracción volátil de las flores de *A. nervosa* fueron el *trans*- β -cariofileno (46,0 %), seguido del α -copaeno (15,2 %) y el δ -cadineno (9,4 %).

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

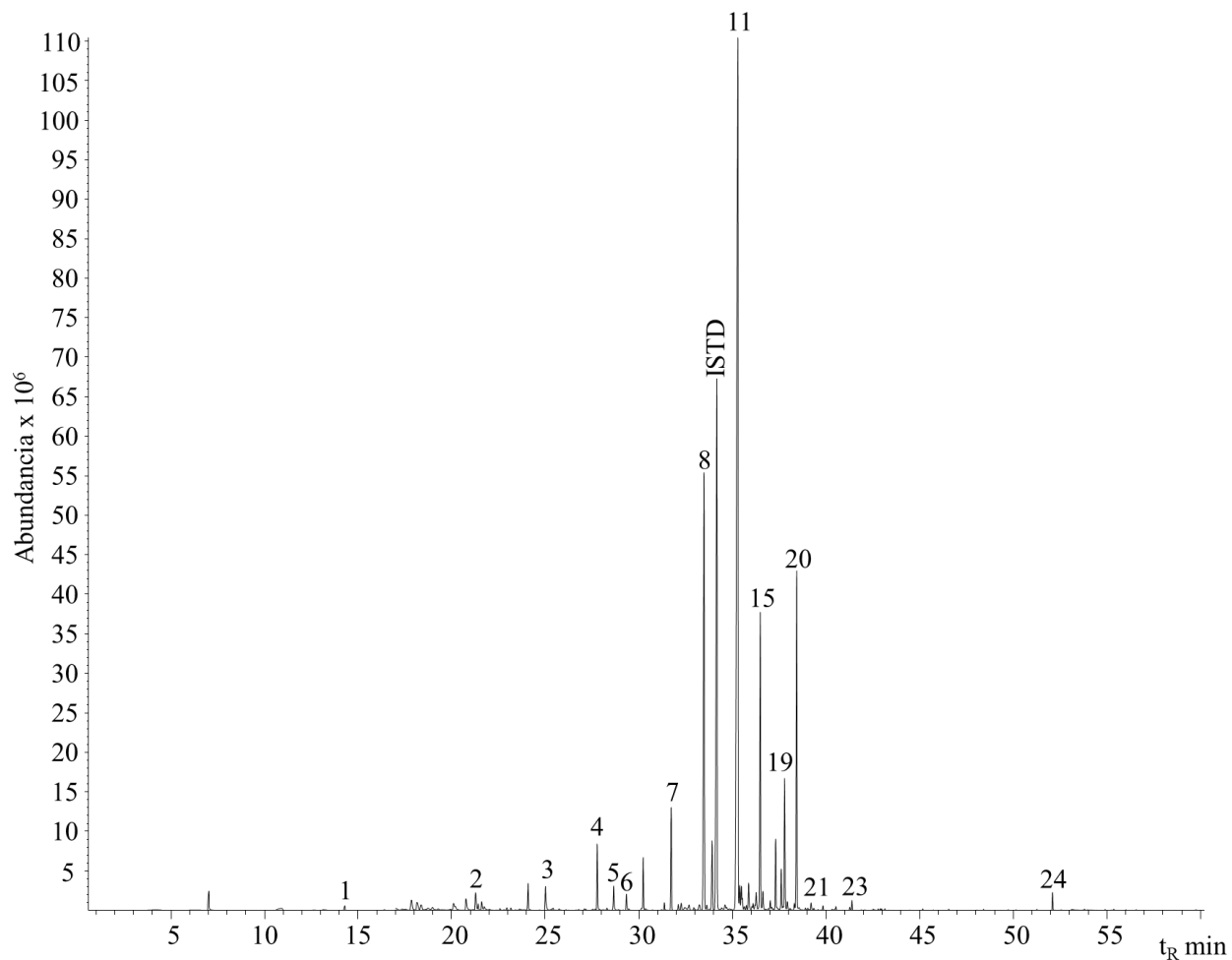


Figura 25. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) de los compuestos mayoritarios identificados en la fracción volátil de las flores de *A. nervosa*.

Tabla 5.

Identificación por GC/MS (*full scan*) de la fracción volátil de las flores de *A. nervosa*.

Fig N° 25	Compuesto	Columna DB-5MS		
		IRL _{exp}	IRL _{lit}	Área relativa GC, %
1	Metoxifenil-oxima	900	-	1,0
2	2-Octenal ^{a,b}	1061	1060 [2]	0,6
3	Citronelal ^{a,b}	1154	1154 [1]	0,8
4	Citronelol ^{a,b}	1227	1228 [1]	1,7
5	Geraniol ^{a,b}	1252	1255 [1]	0,7

Tabla 5. Continuación.

Fig N° 25	Compuesto	Columna DB-5MS		
		IRL _{exp}	IRL _{lit}	Área relativa GC, %
6	Geranial ^{a,b}	1270	1270 [1]	0,4
7	δ -Elemeno ^{a,b}	1336	1338 [2]	2,7
8	α -Copaeno ^{a,b}	1383	1383 [1]	15,2
9	β -Elemeno ^{a,b}	1395	1391 [1]	2,2
11	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b}	1434	1431 [1]	46,0
12	γ -Elemeno ^{a,b}	1436	1435 [2]	0,7
13	C ₁₅ H ₂₄ ^a	1439	-	0,7
14	C ₁₅ H ₂₄ ^a	1450	-	0,8
15	C ₁₅ H ₂₄ ^a	1468	-	8,7
16	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b}	1472	1470 [1]	0,6
17	Germacreno D ^{a,b}	1491	1485 [1]	1,9
18	Viridifloreno ^{a,b}	1499	1497 [2]	1,2
19	Biciclogermacreno ^{a,b}	1505	1499 [1]	3,6
20	δ -Cadineno ^{a,b}	1526	1524 [1]	9,4
21	α -Calacoreno ^{a,b}	1552	1549 [1]	0,2
22	β -Calacoreno ^{a,b}	1572	1563 [1]	0,1
23	α -Corocaleno ^{a,b}	1626	1623 [1]	0,2
24	Heneicosano ^{a,b}	2099	2100 [2]	0,4

Criterios de identificación:

^a Identificación tentativa basada en los datos espectrales (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90 %).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] NIST, 2011).

Fracción volátil de flores

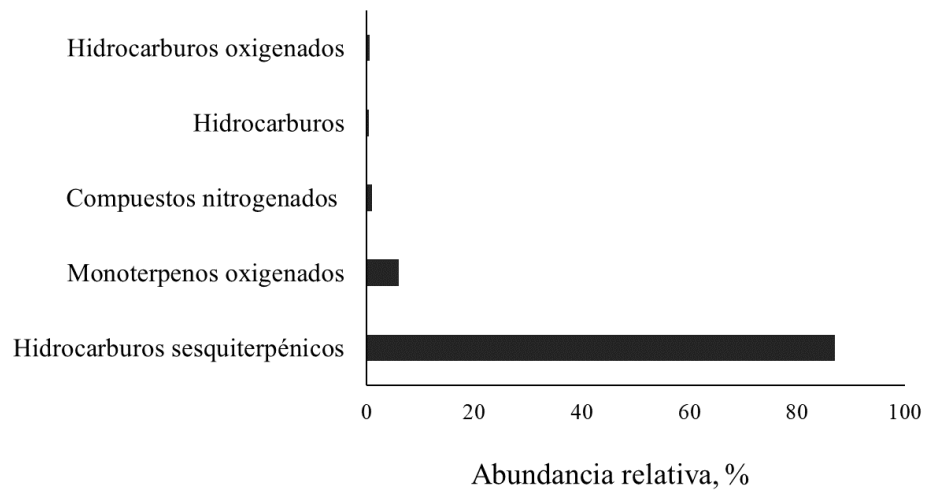


Figura 26. Porcentaje de las familias de compuestos mayoritarios presentes en la fracción volátil de las flores de *A. nervosa*.

4.4. Caracterización de metabolitos no volátiles presentes en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*

4.4.1. Metabolitos no volátiles en hojas y flores de *A. nervosa*

Los metabolitos no volátiles y termolábiles presentes en los extractos de hojas y flores de la especie *A. nervosa* fueron identificados mediante LC/MS siguiendo el procedimiento mencionado en la sección 3.6.3.

La estrategia utilizada para la identificación confirmatoria se basó en la comparación de los espectros de masas y los tiempos de retención de las sustancia de referencia certificadas. Otros criterios utilizados para la identificación tentativa fueron la comparación de los espectros de masas con las bases de datos espectrales (MassBank of North America, Food Database, Phenolexplorer, entre otras.), la determinación de la fórmula elemental y el estudio de la distribución isotópica.

El análisis permitió la identificación de diez compuestos en los diferentes extractos de hojas y flores de *A. nervosa*, ocho de ellos se identificaron de forma confirmatoria y dos tentativamente.

Los tipos de compuestos fueron dos ácidos cafeoilquínicos, una cumarina, 5 flavonoles del tipo 3-*O*-glicosilados, un aminoácido en su forma libre y un posible esteroil. En la **Tabla 6**, se muestran dichos compuestos con las masas exactas de las moléculas protonadas o deprotonadas y los respectivos fragmentos característicos. En las **Figuras 27 y 28** se muestran los perfiles cromatográficos de las corrientes iónicas extraídas para los diferentes extractos de hojas y flores de *A. nervosa*.

En el espectro de masas del ácido 1,3-dicafeoilquínico se observó la molécula deprotonada $[M-H]^-$ $C_{25}H_{23}O_{12}^-$ en m/z 515,11859 (35 %). La pérdida de 162 unidades correspondiente al fragmento cafeilo $-C_6H_6O_3$, produjo la formación del ion pico base $C_{16}H_{17}O_9^-$ m/z 353,08728 (100 %). La pérdida sucesiva de otro cafeilo a partir del ion $C_{16}H_{17}O_9^-$ m/z 353,08728 generó el ion quínico $C_7H_{11}O_6^-$ m/z 191,05490. El espectro coincidió con el obtenido para la sustancia de referencia certificada. El ácido 1,3-dicafeonilquínico no había sido reportado previamente en la literatura para la planta *A. nervosa*, no obstante, existen otras investigaciones donde se reportó la presencia en especies de plantas *Convolvulus hystrix* pertenecientes a la familia *Convolvulaceae* (El-Askary y

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

col., 2006). En la **Figura 29** se muestran los espectros de masas del compuesto y su sustancia de referencia certificada.

Uno de los flavonoles identificados fue el kaemferol-3-*O*-rutinosido. En su espectro de masas se observó la molécula protonada $[M+H]^+ C_{27}H_{31}O_{15}^+$ en m/z 595,16575 (12 %). El ion $C_{21}H_{21}O_{11}^+$ m/z 449,10730 (40 %) se observó debido a la pérdida de una de las hexosas $-C_6H_{11}O_4$. El ion pico base $C_{15}H_{11}O_6^+$ m/z 287,05469 (100 %) correspondiente a la aglicona kaemferol, se observó debido a la pérdida sucesiva $-C_6H_{11}O_4$ de la segunda hexosa. El espectro de masas fue idéntico al obtenido para la sustancia de referencia. Existen estudios que han reportado la presencia de kaemferol y sus formas glicosiladas en especies pertenecientes a la familia *Convolvulaceae* (Menemen y col., 2002). Mann y col., 1999, reportaron la presencia de kaemferoles sulfato 7-metoxilados en las raíces de *A. nervosa*. La presencia de kaemferoles de forma cualitativa en las hojas de *A. nervosa* fue reportada por Mishra y col., 2015, no obstante, no se encontraron reportes de la presencia del compuesto kaemferol-3-*O*-rutinosido en las partes de *A. nervosa*. En la **Figura 30** se muestran los espectros de masas obtenidos para el kaemferol-3-*O*-rutinosido y su material de referencia certificado.

Uno de los compuestos identificados tentativamente fue el aminoácido triptófano en su forma libre. En su espectro de masas se observó la molécula protonada $[M+H]^+ C_{11}H_{13}O_2N_2^+$ en m/z 205,09715 (5 %). El ión pico base $C_{11}H_{10}O_2N^+$ fue observado en m/z 188,07048 (100 %), formado a partir de la pérdida neutra de amoníaco $-NH_3$ en el carbono C(9). El ion m/z 159,09060 $C_{10}H_{11}N_2^+$ fue formado a partir de la pérdida de $-COOH_2$ debido a la transposición McLafferty, generada por la disponibilidad del hidrógeno gamma en la amina. El patrón de distribución isotópica obtenido para el triptófano coincidió con el calculado en el software *Xcalibur*, por otro lado, el espectro de masas reportado en la base de datos (MassBank of North America) fue muy similar al obtenido para dicho compuesto. No existen estudios en donde se reporten la presencia de aminoácidos libres en *A. nervosa*. Sin embargo, el estudio desarrollado por Dini y col., 2006, reportó la presencia de siete aminoácidos glicosilados en plantas de *Ipomoea batata* (*Convolvulaceae*). En la **Figura 31** se muestran el espectro de masas obtenido para el triptófano y su patrón de distribución isotópica.

Otro compuesto identificado de forma tentativa en los extractos de hojas y flores fue un posible esteroide del tipo 17-oxo-esteroide. Su ion molecular protonado $[M+H]^+ C_{18}H_{29}O_2^+$ se observó en m/z 277,21606 (95 %). También se registró la pérdida de agua a partir de la molécula protonada,

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

generando el ion $C_{18}H_{27}O^+$ en m/z 259,20599 (13 %). Esta pérdida es característica para los esteroides. Existen reportes de la presencia de fitoesteroides en *A. nervosa*. Sahu y Chakravarti, 1971, reportaron la presencia del β -sitosterol en las hojas de la planta. Ali y col., 2011, reportaron la presencia de estigmasterilo en partes aéreas de *A. nervosa*. En la **Figura 32** se muestran el espectro de masas obtenido para el posible esteroide y su patrón de distribución isotópica.

