

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS TÓXICOS
ALCALOIDALES EN PLANTAS DEL GENERO *CROTALARIA* Y ALIMENTO
CONTAMINADO PARA AVES**

ALBA TERESA ALVAREZ MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS TÓXICOS
ALCALOIDALES EN PLANTAS DEL GENERO *CROTALARIA* Y ALIMENTO
CONTAMINADO PARA AVES**

ALBA TERESA ALVAREZ MARTÍNEZ

Tesis de grado para optar el título de
Magíster en Química

Directora
ELENA E. STASHENKO, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA, CIBIMOL
BUCARAMANGA
2004**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1 ESTADO DEL ARTE	5
1.1 ALCALOIDES	8
1.2 TOXINAS ALCALOIDALES	12
1.2.1 Alcaloides pirrolizidínicos	15
1.2.1.1 Principales fuentes de PA's	16
1.2.1.2 Utilización de las Leguminosas en la agricultura	17
1.2.2 Mecanismo de acción tóxica de los alcaloides pirrolizidínicos	19
1.2.3 Biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos	24
1.2.4 Mecanismo de defensa de las plantas.	26
1.3 ANÁLISIS DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS	28
1.3.1 Técnicas de preparación de muestras	28
1.3.1.1 Extracción asistida por ultrasonido	28
1.3.1.2 Extracción Soxhlet	29
1.3.1.3 Extracción asistida por radiación de microondas	30
1.3.1.4 Extracción en fase sólida	31
1.3.2 Métodos de análisis de alcaloides pirrolizidínicos	33
1.3.2.1 Análisis cualitativo de alcaloides pirrolizidínicos por cromatografía de gases de alta resolución	36
1.3.2.2 Determinación estructural de alcaloides pirrolizidínicos	37
1.3.2.2.1 Análisis por GC-MS	41
1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	42
1.4.1 Análisis de varianza	44
2 PARTE EXPERIMENTAL	46

2.1	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	46