Varios de los flavonoides y los ácidos cafeoilquínicos identificados, presentaron fragmentos característicos debido a que pertenecen a una misma familia. En la **Figura 33** se muestran los fragmentos característicos y sus intensidades relativas para algunas de estas sustancias.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

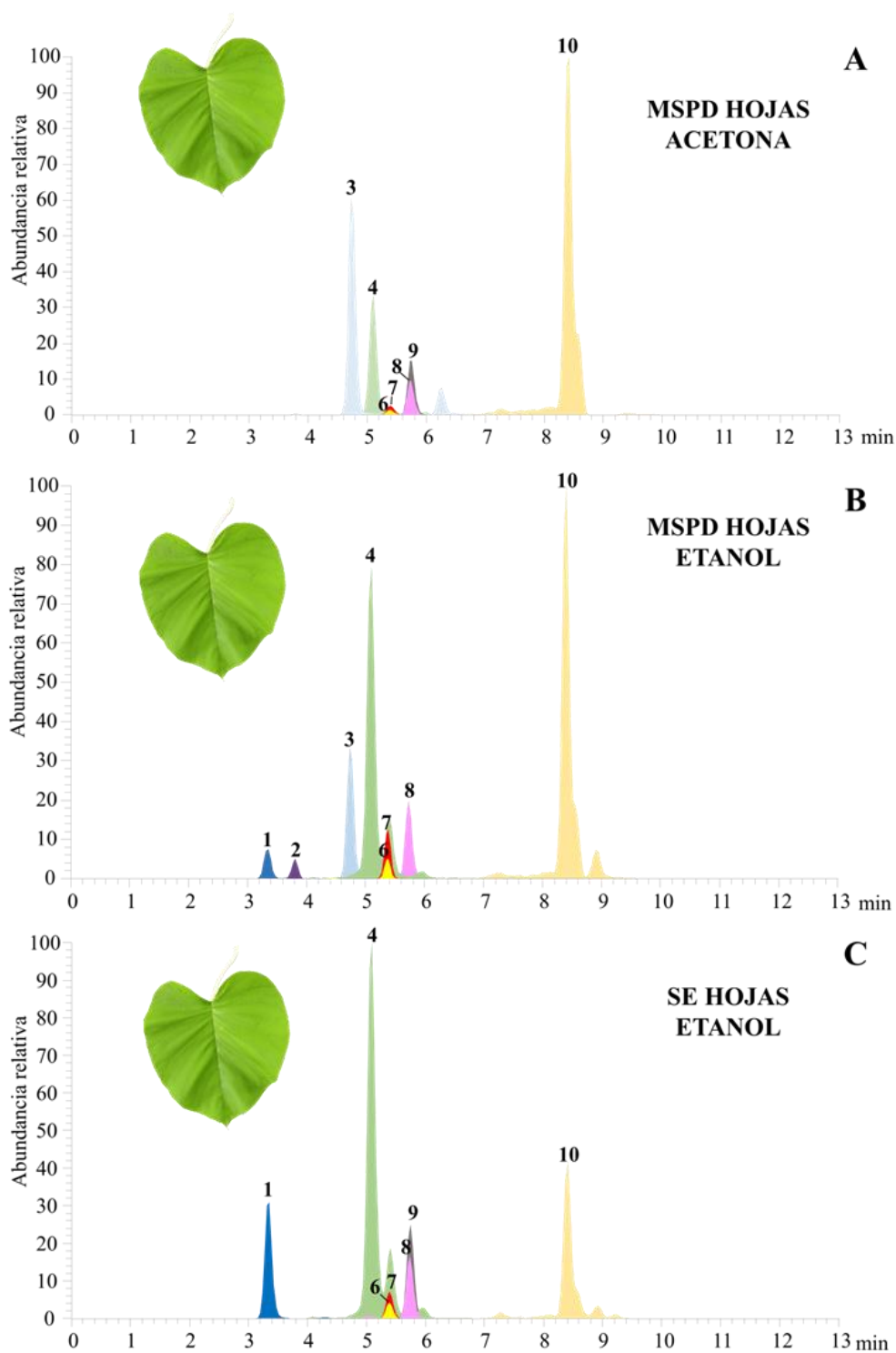


Figura 27. Perfiles cromatográficos obtenidos por LC/MS (corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas y deprotonadas ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) de los compuestos identificados en las hojas de *A. nervosa*.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

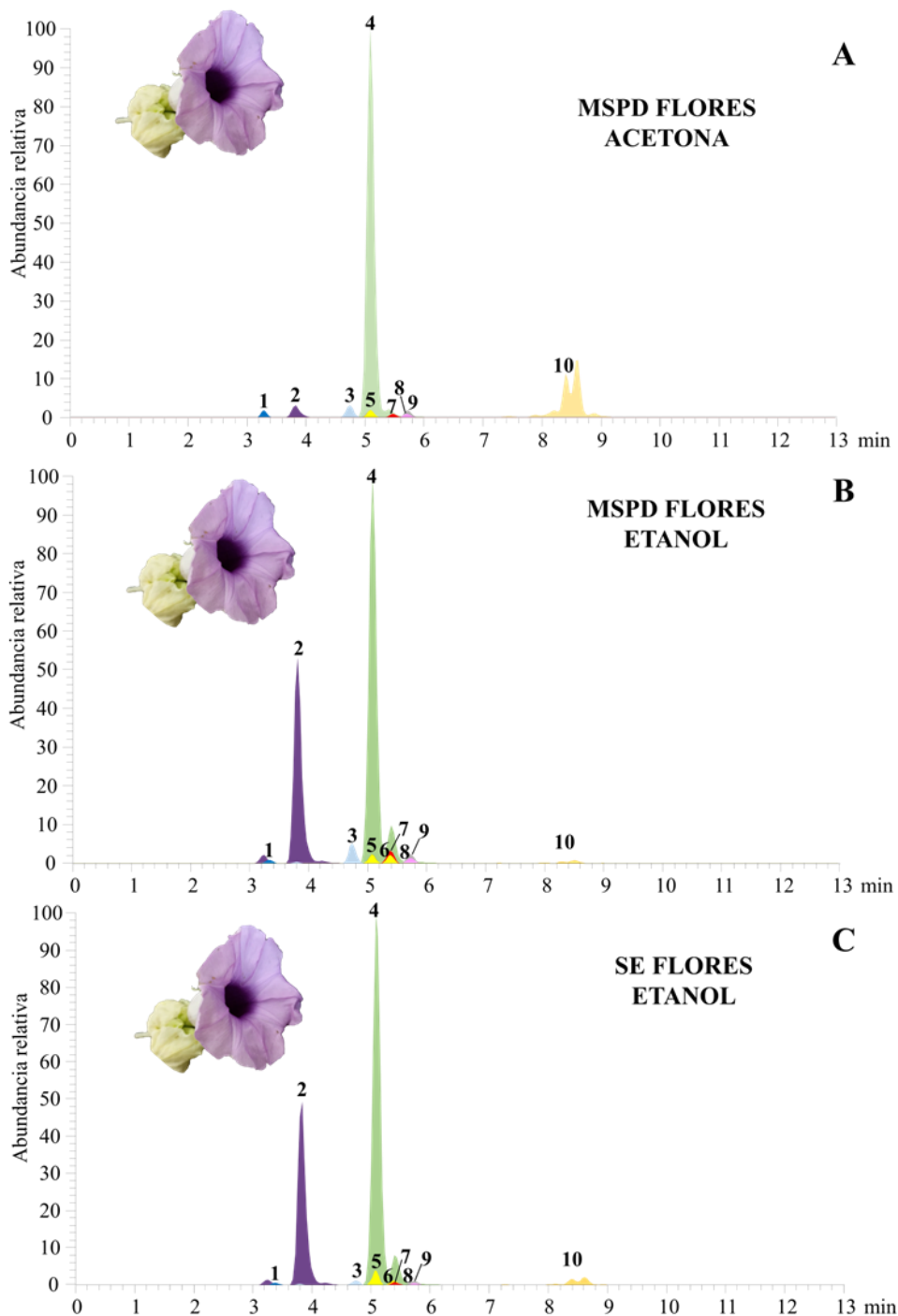


Figura 28. Perfiles cromatográficos obtenidos por LC/MS (corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas y deprotonadas ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) de los compuestos identificados en las flores de *A. nervosa*.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Tabla 6.

Identificación por LC/MS de los compuestos no volátiles en extractos de hojas y flores de *A. nervosa*.

N° Fig. 27 y 28	Compuesto	Fórmula	HCD, eV	[M+H] ⁺ o [M-H] ⁻ (I, %) Experimental	Error Δppm	Fragmentos característicos m/z (I, %)	Crit. ident.	Referencias
1	Triptófano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	10	205,09700	0,75	188,07048 (100); 146,05997 (24)	b, c	-
2	Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	10	353,08737	1,8	191,05524 (100 %)	a, b, c	Salehi y col., 2019
3	Escopoletina	C ₁₀ H ₈ O ₄	20	193,04951	0,1	133,02835 (95); 178,02586 (70)	a, b, c	Patel y col., 2022
4	Ácido 1,3- dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	10	515,11859	0,3	353,08728 (100); 191,05490 (5)	a, b, c	Salehi y col., 2019
5	Kaemferol-3- <i>O</i> -β- soforósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	20	611,15997	1,1	287,05438 (95); 449,10706 (40)	a, b, c	Menemen y col., 2002
6	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	10	611,15997	2,2	303,04983 (100); 465,10193 (20)	a, b, c	Menemen y col., 2002
7	Quercetina-3- <i>O</i> - glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	10	465,10141	2,8	303,04950 (100)	a, b, c	Menemen y col., 2002; Lubna y col., 2021

Tabla 6. Continuación.

N° Fig. 27 y 28	Compuesto	Fórmula	HCD, eV	[M+H] ⁺ o [M-H] ⁻ (I, %) Experimental	Error Δppm	Fragmentos característicos <i>m/z</i> (I, %)	Crit. ident.	Referencias
8	Kaemferol-3- <i>O</i> -rutinosido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	10	595,16632	0,9	287,05469 (100); 449,10730 (40)	a, b, c	Menemen y col., 2002
9	Kaemferol-3-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	20	449,10721	1,4	287,05447 (100)	a, b, c	Menemen y col., 2002
10	Derivado de esteroide	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	30	277,21606	0,5	137,05974 (80); 235,16924 (40); 259,20599 (12)	b, c	-

Criterios de identificación:

^a Identificación confirmatoria basada en la comparación de los espectros de masas y los tiempos de retención de las sustancias de referencia certificadas.

^b Identificación tentativa basada en el análisis de los espectros de masas, la determinación de la fórmula elemental de la molécula protonada o deprotonada ([M+H]⁺, [M-H]⁻), el estudio de la distribución isotópica y los patrones de fragmentación.

^c Identificación tentativa basada en la comparación de los espectros de masas reportados en las bases de datos y la literatura.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

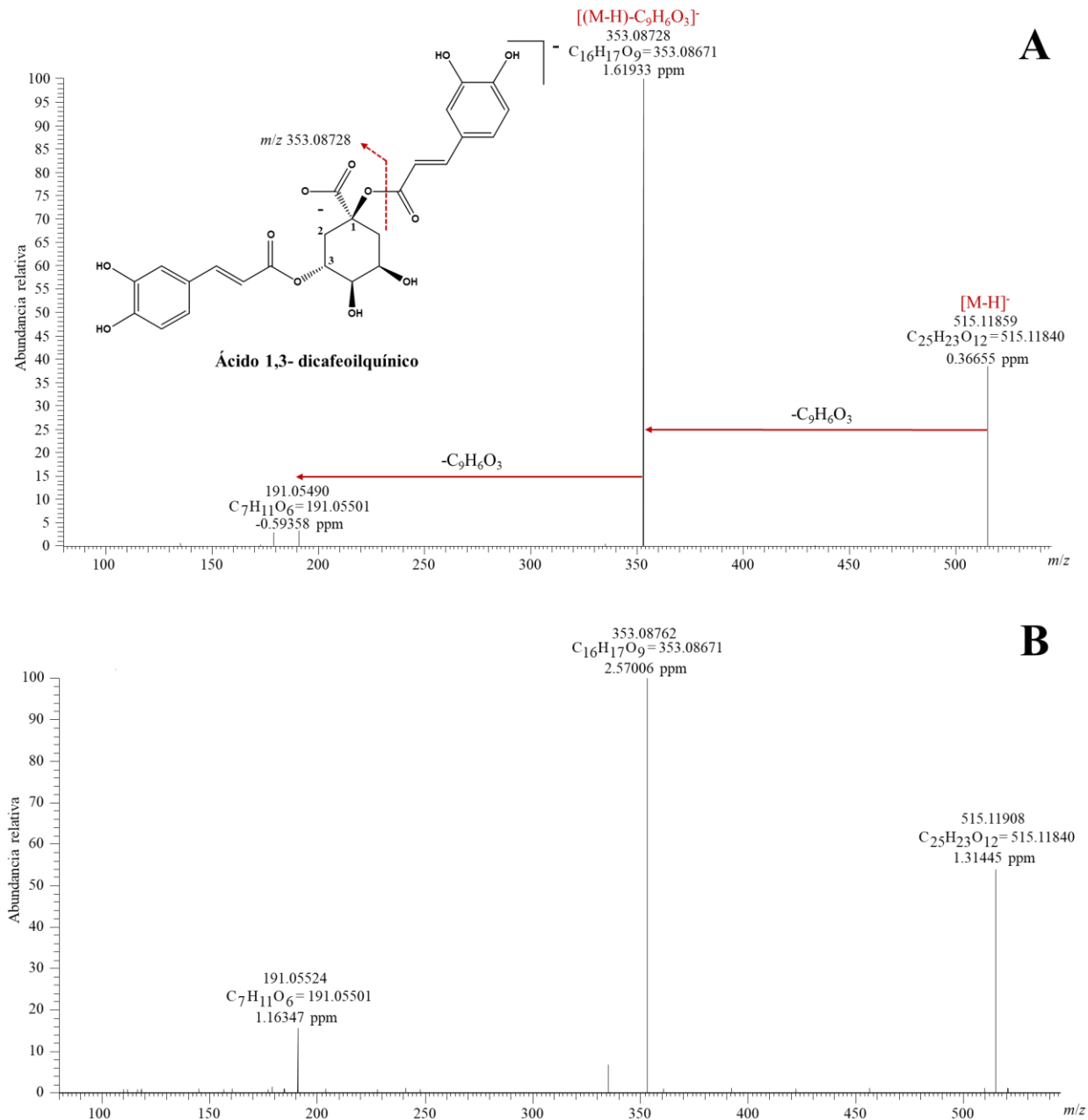


Figura 29. **A.** Espectro de masas de la molécula deprotonada $[M-H]^-$ adquirido en modo SIM del ácido 1,3-dicafeoilquinico. **B.** Espectro de masas de la sustancia de referencia ácido 1,3-dicafeoilquinico.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

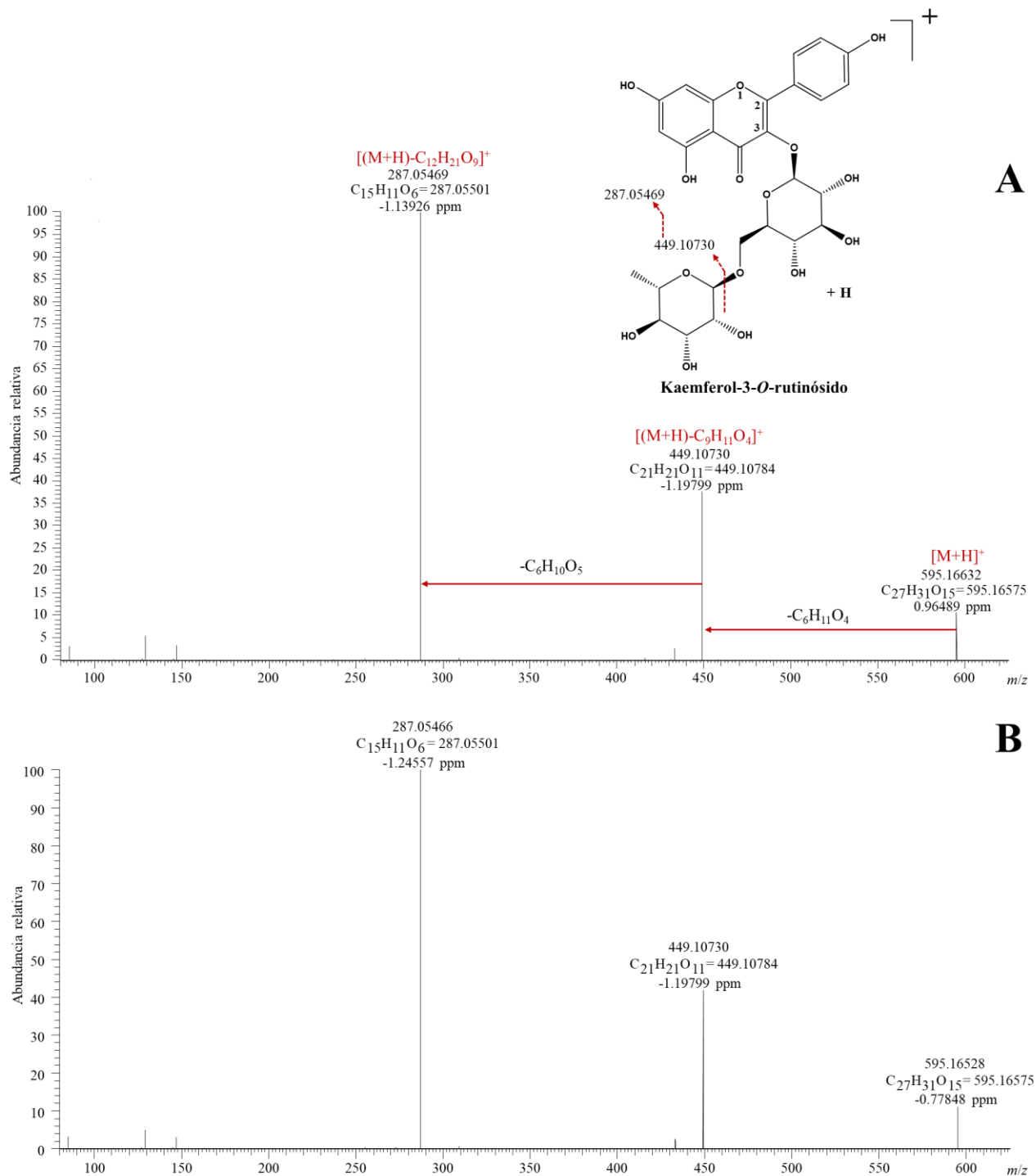


Figura 30. A. Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$ adquirido en modo SIM del kaempferol-3-O-rutinósido. B. Espectro de masas de la sustancia de referencia kaempferol-3-O-rutinósido.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

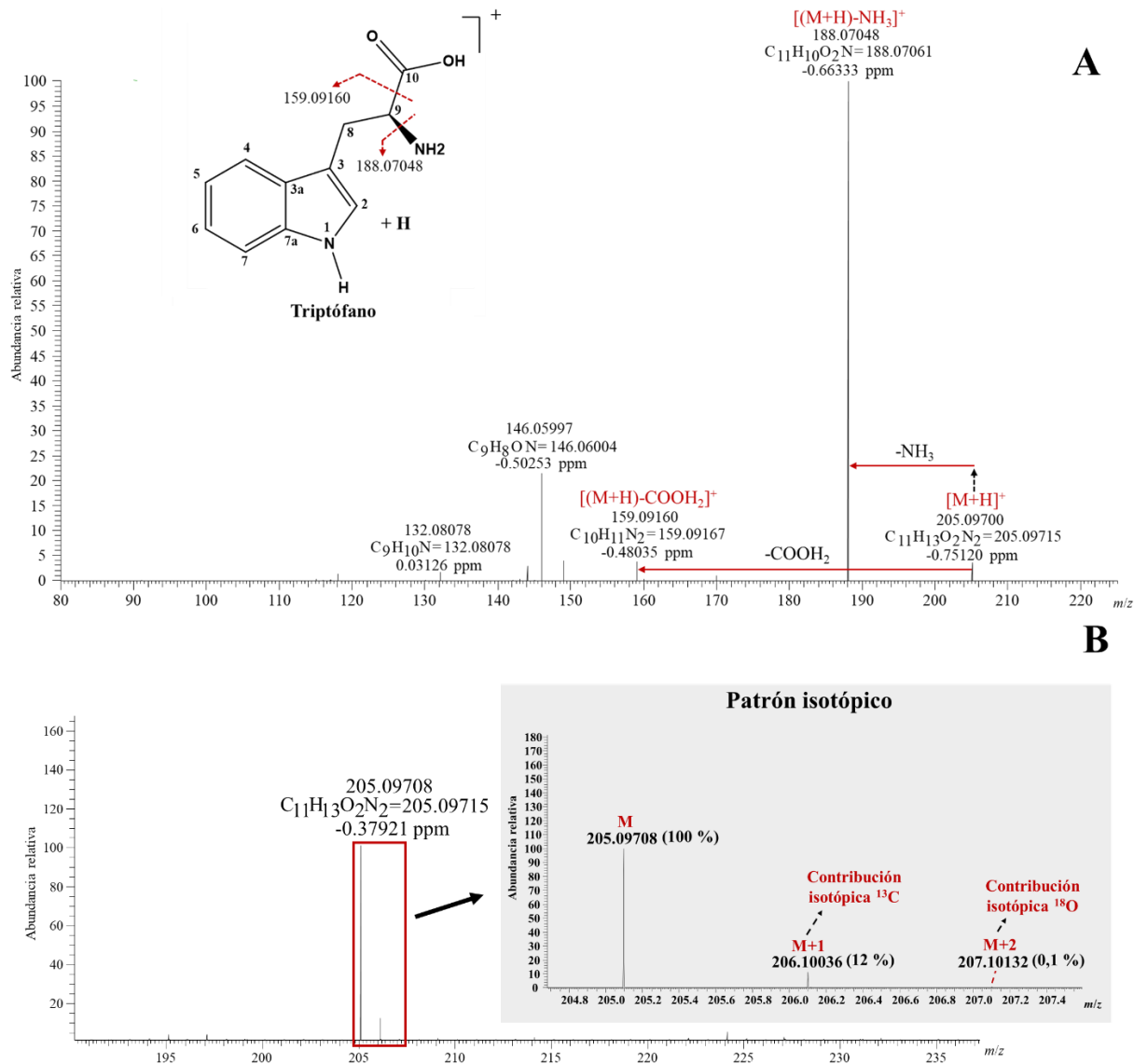


Figura 31. A. Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$ adquirido en modo SIM del triptófano. B. Patrón de distribución isotópica obtenido para el triptófano.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

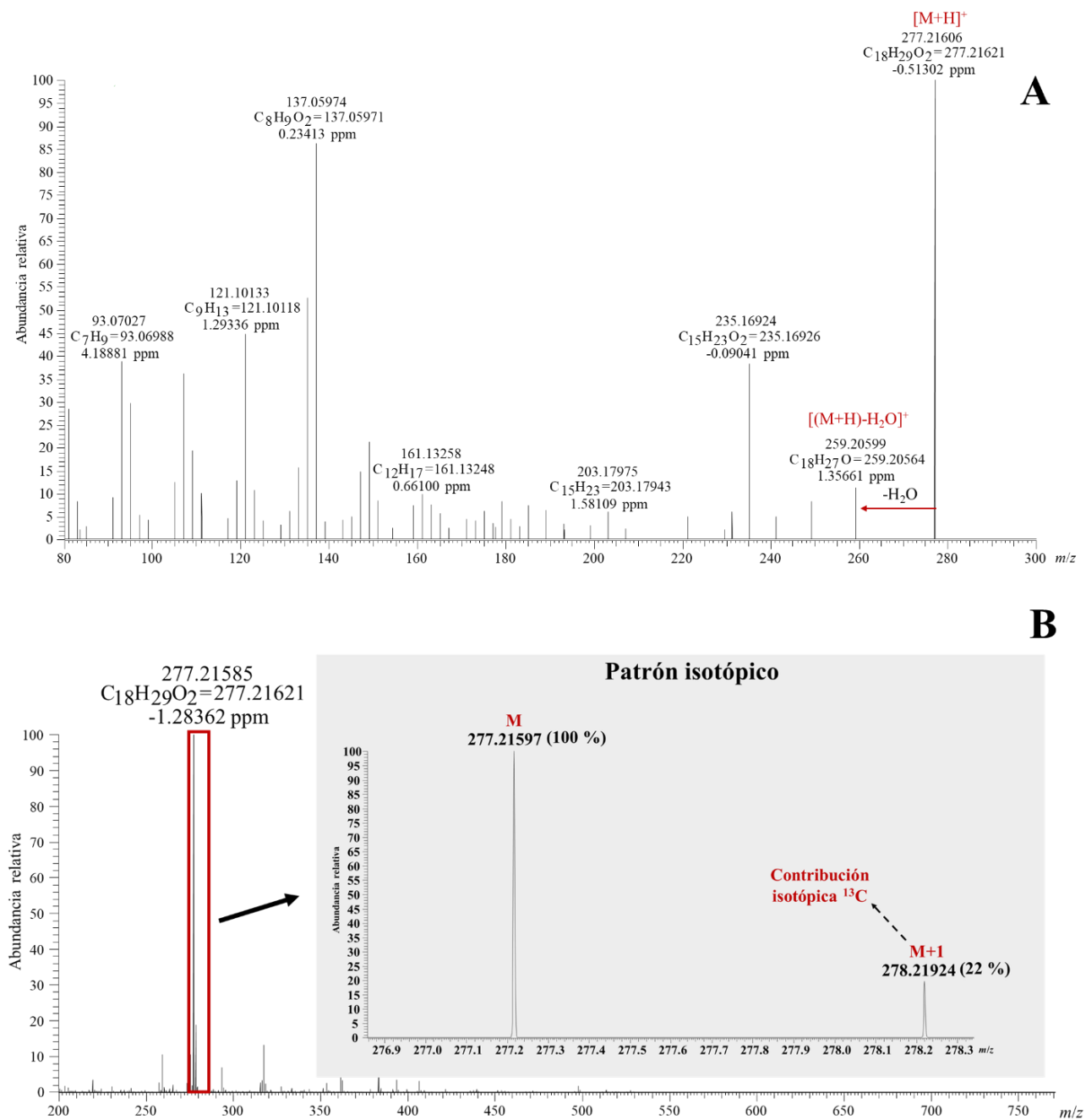
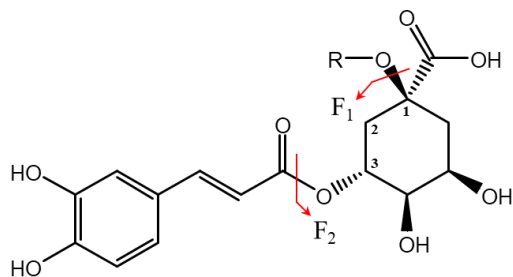


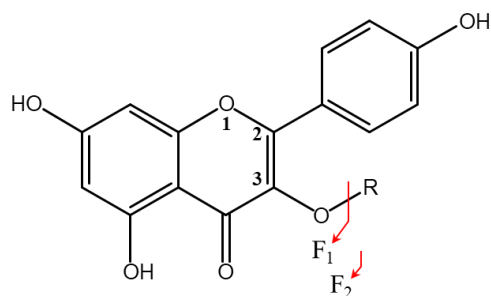
Figura 32. A. Espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$ adquirido en modo SIM del posible esteroide. B. Patrón de distribución isotópica obtenido para el compuesto.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*



Compuesto	R
Ácido 1,3-diacfeoilquínico	Cafeoilo
Ácido clorogénico	H

Compuesto	HCD, eV	Iones fragmento característicos, m/z (I, %)		
		[M-H] ⁻	F ₁	F ₂
Ácido 1,3-diacfeoilquínico	10	515,11859	353,08728 (100)	191,05490 (6)
Ácido clorogénico	20	353,08737	-	191,05524 (100)



Compuesto	R
Kaempferol-3- <i>O</i> -β-soforósido	Soforósido
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido	Rutinósido
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	Glucósido

Compuesto	HCD, eV	Iones fragmento característicos, m/z (I, %)		
		[M+H] ⁺	F ₁	F ₂
Kaempferol-3- <i>O</i> -β-soforósido	20	611,15997	287,05438 (100)	449,10706 (40)
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido	10	595,16632	287,05469 (100)	449,10730 (40)
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	20	449,10721	287,05447 (100)	-

Figura 33. Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) observados en los espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides de tipo kaempferol-3-*O*-glicosilados identificados en la especie *A. nervosa*.

4.5. Contenido de metabolitos no volátiles en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*

El contenido de metabolitos no volátiles se determinó por LC-MS mediante la construcción de curvas de calibración con cada una de las sustancias de referencias certificadas de cada compuesto (véase la sección 3.6.5.). Los resultados se expresaron en miligramos de compuesto por cada gramo de extracto (mg/g). Las áreas cromatográficas de cada compuesto se obtuvieron extrayendo las corrientes iónicas de las masas exactas protonadas o deprotonadas ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) obtenidas en modo SIM. La **Tabla 6** muestra el contenido de cada compuesto encontrado en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*. Las hojas y flores presentaron principalmente ácidos cafeoilquínicos y flavonoles-3-*O*-diglicosilados. En contraste con las flores, en las hojas no estuvo presente el kaemferol-3-*O*- β -soforósido, por otro lado, el ácido 1,3-dicafeonilquínico, fue mayoritario en todos los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*. En la **Figura 34** se muestran las cantidades obtenidas en todos los extractos para este compuesto junto con el ácido clorogénico.

Tabla 7.

Contenido en mg/g de extracto de los compuestos identificados en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*.

No Fig. 20	Compuesto	Contenido, mg/g (n=3; x \pm s)					
		Hojas			Flores		
		MSPD acetona	MSPD etanol	SE etanol	MSPD acetona	MSPD etanol	SE etanol
1	Ácido clorogénico	N.D.	3,76 \pm 0,08	N.D.	4,54 \pm 0,07	16,4 \pm 0,7	22 \pm 9
2	Escopoletina	0,43 \pm 0,01	< LOQ	N.D.	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3	Ácido 1,3- dicafeoilquínico	14,3 \pm 0,2	35 \pm 1	34 \pm 1	43,4 \pm 0,7	45,1 \pm 0,7	43 \pm 8
4	Kaemferol-3- <i>O</i> - β - soforósido	N.D.	N.D.	N.D.	0,89 \pm 0,05	0,68 \pm 0,01	1,4 \pm 0,1
5	Rutina	4,36 \pm 0,02	9,96 \pm 0,01	2,63 \pm 0,03	N.D.	3,84 \pm 0,06	3,40 \pm 0,05
6	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	2,20 \pm 0,07	19 \pm 8	12,3 \pm 0,5	0,87 \pm 0,03	13 \pm 1	4,3 \pm 0,1
7	Kaemferol-3- <i>O</i> -rutinósido	12,2 \pm 0,5	13 \pm 4	21 \pm 1	2,18 \pm 0,07	2,20 \pm 0,05	1,060 \pm 0,007
8	Kaemferol-3- <i>O</i> -glucósido	12,1 \pm 0,1	N.D.	5,18 \pm 0,08	0,36 \pm 0,03	2,365 \pm 0,004	0,386 \pm 0,005
Contenido total		45,5	80,8	75,1	52,2	83,6	75,5

Contenido de ácidos hidroxicinámicos en *A. nervosa*

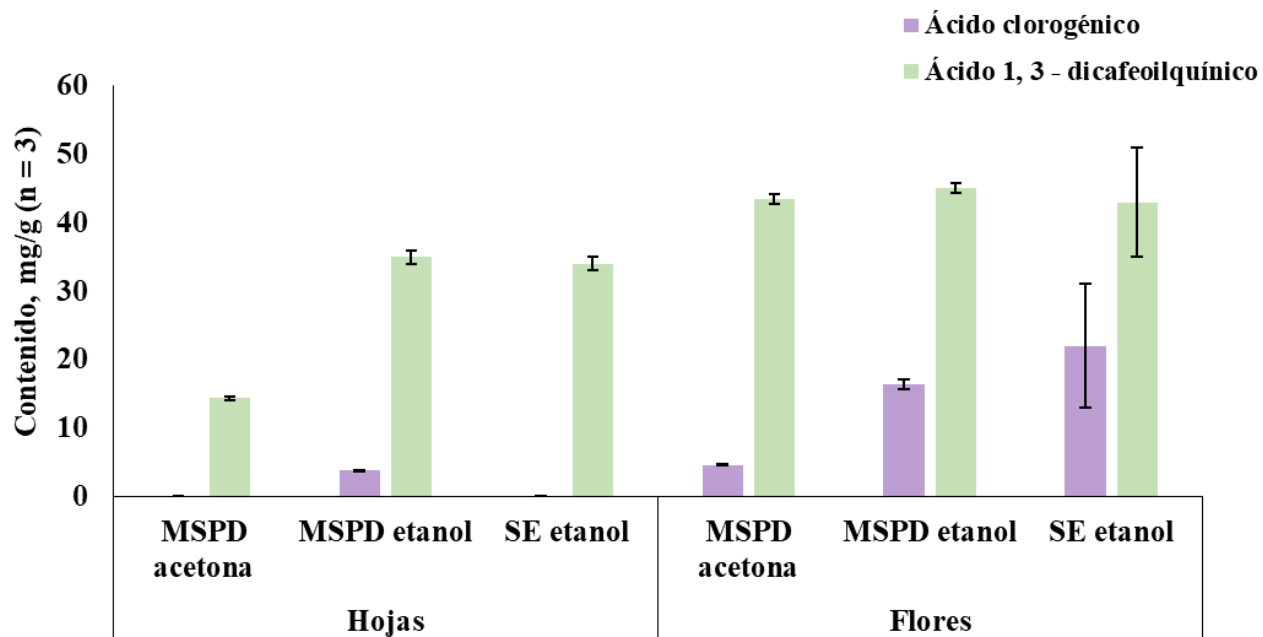


Figura 34. Contenido en mg/g de los ácidos cafeoilquinicos identificados en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*.

4.6. Alcaloides ergolínicos en *A. nervosa*

Los alcaloides ergolínicos (AEs) presentes en los extractos de las semillas de la especie *A. nervosa* fueron identificados mediante LC/MS siguiendo el procedimiento mencionado en la secciones 3.4. y 3.6.3.

La estrategia utilizada para la identificación se basó en la elucidación de las fórmulas moleculares a partir de las masas exactas de las moléculas protonadas y los iones característicos para los alacloides ergolínicos obtenidos a partir de las sutancia de referencia dietilamida del ácido lisérgico (por sus siglas en inglés, LSD). Otros criterios utilizados para la identificación tentativa fueron la comparación de los espectros de masas con las bases de datos espectrales (MassBank of North

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

America, Foodb Database, Phenolexplorer, entre otras.), la determinación de la fórmula elemental y el estudio de la distribución isotópica.

El análisis permitió la identificación de 12 compuestos en los extractos de semillas de *A. nervosa*. (véase la **Figura 35**). De los 12 compuestos, nueve correspondieron a alcaloides ergolínicos, siete del tipo ácido lisérgico y dos del tipo clavina. Los otros tres compuestos correspondieron a dos ácidos hidroxicinámicos y un derivado de esteroide (véase la **Tabla #**).

El análisis y estudio del patrón de fragmentación de la sustancia de referencia certificada LSD, permitió la observación de las rupturas típicas y los iones fragmentos característicos para esta familia de alcaloides (m/z 223,12241, m/z 208,07535, entre otros.). Para el LSD, se observaron su ion molecular protonado $[M+H]^+$ $C_{20}H_{26}ON_3^+$ en m/z 324,20688 (26 %) y sus iones fragmento característicos $C_{19}H_{23}ON_3^+$ en m/z 309,18641 (4 %) debido a la pérdida del radical metilo $\cdot CH_3$ enlazado al nitrógeno N(6) perteneciente al hetrociclo tipo azina, el ion pico base $C_{15}H_{15}N_2^+$ en m/z 223,12294 (100%) generado por la pérdida del radical $\cdot CON(CH_2H_3)_2$ debido a la ruptura alfa en el carbono C(8) de la azina. Este ion es carcterístico en los alcaloides ergolínicos y corresponde al nucleo estructural de las ergolinas, que da origen a una gran variedad de compuestos de este tipo (Gerhards y col., 2014, Wallwey y col., 2010, Paulke y col., 2015). El ion fragmento $C_{13}H_{10}N^+$ observado en m/z 180,08084 (6 %) fue formado a partir del precursor m/z 223,12294 debido a la ruptura tipo Retro-Diels-Alder en los enlaces de los átomos C(8)-C(7) y N(6)-C(5) del anillo tipo azina.

El ion m/z 208,07579 (13 %), característico para los AEs también fue observado. La estructura y formula molecular de este ion aún no ha sido claramente elucidada en los reportes existentes, algunos autores sugieren que la formación de este ocurre a partir de la doble ruptura en los enlaces de los átomos C(8) y el grupo amida y el N(6) con el sustituyente metilo, no obstante, en estos estudios no se utilizaron equipos de alta resolución, los cuales permitieran obtener una masa exacta y permitir determinar la fórmula molecular (Lehner y col., 2004). En otro estudio, en el cual fue utilizada una herramienta de detección de alta resolución, los investigadores sugirieron dos rutas para la formación de este ion a partir del ion molecular como precursor, en el primer caso, ocurriría la pérdida simultánea de $-NCH_3$ y $-NH_2$ seguido de una desintegración del nucleo del indol y la pérdida de su nitrógeno, la cual formaría el ion $C_{15}H_{12}O^+$ ($\Delta ppm=9,6$). El segundo caso sería la formación del ion $C_{13}H_{10}N_3^+$ ($\Delta ppm=9,2$), por medio de la ruptura en los enlaces de los átomos

C(5) y el N(1) para luego realizar una reorganización en la estructura y generar un ion más estable (Paulke y col., 2014). En la presente investigación, se obtuvo la masa exacta para este ion fragmento en m/z 208,07579 con un error de $\Delta\text{ppm}=0,4$, se probaron todas las posibles fórmulas moleculares reportadas previamente en la literatura y para todas se obtuvieron errores mayores que $\Delta\text{ppm}=10$, la fórmula molecular para la cual se obtuvo el error más bajo correspondió al ion $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ON}^+$, para el cual se sugiere que su formación podría darse debido a la ruptura tipo Retro-Diels-Alder entre los enlaces de los átomos C(7)-C(8) y C(5)-N(6) en el fragmento m/z 251,11790 proveniente de la pérdida del nitrógeno amidínico y sus sustituyentes mediante una ruptura alfa. En la **Figura 36** se muestran el espectro de masas obtenido en modo SIM de la sustancia de referencia LSD y las estructuras moleculares de sus iones fragmento característicos.

Uno de los AEs detectados en los extractos de las semillas fue la amida del ácido lisérgico (por sus siglas en inglés, LSA). Su ion molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ON}_3^+$ se observó en m/z 268,14355 (78 %). El ion $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ON}_2^+$ fue observado en m/z 251,11703 (12 %), debido a la pérdida neutra de amoniaco $-\text{NH}_3$ mediante la ruptura alfa en el nitrógeno amidínico. El ion piro base $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2^+$ registrado en m/z 223,12227 (98 %) se observó por la pérdida del grupo amida $-\text{CONH}_2$ mediante una ruptura alfa entre los enlaces del carbono C(8) y el carbono sp^2 del grupo amida. Otro ion observado fue el $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2^+$ registrado en m/z 197,10680 (14 %), este ion podría ser formado debido a la pérdida de acetileno $-\text{CH}_2\text{CH}$ del fragmento m/z 223,12227 (Paulke y col., 2015). Se observó el ion $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}^+$ en m/z 180,08023 (7 %) debido a la ruptura típica tipo Retro-Diels-Alder en el ciclo tipo azina del ion fragmento m/z 251,11703. Por último, se observó el ion $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ON}^+$ en m/z 208,07510 (58 %), la formación de este ion podría ocurrir mediante la ruta ya planteada en el estudio del patrón de fragmentación de la sustancia de referencia LSD. En la **Figura 37** se muestran el espectro de masas obtenido en modo SIM para la amida de ácido lisérgico y la formación de sus iones fragmento característicos.

El monitoreo de los iones fragmento característicos m/z 251,11703, m/z 223,12227, m/z 208,07510, m/z 197,10680 y m/z 180,08023 facilitó la identificación de los alcaloides ergolínicos del tipo ácido lisérgico y algunos del tipo clavina. En la **Figura 38** se muestran las rupturas típicas y los iones fragmentos característicos con sus intensidades relativas para algunos de los alcaloides ergolínicos detectados en los extractos de semillas de *A. nervosa*.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

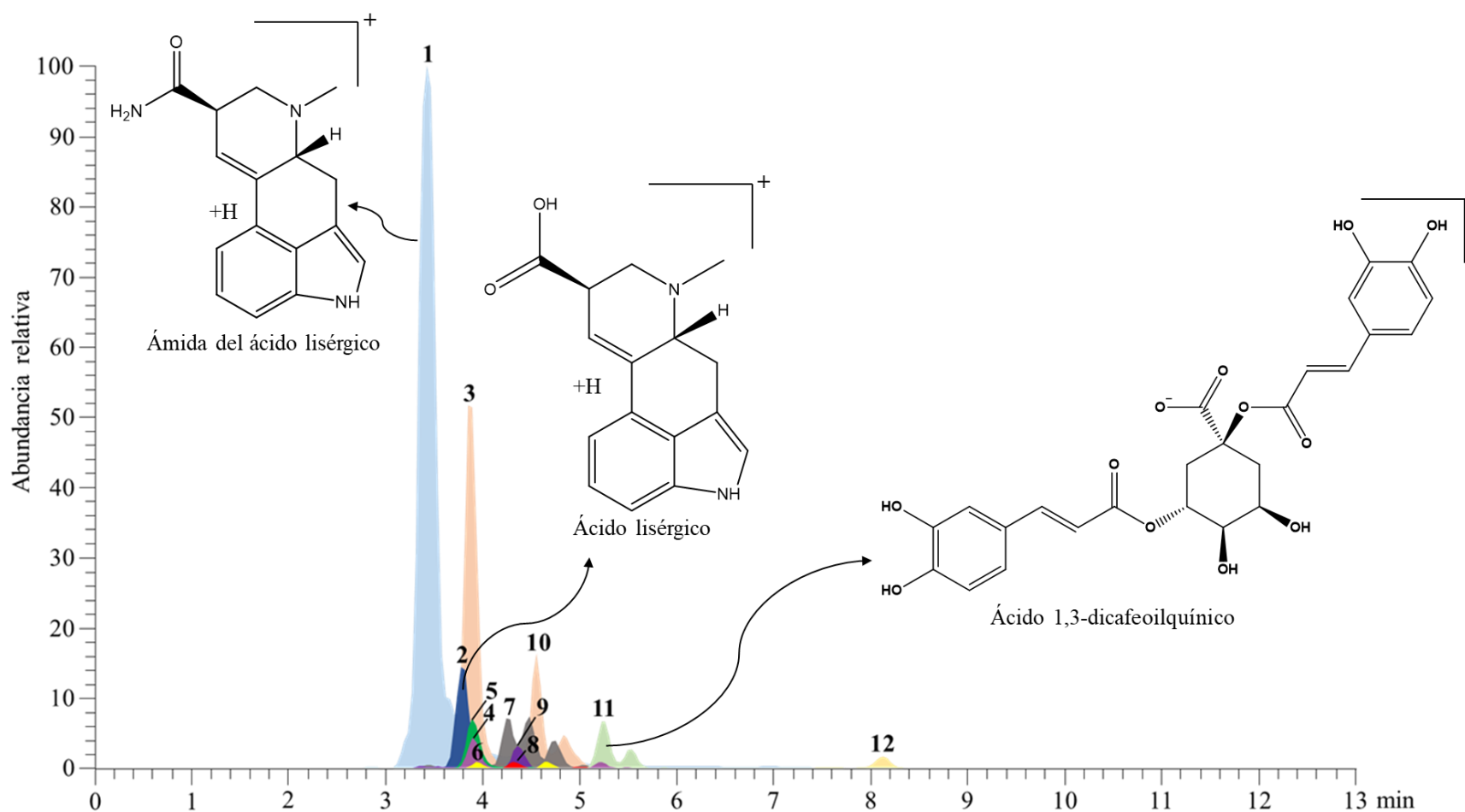


Figura 35. Perfil cromatográfico (corrientes iónicas extraídas de las masas exactas de las moléculas protonadas y deprotonadas ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) de las sustancias detectadas en los extractos de semillas de *A. nervosa*.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Tabla 8.

Identificación por LC/MS de los alcaloides ergolínicos en extractos de semillas de *A. nervosa*.

N° Fig. #	Compuesto	Fórmula	HCD, eV	[M+H] ⁺ o [M-H] ⁻ (I, %) Experimental	Error Δppm	Fragmentos característicos m/z (I, %)	Crit. ident.	Ref.
1	Ámida del ácido lisérgico	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O	40	268,14355	3,2	223,12227 (98); 208,07510 (55); 251,11703 (12)	b, c, d	Chao y col., 1973 Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
2	Ácido lisérgico	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂	20	269,12784	2,2	223,12250 (95); 208,07535 (35); 254,10439 (30)	b, c, d	Chao y col., 1973 Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
3	Ergometrina	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₂	20	326,18530	3,0	223,12241 (100); 208,07520 (32); 283,14330 (22); 311,16190 (7)	b, c, d	Chao y col., 1973; Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
4	Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	10	353,08737	1,8	191,05524 (100)	a, c, d	Salehi y col., 2019
5	Lisergol	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₂	20	255,18477	1,6	208,07547 (44); 197,10696 (19)	b, c, d	Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
6	Lisergilalanina	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₃	10	340,16467	2,6	223,12247 (100); 208,07536 (50); 251,11728 (18)	b, c, d	Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Tabla 8. Continuación.

N° Fig. #	Compuesto	Fórmula	HCD, eV	[M+H] ⁺ o [M-H] ⁻ (I, %) Experimental	Error Δppm	Fragmentos característicos <i>m/z</i> (I, %)	Crit. ident.	Ref.
7	Chanoclavina	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O	10	257,16437	1,8	168,08035 (100); 208,11157 (45); 193,08829 (22); 223,12244 (10)	b, c, d	Chao y col., 1973; Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
8	Metilergometrina	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₂	20	340,20139	1,6	223,12250 (100); 168,08052 (42); 208,07538 (26); 294,15930 (22)	b, c, d	Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
9	Metilcarbonilamida del ácido lisérgico	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₂	20	312,17004	1,9	223,12244 (100); 268,14371 (59); 294,15924 (25); 208,07530 (22)	b, c, d	Chao y col., 1973; Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
10	Isoergometrina	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₂	30	326,18567	1,9	208,07536 (100); 223,12242 (44); 180,08041 (10)	b, c, d	Chao y col., 1973; Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015
11	Ácido dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	10	515,11859	0,3	353,08728 (100); 191,05490 (5)	a, c, d	Salehi y col., 2019
12	Derivado de esterol	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	30	277,21606	0,5	137,05974 (80); 235,16924 (40); 259,20599 (12)	c, d	-

Tabla 8. Continuación.

Criterios de identificación:

- ^a Identificación confirmatoria basada en la comparación de los espectros de masas y los tiempos de retención de las sustancias de referencia certificadas.
- ^b Identificación tentativa basada en la comparación de los espectros de masas, la fórmula molecular obtenida de las masas exactas de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ y los fragmentos característicos m/z 223,12244 y m/z 208,07536 para los alcaloides ergolínicos tipo ácido lisérgico y derivados de clavinas.
- ^c Identificación tentativa basada en el análisis de los espectros de masas, la determinación de la fórmula elemental de la molécula protonada o deprotonada ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$), el estudio de la distribución isotópica y los patrones de fragmentación.
- ^d Identificación tentativa basada en la comparación de los espectros de masas reportados en las bases de datos y la literatura.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

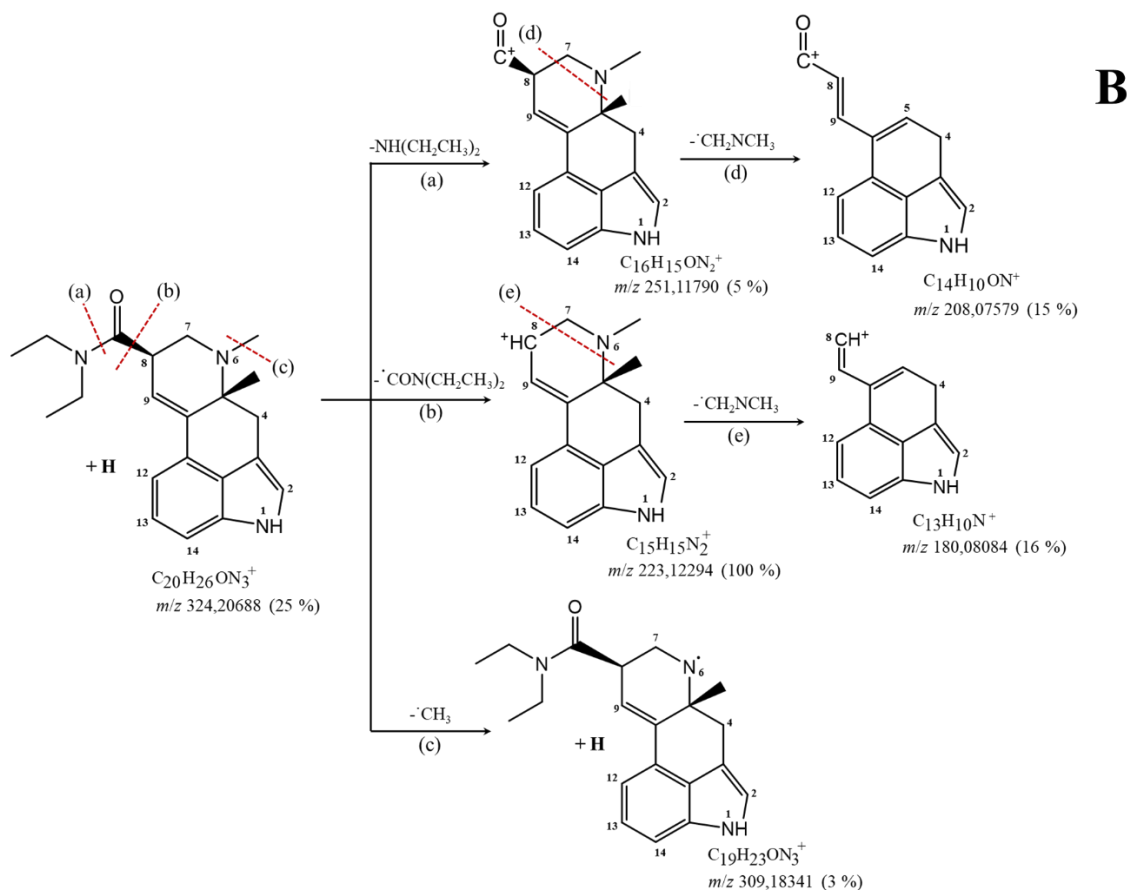
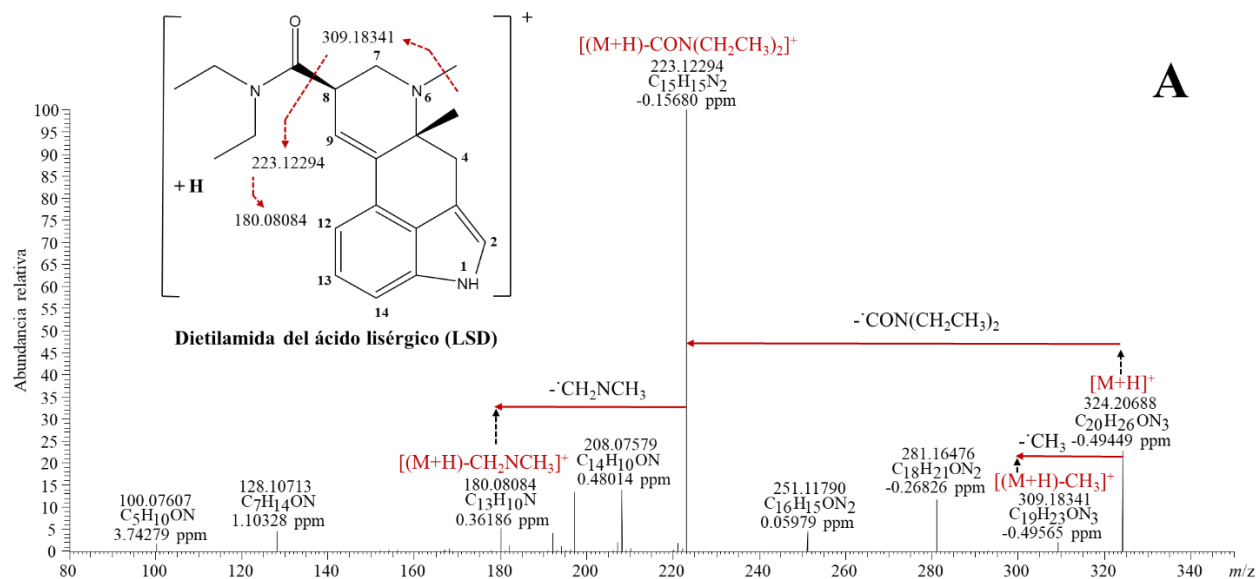
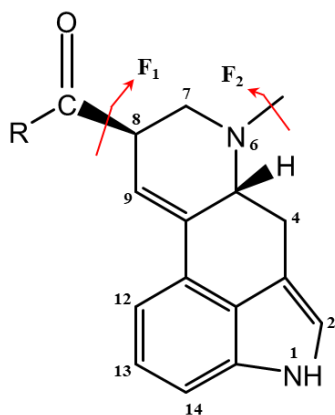


Figura 36. A. Espectro de masas obtenido en modo SIM de la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ del material de referencia certificado LSD. B. Formación de los iones fragmento característicos para el LSD.



Compuesto	R
Amida de ácido lisérgico	NH ₂
Ergometrina	NHCHCH ₃ CH ₂ OH
Metilcarbonilamida del ácido lisérgico	NHCHOHCH ₃
Lisergilalanina	NHCHCH ₃ COOH
Metilergometrina	NHCHCH ₂ CH ₃ CH ₂ OH

Compuesto	HCD, eV	Iones fragmento característicos, <i>m/z</i> (I, %)		
		[M+H] ⁺	F ₁	F ₂
Amida de ácido lisérgico	10	268,14355	223,12277 (100)	253,12010 (9)
Ergometrina	20	326,18530	223,12241 (95)	311,16190 (7)
Metilcarbonilamida del ácido lisérgico	20	312,17004	223,12244 (100)	-
Lisergilalanina	10	340,16467	223,12250 (100)	-
Metilergometrina	20	340,20139	223,12250 (100)	-

Figura 38. Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) observados en los espectros de masas de los AEs de tipo ácido lisérgico identificados en la especie *A. nervosa*.

En general, el uso de las técnicas de GC/MS y LC/MS permitieron la identificación de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles presentes en las hojas, flores y semillas de *A. nervosa*. En la **Figura 39** se muestran algunas estructuras de los metabolitos secundarios en cada órgano de la planta identificados en la presente investigación.

5. Discusión y análisis de resultados

En las plantas existen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que son biosintetizados para su adaptación a diferentes ecosistemas, interacciones con otros organismos, defensa, reproducción, entre otros. Dichas moléculas poseen una gran variedad de actividades biológicas que pueden ser aprovechadas en el área de la salud, la industria de la perfumería, industria alimentaria, *etc.* Debido a la diversidad estructural y naturaleza química de estos compuestos, siempre ha sido un objeto de estudio y desarrollo de métodos más eficientes y robustos que permitan su obtención e identificación, por otro lado, la gran biodiversidad de flora en Colombia, la convierte en un país con gran potencial para el desarrollo de una industria basada en el aprovechamiento integral de las plantas.

En la presente investigación se estudiaron los metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de las hojas y flores de plantas de *A. nervosa* cultivadas en CENIVAM. Se estudió la influencia de las técnicas de extracción y el tipo de solvente sobre los rendimientos obtenidos. Para las dos técnicas, los rendimientos más altos se obtuvieron usando etanol/agua al 50 % v/v, seguido de etanol/agua al 70 % v/v y acetona. Con el resultado obtenido, se observó que al aumentar el carácter polar en el solvente de extracción, se obtuvo un incremento en los rendimientos. El carácter polar del agua aportó en la obtención de más compuestos de interés. Cabe resaltar, que un rendimiento alto no implica tener un extracto de calidad y que existen otros factores para considerar, como la composición química y las posibles actividades biológicas que pueda poseer el extracto, además, el agua puede generar interacciones con interferencias de carácter polar que podrían afectar el rendimiento. No obstante, en este estudio se demostró que sí fue viable el uso de la concentración 50% v/v, comparado con las concentraciones 70 y 96 % v/v y acetona. Un resultado similar lo obtuvieron Mishra y col., 2015, quienes estudiaron las variables de extracción en la técnica de extracción con solvente para las hojas de la especie *A. nervosa*, usando distintos solventes. El uso de agua como solvente permitió un mayor rendimiento de extracción (7,68 %) comparado con el etanol (1,23 %) y el acetato de etilo (1,97 %). Además, los investigadores reportaron que con el agua se obtuvo el mayor contenido de flavonoides, compuestos fenólicos y la mayor actividad antioxidante.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Los rendimientos de extracción de las flores ($46 \% \pm 6$ y 14 ± 3 , MSPD y SE con etanol/agua al 50 % v/v) fueron más altos comparados con las hojas (26 ± 6 y $10,0 \pm 1$, respectivamente). Existen pocos reportes sobre *A. nervosa* en los que se investiguen sobre los parámetros que afecten el rendimiento de extracción y se comparen en función de los órganos de la planta. Por ejemplo, en el estudio realizado por Lubna y col., 2021, estudiaron la optimización de la técnica asistida con ultrasonido para la obtención de la mayor cantidad de compuestos de tipo fenólico en las flores de *A. nervosa*, el resultado mostró que el mayor rendimiento y cantidad de compuestos fenólicos se obtuvieron más altos con etanol/agua al 25% v/v, este resultado fue similar con el obtenido en la presente investigación y corrobora la idea que el uso de un solvente más polar, contribuye a la obtención de rendimientos más altos en la planta *A. nervosa*.

La técnica de extracción tiene una gran influencia sobre el rendimiento debido a la diferencia en los principios utilizados para extraer los compuestos. Para la obtención de compuestos a partir de matrices sólidas, la extracción con solvente es conocida por su eficiencia en términos de tiempos de extracción, debido a que las ondas de ultrasonido de alta frecuencia permiten agitar y romper los tejidos vegetales de la matriz y que los compuestos se transfieran al solvente, sin embargo, una desventaja de la SE es que puede realizar la extracción de compuestos no deseados o interferencias. Por otro lado, la técnica MSPD resalta por su selectividad y por requerir menos cantidades de solvente, en este caso, el soporte es dispersado con la matriz vegetal, realiza la adsorción de los compuestos sobre la superficie de este. La técnica MSPD permite obtener compuestos específicos según el tipo de soporte sólido utilizado, no obstante, pueden existir algunas implicaciones en cuanto a la preparación de la matriz sólida y el escalamiento para su uso con cantidades más grandes de muestra.

Se observó que la SE y MSPD contribuyeron a la obtención de compuestos de gran interés, como ácidos cafeoilquínicos y flavonoles, diterpenos, triterpenos, esteroides, no obstante, el uso de la MSPD mostró una ventaja debido a que se obtuvo la mayor número de compuestos en los extractos. El uso de la gel de sílice C₁₈ modificada como soporte sólido permitió la adsorción de compuestos no polares y poco polares en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*. Si bien, la sílice C₁₈ modificada es un soporte sólido específico para la obtención de compuestos apolares, también se lograron obtener compuestos de carácter polar debido a los solventes de elución utilizados.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Con respecto a la composición química de los extractos de hojas y flores de la planta *A. nervosa*, en la presente investigación se usaron la información cromatográfica junto con la información espectrométrica obtenida por GC/MS y LC/MS, como estrategia para la identificación de los diferentes metabolitos secundarios volátiles y no volátiles. El análisis por GC/MS permitió la identificación de 25 compuestos volátiles en los extractos de hojas. En los extractos MSPD obtenidos con acetona fueron más abundantes los compuestos del tipo hidrocarburos, hidrocarburos triterpénicos y diterpenos oxigenados, mientras que, en los extractos MSPD obtenidos con etanol, se observaron mayoritariamente compuestos del tipo hidrocarburos oxigenados, ácidos carboxílicos, ácidos cinámicos y diterpenos oxigenados. Los compuestos mayoritarios en los extractos MSPD de hojas obtenidos con acetona correspondieron al 13-metilheptacosano (67 %) el cual no había sido reportado anteriormente, seguido del fitol (11 %) y el acetato de lupelilo (5,7 %). En los extractos MSPD obtenidos con etanol, se encontró como compuesto mayoritario (N° 17, Tabla #) un posible tocoferol de fórmula molecular $C_{28}H_{48}O_2$, para el cual, el estudio del patrón de fragmentación (EI, 70 eV) permitió determinar que en su estructura podría contener un anillo aromático enlazado a una cadena alquílica con varias insaturaciones. Otros compuestos mayoritarios en este extracto fueron: el fitol (4,2 %), el ácido dodecanoico (7,4 %) y el ácido cinámico (7,2 %), este último, reportado por primera vez. Son pocos los estudios sobre los compuestos volátiles presentes en las hojas y flores de *A. nervosa*, además, no existen reportes sobre el uso de la técnica MSPD para la obtención de los extractos a partir de la planta.

Bharati y Bansal, 2016, reportaron una composición química similar mediante GC/MS de los extractos metanólicos de las hojas y semillas de la planta. Los investigadores identificaron un total de 16 compuestos, los compuestos mayoritarios fueron: el fitol (10,8 %) y el ácido hexadecanoico (25,5 %), otros compuestos identificados en menor proporción fueron el γ -tocoferol (0,09 %), el estigmasterol (2,17 %) y el ácido dodecanoico (0,54). En contraste, en este estudio se mostró la ventaja de usar MSPD frente a otras técnicas para la obtención de nuevos metabolitos volátiles. No obstante, varios de los metabolitos volátiles quedaron sin una asignación estructural, la elucidación clara y completa de estos metabolitos deberá ser tema de futuras investigaciones, donde se utilicen técnicas de GC/MS de alta resolución, que permitan obtener la masa exacta de cada compuesto y asignar una posible fórmula molecular.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Varios de los metabolitos volátiles identificados en la presente investigación para las hojas de *A. nervosa* habían sido reportados antes, compuestos como: fitol, β -sitosterol, ácido dodecanóico y hexadecanóico. Se logró la identificación de nuevos metabolitos volátiles que no habían sido reportados en la planta, entre estos, el indol, neofitadieno, ácidos cinámico y acetoxicinámico, 13-metilheptacosano, lupeol y otros. Dichas moléculas han sido reportados en otras plantas (Iordache y col., 2009; Prada y col., 2020) como volátiles de hojas verdes (por sus siglas en inglés, GLV), se ha mostrado que cumplen un rol importante entre la planta y su entorno, los cuales son emitidos por las plantas como respuesta frente a un daño a sus hojas, permitiendo la repelencia o atracción de varios insectos. Estos compuestos podrían cumplir las mismas funciones en las hojas de *A. nervosa*, no obstante, determinar la función principal que cumplen estos compuestos en la planta requiere de muchas investigaciones en las que se exponga la planta a un insecto y se monitoreen con ayuda de otras técnicas los compuestos emitidos durante dicha interacción. Aún así, este estudio permitirá la orientación y comparación en el futuro y servirá como base para las futuras investigaciones.

Determinar las funciones que cumplen estos compuestos en las plantas no es el único tema de interés, los compuestos volátiles identificados en las hojas de *A. nervosa*, han sido usados como precursores para la fabricación de varios fármacos y han mostrado diferentes propiedades en sistemas biológicos, actuando como antifúngicos, antioxidantes, antidiabéticos, anticancerígenos, antiinflamatorios, *etc.* El fitol, ha sido usado como precursor para la fabricación de varias vitaminas sintéticas del tipo E y K1 (Netscher, 2007), el ácido cinámico y sus derivados semisintéticos han mostrado actividades del tipo anticancerígena hacia el cancer de colon y seno, y antimicrobiana hacia la *Mycobacterium tuberculosis* (Ruwizhi y Aderibigbe, 2020). El indol ha sido ampliamente utilizado como precursor en la fabricación de derivados que han mostrado actividades antiinflamatorias, antianalgésicas, antimicrobiana, entre otras (Sharma y col., 2010). En general, en este estudio se han reportado varios compuestos volátiles que tienen una función ecológica en la interacción planta con su entorno y tienen gran potencial biológico, las hojas de *A. nervosa* son una fuente de varios compuestos volátiles que podrían ser usados en la industria farmacéutica, agropecuaria, entre otros.

En otro aspecto, en esta investigación se reportó por primera vez la composición química de los compuestos volátiles presentes en los extractos MSPD de las flores de *A. nervosa*. En los extractos,

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

fueron más abundantes los ácidos carboxílicos insaturados y los derivados de tocoferol. El compuesto N° 10 mayoritario (76,8 %) no logró ser identificado, no obstante, el espectro de masas de este compuesto fue muy similar con el que se obtuvo para el compuesto N° 17 en hojas, estos compuestos guardan estrecha similitud en su estructura y podrían ser isómeros o pertenecer a la misma familia de compuestos. Sin embargo, la identificación de estos compuestos requiere el uso de técnicas de GC/MS de alta resolución, como se mencionó anteriormente. Otros compuestos mayoritarios fueron el ácido octadeca-9, 12-dienoico (6,2 %), el ácido hexadecanoico (4,7 %) y el β -sitosterol (3,8 %). En menor proporción se encontraron el ergosterol (0,7 %), el isofucoesterol (0,8%), el 1-hexadecanol (0,4%).

No existen reportes sobre el estudio de la composición volátil de los extractos de flores de *A. nervosa*, sin embargo, existen algunos de otras plantas pertenecientes a su género. Luciardi y col., 2016, reportaron la composición volátil de extractos florales de plantas subtropicales del género *Convolvulaceae*. Los compuestos más abundantes en todas las plantas fueron de tipo sesquiterpenos, ácidos carboxílicos y alcoholes aromáticos. Los compuestos mayoritarios fueron el *trans*- β -cariofileno (25,56%), el alcohol bencílico (11,17 %) y el ácido pentadecanoico (13,52 %). El motivo por el cual, se observó una mayor presencia de compuestos del tipo sesquiterpenos podría deberse a que los investigadores, a diferencia del presente estudio, utilizaron el material vegetal fresco para la extracción, por tanto, no hubo un proceso de liofilizado o secado donde pudieran perderse varios de estos metabolitos volátiles.

Aunque existan pocos reportes sobre las flores de *A. nervosa* y su composición volátil, este estudio mostró que las flores de esta planta tienen compuestos que pueden ser de gran interés en el futuro. Muchos de los compuestos identificados y sus derivados han mostrado propiedades biológicas. Los derivados del tipo metiléster del ácido (9,12)-octadecadienoico mostraron actividad anticancerígena hacia líneas celulares de cáncer gástrico (Yu y col., 2005). Otra investigación, reportó los beneficios de los ácidos linoleicos conjugados (por sus siglas en inglés, CLA) en la salud humana (Bhattacharya y col., 2006). Se encontraron también pocas cantidades de fitoesteroides, para los cuales se ha reportado que tienen un rol importante en la permeabilidad y fluidez de la membrana celular en las plantas (Kamal y col., 2014). Por otro lado, se ha reportado el importante rol que desempeña el β -sitosterol en la salud, interfiriendo en la absorción intestinal del colesterol para disminuir sus niveles en sangre (Segura y col., 2006). Al igual que las hojas, las

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

flores tuvieron metabolitos secundarios que son de gran importancia en las plantas para su funcionamiento fisiológico y con importantes roles en la ecología, los extractos de las hojas y flores de *A. nervosa* tienen un gran potencial para ser usados como material de partida para el fraccionamiento y obtención de diferentes compuestos volátiles que pueden aprovecharse en la industria alimenticia, farmacéutica, agropecuaria, cosmética, etc.

Se reportó por primera vez un estudio preliminar de la fracción volátil del material vegetal fresco, proveniente de las flores de *A. nervosa*. El uso de la técnica HS-SPME permitió la extracción de varios compuestos presentes en la fracción volátil de la flor. Estos compuestos fueron adsorbidos en la fibra y se desorbieron en el puerto de inyección de un equipo GC-MS. Se logró la identificación de 29 compuestos en la fracción volátil de las flores de *A. nervosa*, las familias de compuestos más abundantes fueron del tipo hidrocarburos sesquiterpénicos y monoterpenos oxigenados. Los compuestos mayoritarios fueron el *trans*- β -cariofileno (46,0 %), seguido del α -copaeno (15,2 %) y el δ -cadineno (9,4 %).

De los compuestos identificados, varios pertenecen al grupo llamado volátiles de plantas inducidos por hervíboros (por sus siglas en inglés, HIPV), y se ha mostrado que tienen importancia en la polinización y repelencia o atracción de diferentes insectos y otros organismos en las plantas, con el fin de evitar la propagación de enfermedades. El *trans*- β -cariofileno mostró repelencia hacia el insecto *Diaphorina citri*, el cual funciona como vector de propagación de la bacteria causante de la enfermedad *Huanglongbing* en cultivos de plantas del género *Citrus* (Alquézar y col., 2017), también, se encontró que está implicado en la atracción de polinizadores en la planta *Arabidopsis thaliana* (Huang y col., 2012). Determinar la función que podrían cumplir estos compuestos en las flores de *A. nervosa* requiere de rigurosas investigaciones, en las cuales se realicen monitoreos *in-vivo* de la interacción de un insecto determinado con la planta y se obtengan los metabolitos emitidos durante esta interacción. No obstante, este estudio mostró una composición química preliminar, que servirá como base para futuras investigaciones, donde se estudie con más detalle el rol ecológico que cumplen estos compuestos presentes en la fracción volátil de la planta. Por otro lado, varios de los compuestos mayoritarios encontrados en la presente fracción, han mostrado diversas actividades biológicas. El *trans*- β -cariofileno previno la citotoxicidad en células gliales (Assis y col., 2014), también, mostró ser un moderador en la secreción de la insulina (Suijun y col., 2014). Además de estos, existen cientos de reportes en donde se demuestran las diversas

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

propiedades biológicas del *trans*- β -cariofileno como antiinflamatorio, antidepresivo, antitumoral, entre otras (Francomano y col., 2019). Los resultados de la presente investigación mostraron que los extractos de las flores no son los únicos con compuestos volátiles de interés, la fracción volátil de las flores contiene compuestos que son de gran interés en el ámbito medicinal, ecológico, etc.

El análisis por LC/MS en todos los extractos MSPD y SE de las hojas y flores de *A. nervosa*, reveló la presencia de varios metabolitos no volátiles. Las corrientes iónicas totales proporcionaron diversas señales correspondientes a ácidos cafeoilquínicos, flavonoles, un aminoácido y un posible estero. Los espectros de masas de alta resolución ESI⁺-HRMS-Q-(*Orbitrap*) obtenidos en modo SIM, suministraron las masas exactas de las moléculas protonadas y deprotonadas ([M+H]⁺, [M-H]⁻) y las fórmulas moleculares de cada compuesto. Se encontraron diez compuestos en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*, de los cuales dos correspondieron a ácidos cafeoilquínicos, cinco a flavonoles glicosilados, una cumarina, un aminoácido y un posible estero. El uso de las sustancias de referencias certificadas permitió confirmar la presencia de los dos ácidos, los cinco flavonoles, y la cumarina, por otro lado, el estudio de los patrones de fragmentación, la distribución isotópica y la comparación de los espectros de masas con los reportados en la literatura y las diferentes bases de datos espectrales (NIST, FOODB database, Phenolexplorer, etc.) permitieron la identificación tentativa del aminoácido y el posible estero.

Los dos ácidos cafeoilquínicos correspondieron al ácido clorogénico y el ácido 1,3-dicafeoilquínico, los espectros de masas de dichos ácidos se obtuvieron en modo de adquisición de iones negativos. Las masas exactas de las moléculas deprotonadas se obtuvieron en m/z 353,08737 para el ácido clorogénico y en m/z 515,11859 para el 1,3-dicafeoilquínico. Para estos compuestos, se observó el ion m/z 191,05524 correspondiente al ion quínico C₇H₁₁O₆⁻, el cual es característico para los ácidos cafeoilquínicos y sus derivados. Los espectros de masas de ambos compuestos coincidieron con los obtenidos para las sustancias de referencia certificadas. Esta investigación, realiza el primer reporte de ácidos cafeoilquínicos presentes en los extractos de hojas y flores de *A. nervosa*. Ya existen reportes de ácidos cafeoilquínicos en plantas de *Convolvulus hystrix* de la familia Convolvulaceae (El-Askary y col., 2006). Estos compuestos podrían cumplir funciones de defensa contra el estrés biótico y abiótico en la planta, similar a lo reportado en *Cynara cardunculus* (Pandino y col., 2022), y en *Vaccinium myrtillus* (Uleberg y col., 2012), entre otras.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

La identificación confirmatoria de los flavonoles se llevó a cabo mediante el modo de adquisición de iones positivos. Las masas exactas de las moléculas protonadas de cada flavonol fueron adquiridas junto a su fórmula molecular. En los extractos se identificaron dos grupos de flavonoles, los derivados del kaemferol, correspondientes al kaemferol-3-*O*-glucósido, kaemferol-3-*O*-rutinósido y kaemferol-3-*O*-soforósido, para los cuales se observó en común el ion fragmento $C_{15}H_{11}O_6^+$ en m/z 287.05469, correspondiente a la aglicona. El otro grupo de flavonoles fueron los derivados de la quercetina, quercetina-3-*O*-glucósido y rutina, el ion característico predominante observado en los espectros de estos dos flavonoles fue el ion m/z 303,04950 perteneciente a la aglicona. Los espectros de masas obtenidos para todos los flavonoles coincidieron con los obtenidos para cada una de las sustancias de referencia certificadas. La presencia de flavonoides en plantas de *Argyeria nervosa* ya había sido reportada por (Mann y col., 1999), también, existen investigaciones sobre flavonoides en plantas del género *Convolvulaceae* (Menemen y col., 2002). Al igual que en otras plantas, los flavonoles presentes en *A. nervosa* podrían tener funciones relacionadas con el control del crecimiento, la germinación de las semillas, y la fotosíntesis (Singh y col., 2021).

Uno de los compuestos identificados tentativamente fue el aminoácido triptófano, su espectro de masas de alta resolución obtenido en modo SIM, proporcionó la masa exacta de la molécula protonada $[M+H]^+ C_{11}H_{13}O_2N_2^+$ en m/z 205,09715. Este es el primer reporte de aminoácidos libres presentes en *A. nervosa*, en la literatura existen reportes de aminoácidos glicosilados presentes en plantas de *Ipomoea batata* pertenecientes a la familia *Convolvulaceae* (Dini y col., 2006). La presencia del triptófano en *A. nervosa* puede resultar un tema de gran interés, ya que, se ha reportado que el L-triptófano es el precursor principal en la biosíntesis de los alcaloides ergolínicos en especies de hongos del género *Claviceps* (Gerhards y col., 2014). Si bien, en las hojas y flores no se encontraron alcaloides ergolínicos, se ha reportado que los genes encargados de la producción de estos alcaloides en los hongos, podrían haber sido transferidos a plantas del género *Convolvulaceae* mediante un proceso evolutivo (Wallwey y Li., 2011). Otra importante función del triptófano en la planta *A. nervosa*, podría estar relacionada con la producción de auxinas (importantes hormonas involucradas en el crecimiento y desarrollo de las plantas), el mecanismo biosintético de estos compuestos ha sido muy bien elucidado y se ha encontrado que el precursor principal en la síntesis de las auxinas es el triptófano (Zhao, 2010). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, determinar la función que pueda cumplir un compuestos en específico

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

en la planta *A. nervosa*, requiere de investigaciones más rigurosas. Aún así, este análisis permitió reportar por primera vez el aminoácido triptófano, la presencia de este compuesto en la planta podría no ser trivial y ser un metabolito de gran importancia en el funcionamiento de *A. nervosa*.

En esta investigación, se determinó el contenido (mg de compuesto/ g de extracto) de cada uno los compuestos identificados confirmatoriamente. El mayor contenido de flavonoides, la cumarina y los ácidos cafeoilquínicos en las hojas y flores de *A. nervosa*, se obtuvo en los extractos MSPD usando la concentración de etanol al 50 %, con aproximadamente 80,8 mg/g en las hojas y 83,6 mg/g en las flores. El contenido de flavonoles y la escopoletina fue mayor en las hojas comparado con las flores, por otro lado, la mayor cantidad de ácidos cafeoilquínicos se encontró en las flores. El ácido 1,3-dicafeoilquínico fue mayoritario en todos los extractos de hojas y flores. La técnica de MSPD junto con la metodología usada mostró ser más precisa y reproducible que la técnica SE, para la obtención de compuestos fenólicos y ácidos cafeoilquínicos en la planta *A. nervosa*. Con base en lo anterior, y los rendimientos obtenidos, se concluyó que la mayor calidad de los extractos en términos de cantidad de compuestos fenólicos y ácidos cafeoilquínicos se obtuvo con la técnica MSPD, la elección de la sílice C₁₈ modificada como soporte sólido permitió la adsorción de varios metabolitos no volátiles de gran importancia, además, se observó que el uso de un solvente polar tuvo gran influencia en la obtención de un mayor contenido de compuestos, ya que, sin importar la técnica, el uso de etanol/agua al 50 % v/v mostró mayores rendimientos y contenidos.

Es importante resaltar, que los compuestos mayoritarios, especialmente el ácido clorogénico y el ácido 1,3-dicafeoilquínico, son compuestos que tienen una gran relevancia y contenido histórico, ya que, han sido ampliamente usados en el campo medicinal, debido a que poseen grandes beneficios en la salud humana y son compuestos con gran potencial antiinflamatorio y antioxidante (Magana y col., 2021; Liu y col., 2020). En esta investigación, se ha mostrado que las flores de *A. nervosa* son una fuente de ácidos cafeoilquínicos y tienen gran potencial para hacer de esta una planta promisoría, que sirva como material de partida para la obtención de estos compuestos, que posteriormente puedan ser incorporados en productos medicinales, alimenticios, cosméticos, entre muchos otros. Por otro lado, se abren las puertas a una nueva investigación, en la que se realice un estudio de la actividad antioxidante de los extractos y sus fracciones mediante diferentes técnicas donde se permita determinar con exactitud cuáles son los compuestos específicos que contribuyen a la respuesta antioxidante.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Finalmente, en esta investigación se decidió realizar un estudio por LC/MS, de la composición química en los extractos obtenidos por MSPD a partir de las semillas de la planta *A. nervosa*. Aunque existan numerosos reportes sobre la composición química de los extractos de semillas de *A. nervosa* (Chao y Marderosian, 1973; Paulke y col., 2014; Paulke y col., 2015), ningún reporte menciona el uso de la técnica MSPD para la obtención de los extractos, además, el uso de un equipo UHPLC-HRMS-ESI-Q-*Orbitrap* para la identificación, es otro aspecto nuevo por considerar. El objetivo del análisis fue determinar si la técnica MSPD y las condiciones utilizadas permitían la obtención e identificación de los alcaloides ergolínicos ya reportados en la literatura y nuevos compuestos. La estrategia usada para la identificación de los alcaloides ergolínicos fue el estudio del patrón de fragmentación y los iones fragmentos característicos de la sustancia de referencia certificada dietilamida del ácido lisérgico (LSD), un alcaloide ergolínic bastante conocido por sus efectos psicotrópicos.

El análisis por LC/MS, permitió la identificación de nueve alcaloides ergolínicos, de los cuales, siete correspondieron a derivados del ácido lisérgico y dos a derivados de clavina. Por otro lado, se logró la identificación confirmatoria del ácido clorogénico y el ácido 1,3-dicafeoilquínico, compuestos ya reportados en extractos de hojas y flores. Si bien, no se logró la identificación de un nuevo alcaloide, se reportaron dos nuevos ácidos cafeoilquínicos y un posible esteroide en los extractos de semillas de la planta. Por otro lado, en esta investigación se mostró la ventaja de usar UHPLC-HRMS-ESI-Q-*Orbitrap* en el estudio de los iones-producto de los alcaloides ergolínicos, ya que, permitió sugerir una nueva estructura para el ión m/z 208,07510, un ion fundamental y presente en todos los espectros de masas de los alcaloides ergolínicos. Este estudio, sugiere que la formación de dicho ion podría deberse a la ruptura tipo retro-Diels-Alder, lo que conduciría a la formación de un dieno conjugado más estable, de todos modos, la determinación exacta de la estructura de este fragmento requiere técnicas de marcaje isotópico, como deuteración, que permitirán esclarecer con exactitud la ruta de fragmentación que adoptan dichos alcaloides.

En general, este estudio reportó valiosa información con respecto a la composición química volátil y no volátil en la planta *A. nervosa*. Se evidenció que la técnica de MSPD es versátil en la obtención de una gran variedad de compuestos, que van desde terpenos, ácidos cinámicos, esteroides, ácidos carboxílicos, flavonoles, ácidos cafeoilquínicos, etc. Las plantas de *Argyrea nervosa* que crecen

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

en CENIVAM mostraron ser un fuente de compuestos de gran valor comercial y que son de gran uso en la industria farmacéutica, alimenticia, agropecuaria, cosmética, entre muchas otras.

6. Conclusiones

Se estudiaron los metabolitos volátiles y no volátiles presentes en los extractos de hojas y flores de plantas de *Argyrea nervosa* cultivadas en CENIVAM. Los extractos se obtuvieron usando las técnicas MSPD y SE. Los extractos obtenidos tuvieron variaciones sobre los rendimientos y la composición química de acuerdo con la polaridad y tipo de solvente. Se observó que al aumentar el carácter polar de los solventes de extracción se obtuvieron rendimientos más altos, tanto en MSPD como SE. En general, se obtuvieron rendimientos más altos en la técnica MSPD que en SE, los rendimientos en las flores ($46 \% \pm 6$ para la técnica de MSPD y 14 ± 3 para SE con etanol/agua al 50 % v/v) fueron más altos comparados con las hojas (26 ± 6 , MSPD y 10 ± 1 , SE, etanol/ 50 % v/v). La técnica de MSPD mostró ser más precisa, reproducible y permitió obtener la mayor diversidad de compuestos volátiles y no volátiles.

El análisis de los metabolitos volátiles en todos los extractos se realizó mediante GC/MS, bajo los criterios de comparación de los índices de retención lineales obtenidos experimentalmente con los disponibles en la literatura y la comparación de los espectros de masas obtenidos por (EI, 70 eV) con los disponibles en las diferentes bases de datos espectrales. En los extractos MSPD de hojas, se identificaron un total de 26 compuestos volátiles, los compuestos mayoritarios en los extractos obtenidos con acetona fueron el 13-metilheptacosano (67 %) y el fitol (11 %), en los extractos obtenidos con etanol 50 % v/v, se encontraron como compuestos mayoritarios un posible tocoferol de fórmula $C_{28}H_{48}O_2$ (33,5 %) y el ácido dodecanoico (7,4 %). En los extractos MSPD de flores obtenidos con acetona, se identificaron 13 compuestos volátiles, los compuestos mayoritarios fueron un posible tocoferol (76,8 %) y el ácido octadeca-9, 12-dienoico (6,2 %). Algunos de los compuestos identificados en los extractos de hojas y flores habían sido reportados como volátiles de hojas verdes en otras plantas (GLV). El estudio preliminar por GC/MS de la composición química en la fracción volátil obtenida por HS-SPME de las flores frescas de *A. nervosa*, reveló la presencia de 26 metabolitos secundarios. En la fracción volátil fueron más abundantes los hidrocarburos sesquiterpénicos (86 %) y los monoterpenos oxigenados (5,5 %). Los compuestos mayoritarios fueron el *trans*- β -cariofileno (42 %) y el α -copaeno (13,8 %). La mayoría de los compuestos identificados en la fracción volátil habían sido reportados como volátiles de plantas inducidos por herbívoros (HIPV).

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Los metabolitos secundarios no volátiles presentes en los extractos MSPD y SE de hojas y flores de *A. nervosa*, fueron identificados mediante UHPLC-ESI⁺-*Q-Orbitrap*. En los extractos, se identificaron un total de diez compuestos no volátiles. La comparación de la información cromatográfica y espectrométrica obtenida de las sustancias de referencias certificadas, permitió la identificación confirmatoria de cinco flavonoles glicosilados, dos ácidos cafeoilquínicos y una cumarina. Por otro lado, el estudio del patrón de fragmentación obtenido a diferentes voltajes en la HCD (10, 20, 30, 40 eV) y el análisis de la distribución isotópica, permitió la identificación tentativa del triptófano, principal precursor en la síntesis de los alcaloides ergolínicos. Los ácidos cafeoilquínicos más representativos en los extractos de hojas y flores, fueron el ácido clorogénico y el ácido 1,3-dicafeoilquínico, por otro lado, los flavonoles más representativos fueron el kaemferol-3-*O*-rutinósido y la rutina. El mayor contenido de flavonoles y ácidos cafeoilquínicos se extrajo por MSPD, utilizando una concentración del 50 % v/v de etanol (80,8 mg/g en las hojas y 83,6 mg/g en las flores). El ácido 1,3-dicafeoilquínico fue mayoritario en todos los extractos MSPD y SE de las hojas y flores de *A. nervosa*. Las flores fueron los órganos con mayor contenido de ácidos cafeoilquínicos, por otro lado, el contenido de flavonoides fue mayor en las hojas.

El uso de la técnica MSPD en la obtención de los extractos a partir de las semillas de *A. nervosa*, permitió extraer nueve alcaloides ergolínicos, dos ácidos cafeoilquínicos y un esteroles, los cuales fueron identificados por UHPLC-ESI⁺-*Q-Orbitrap*. Los nueve alcaloides (dos del tipo clavina y siete derivados del ácido lisérgico) fueron identificados usando la información cromatográfica y espectrométrica obtenida para la sustancia de referencia LSD. Algunos de los alcaloides más representativos fueron: la amida del ácido lisérgico LSA, la ergometrina, el ácido lisérgico, entre otros. Se reportó por primera vez, de forma confirmatoria, la presencia del ácido clorogénico y el ácido 1,3-dicafeoilquínico en los extractos de semillas de *A. nervosa*.

7. Referencias

Ali, S., Hamed, M., El-Rigal, N., Shabana, M. & Kassem, M. (2011). Chemical constituents of *Argyreia speciosa*. Convolvulaceae and its role against hyperglycemia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8, 76-84.

Alzurfi, S., Abdali, S., Alattaby, A., Rabeea, M. & Al-Haidarey, M. (2021). Identification of lipid Compounds in the plant of *Ceratophyllum demersum* using two different solvents. *Materials Today: Proceedings*, 12, 127.

Alqu zar, B., Volpe, H., Magnani, R., Miranda, M., Santos, M., Wulff, N., Bento, J., Parra, J., Bouwmeester, H. & Peña, L. (2017). β -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacters*. *Scientific Reports*, 7, 5639.

Assis, L., Straliootto, M., Engel, D., Hort, M., Dutra, R. & Bem, F. (2014). Caryophyllene protects the c6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the nrf2 pathway. *Neuroscience*, 279, 220-231.

Austin, D. F. (1997). Article of the *Convolvulaceae* (Mornin Glory Family). Published on WWW at <http://ag.arizona.edu/herbarium/personnel/daustin/convolv.html>. Fecha de consulta: septiembre 19 de 2021.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Bartosinska, E., Buszewska, M. & Siluk, D. (2016). GC–MS and LC–MS approaches for determination of tocopherols and tocotrienols in biological and food matrices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.051>.

Barker S. A. (2007). Matrix Solid-Phase Dispersion MSPD. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 70, (2). 151-162.

Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J. & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Jornal of Nutritional and Biochemistry*, 17, 789-810.

Bharati, A. & Bansal, Y. (2016). *In vitro*: Propagation and GC-MS study of *ArgyreA nervosa* Burm. F: An endangered ornamental and medicinal plant. *TACL*, 6, 385-398.

Cseke, L. J.; Kirakosyan, A. (2006). Natural products from plants. Ed. Taylor and Francis. Second Edition. Michigan, EE.UU.

Chatterjee, A.; Pakrashi, K. (2003). The treatise on Indian medicinal plants. *National institute of Science Communication and Information Resoruces*, pp 144-6.

Deore, S.; Mahule, A.; Baviskar, B.; Rai, P. & Kide, A. (2020). Pharmacognostic and antifungal investigations of *Argyreia nervosa*. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 1877-1889.

Dias, M., Pinto, D. & Silva, A. (2021). Plant falvonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26, 5377.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Dini, I., Tenore, G., Trimarco, E. & Dini, A. (2006). Seven new aminoacyl sugars in *Ipomoea batatas*. *J. Agric. Food Chem*, 54, 6089-6093.

El-Askary, I., Hussein, D., Shehab, G. & Sleem, A. (2006). Bioactive caffeoylquinic acid derivatives from *convolvulus hystrix vahl*. *Bull. Fac. Pharm*, 44, 3.

Firm, R.D.; Jones, C.G. (2003). Natural products – A simple model to explain chemical diversity. *Natural Products Report*. 20. 382-391.

Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Caremella, J., Mallamaci, R., Saturnino, C., Iacopetta, D. & Sinicropi, M. (2019). β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. *Appl. Sci*, 9, 5420.

Galani, V.; Patel, N. B. (2010). *Argyrea speciosa sweet*: A comprehensive review. *Pharmacognosy Review*, 4(8): 172-178.

Gerhards, N.; Neubauer, L.; Tudzynski, P. & Li. S. (2014). Biosynthetic pathway of ergot alkaloids. *Toxins*. 6, 3281-3296.

Geetharani, K.; Vijayakumar, R.; Shanmugasundaram, M. & Selvaraj, J. (2020). Free radical scavenging potential of *Argyrea nervosa* leaf extract: An *in vitro* analysis. *Drug Invention Today*, 13(2), 247-251.

Guo, L., Yao, H., Wang, X., Ye, P., Xu, Z. & Wu, H. (2022). Natural products of medicinal plants: biosynthesis and bioengineering in post-genomic era. *Horticulture Research*, 9: uhac 223.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Halpern, J. (2004). Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Alcohol and Drug Research Center*, 102 (2), 131-138.

Huang, M., Moreiras, A., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gerhenson, J. & Tholl, D. (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New phytologist*, 193-197, 1008.

Iordache, A., Culea, M. & Cozar, O. (2009). Characterization of some plant extracts by GC-MS. *Nuclear instruments and methods in physics research B*, 267, 338-342.

Jakubczyk, D.; Cheng, J. & O'Connor, S. (2014). Biosynthesis of ergot alkaloids. *Natural Products*. 31, 1328.

Janakiraman, U.; Velusamy, T.; Thenmozhi, A.; Monhamed Essa, M. & Khan, M. (2016). Ayurveda and Parkinson's Disease. *Food and Parkinson's disease*. 193-218.

Joseph, A.; Mathew, S.; Skaria, B. P. & Sheeja, E. (2011). Medicinal uses and biological activities of *Argyrea speciosa* sweet (Hawaiian baby woodrose) – An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2 (3), 286-291.7

Kalvakunta, G., Gaddman, S., Kotakadi, V., Palithya, S., Penchalaneni, J. & Challagundla, V. (2021). *Argyrea nervosa* (Samudra pala) leaf extract mediated silver nanoparticles and evaluation of their antioxidant, antibacterial activity, in vitro anticancer and apoptotic studies in KB oral cancer cell lines. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 49:1, 634-649.

Kamal, G. & Gunatilaka, L. (2014). Plant Steroids: Occurrence, Biological Significance, and Their Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006-2014.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Karre, V.; Heinrich, T. (2014). Ingestion of Hawaiian baby woodrose seeds to obtain a legal high. *Psychomatics*, 55 (5), 517–518.

Kashima, Y. & Miyazawa, M. (2014). Chemical composition and aroma evaluations of essential oils from *Evolvulus alsinoides*. *Chemistry and Biodiversity*, 11, 396-407.

Levin, D. (1976). The chemicals defenses of the plants to pathogens and herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7, 121-159.

Liu, W., Li, J., Zhang, X., Sun, X., Jiang, X. & Zhao, Q. (2020). Current Advances in Naturally Occurring Caffeoylquinic Acids: Structure, Bioactivity, and Synthesis. *J. Agric. Food Chem*, 68, 10489–10516.

Lone, R., Shuab, R. & Kamili, A. (2020). Plant phenolics in sustainable agriculture. *Springer Nature Singapore Ltd. Gateway*, Singapore. 91-117.

Lo Faro, A., Triana, A. & Giorgetti, R. (2020). Biomedical analysis of new psychoactive substances of natural origin. *Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179, 112954.

López, R., Gonzalez, R. & Freninch, G. (2019). Ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. *Trends in Analytical Chemistry*, 118, 170-181.

Lubna, A., Shukla, I., Rao, C., Jawaid, T., Kamal, M., Alkhamees, A., Alaseem, A. & Alasanad, S. Optimization of ultrasonic extraction of major phenolic components from flowers of *Argyrea speciosa* via response surface method. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 55, 6.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Luciardi, M., Hernández, M., Muruaga, N., Bardón, A., Arena M. & Cartagena, E. (2016). Volatiles from Subtropical Convolvulaceae That Interfere with Bacterial Cell-to-Cell Communication as Potential Antipathogenic Drugs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 8.

Magana, A., Kamimura, N., Soumyanath, A., Stevens, J. & Maier, C. (2021). Caffeoylquinic acids: chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. *The Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.15390.

Mann, P.; Tofern, B.; Kaloga, M. & Eich, E. (1999). Flavonoid sulfates from the *Convolvulacea*. *Phytochemistry*, 50 (2), 267-271.

Marriott, P., Shellie, R. & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936, 1-22.

Menemen, Y., Williams, C. & Jury, S. (2002). Flavonoid patterns in *Convolvulus* species from Morocco. *Pak. J. Bot*, 34 (3), 291-295.

Mishra, A.; Saklani, S.; Chandra, S. & Tiwari, P. (2015). Total phenolics, flavonoids and antioxidant evaluation in the leaves of *Argyrea nervosa* Burm. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 32 (2), 6.

Mithofer, A., Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 63, 431-450.

Netscher, T. (2007). Synthesis of vitamin E. *Vitamins and Hormones*, 76. 156-193.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Pandino, G., Bonomo, A., Scavo, A., Mauromicale, G. & Lombardo, S. (2022). Caffeoylquinic acids and flavones profile in *Cynara cardunculus* L. seedlings under controlled conditions as affected by light and water-supply treatments. *Scientia Horticulturae*, 302, 111180.

Patel, N., Chudasama, P. & Raval, M. (2022). Beneficial effects of roots of *Argyreia nervosa* on testosterone biosynthesis in testis and spermatogenesis in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 289, 115025.

Paulke, A.; Kremer, A.; Wunder, C. & Toennes, S. (2014). Analysis of lysergic acid amide in human serum and urine after ingestion of *Argyreia nervosa* seeds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 531-538.

Paulke, A.; Kremer, A. (2015). Studies on the alkaloid composition of the Hawaiian baby woodrose *Argyreia nervosa*, a common *legal high*. *Forensic Science International*, 249, 281-193.

Perry, R.; Graham, R. & Noll, R. (2008). Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27, 661-699.

Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants usage. *Pharmacological Reviews*. 6. 1-5.

Pineros, J. (1988). Extractos naturales de plantas medicinales; concepto, preparación, usos. *Fondo Editorial Universitario*. Bogotá, Colombia. 27-34.

Prada, F., Stashenko, E. & Martínez, J. (2020). Variación en el contenido de alcaloides pirroizilidínicos y compuestos orgánicos volátiles en *Crotalaria spp.* (Fabaceae) inducidos por

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

hervíboría con *Utheisa ornatix* (Lepidóptera). (Tesis de Doctorado). Universidad Industrial de Santander, Colombia.

Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex; specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochem*, 269, 337-341.

Poole, F (2020). Solid-Phase Extraction. *Handbook in Separations Science*. Elsevier. Detroit, USA. 673-698.

Rasool, F., Sharma, D., Anand, P., Magani, S. & Tantravahi, S. (2021). Evaluation of the anticancer properties of geranyl isovalerate, an active ingredient of *Argyreia nervosa* extracts in colorectal cancer cells. *Front. Pharmacol*, 12, 698375.

Ratsh, C. (2002). The encyclopedia of psicoactive plants; Etnopharmacology and its applications. *Park Street Press*. Hamburg, Germany, 23.

Restrepo, J., Colmenares, J., Mora, E. & Sánchez, A. (2013). Extraction, chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper tuberculum* using supercritical carbon dioxide. *Revista de ciencias*, 17, 45-56.

Roy, A. (2017). A review of the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *Journal of Plant Biotechnology*, 3, 2.

Ruwizhi, N. & Aderibigbe, A. (2020). Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. *International of Molecules Science*, 21, 5712.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Rydberg, J.; Cox, M. & Musikas, C. (2004). Solvent extraction: principles and practice. Ed. Taylor and Francis. Second edition. Capítulo 10, New York, E.E.U.U.

Saibaba, S., Kumar, M. & Pandiyan, S. (2016). Mini review of LC/MS techniques. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 4, 2381-2395.

Sahu, R. & Chakravarti, N. (1971). Constituents of the leaves of *Argyreia nervosa*. *Phytochemistry*, 10, 1949.

Salam, U.; Ullah, S.; Tang, Z.-H.; Elateeq, A.A.; Khan, Y.; Khan, J.; Khan, A. & Ali, S. (2023). Plant Metabolomics: An Overview of the Role of Primary and Secondary Metabolites against Different Environmental Stress Factors. *Life*, 13, 706. <https://doi.org/10.3390/life13030706>.

Segura, R., Javierre, C., Lizarraga, A. & Ros, E. (2006). Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals. *British Journal of Nutrition*, 96, 36-44.

Shreedhara, C.; Aswatha, H.; Zanwar, S. & Falguni, G. (2009). Free radical scavenging activity of aqueous root extract of *Argyreia nervosa* (Burm.f.) (*Convolvulaceae*). *Journal of Natural Remedies*, 9 (2), 216-223.

Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A. & Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 10-19.

Singh, B. & Sharma, R. (2015). Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation, and clinical applications. *Biotech*, 5, 129-151.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Suijin, W., Zhen, Y., Ying, G. & Yanfang, W. (2014). A role for trans-caryophyllene in the moderation of insulin secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444, 451-454.

Tongnuanchan, P. & Benjakul, S. (2014). Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservations. *Journal of Food Science*, 79, 7.

Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Trost, K., Junttila, O., Haggman, H. & Martinussen, I. (2012). Effects of temperatura and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of *Bilberry* (*Vaccinium myrtillus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Veiga, M., Costa, E., Silva, S. & Pinto, M. (2020). Impacto f plants extracts upon human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 5, 873-886.

Vivaldo, G., Masi, E., Taiti, C., Caldarelli, G. & Mancuso, S. (2017). The network of volatile organic compounds. *Scientific Reports*, 7, 11050.

Vyas, N. & Raval, M. (2020). Aphrodisiac and spermatogenic potencial of alkaloidal fraction of *Argyreia nervosa* (Burm. f.) Bojer roots in male rates. *Nat. Prod. Resch.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1869231>.

Wagh, V.; Jain, A. (2020). Etnopharmacological survey of plants used by the Bhil and Bhilala ethnic community in dermatological disorders in Western Madhya Pradesh, India. *Journal of Herbal Medicine*, 19, 100-234.

Wallwey, C. & Li, S. (2010). Ergot alkaloids: Structure biodiversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep*, 28 (3), 496-510.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS EXTRACTOS DE *A. nervosa*

Yu, F., Lian, X., Guo, H., McGuire, M., Li, R., Wang, R. & Yu, Fa. (2005). Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitory effects on the human SGC-7901 cells. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 8(3), 528-535.

Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol*, 61, 49-64.

8. Apéndice

Tabla 9A.

Figuras de mérito obtenidas por UHPLC/ESI⁺-*Q*-Orbitrap-HRMS de las sustancias de referencia.

Compuesto	Fórmula	Ecuación	Rango dinámico lineal, mg/g	R ²	mg/g	
					LOD	LOQ
Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	y = 4E+06x + 36306	0,06 - 0,80	0,9986	0,03	0,11
Escopoletina	C ₁₀ H ₈ O ₄	Y = 5E+08x + 7E+06	0,01 - 0,40	0,9911	0,07	0,22
Ácido 1,3- dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	y = 1E+07x - 6E+06	1,0 - 9,0	0,9978	0,03	0,11
Kaemferol-3- <i>O</i> -β-soforósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	y = 7E+06x + 73025	0,06 - 0,80	0,9969	0,05	0,16
Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	y = 2E+06x - 404563	1,0 - 10,0	0,9928	0,07	0,24
Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	y = 8E+06x - 171736	0,01 - 0,80	0,9938	0,07	0,23
Kaemferol-3- <i>O</i> -rutinósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	y = 2E+06x - 79464	1,0 - 10,0	0,9923	0,08	0,26
Kaemferol-3-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	y = 5E+06x + 2E+06	1,03 - 10,3	0,9869	0,05	0,12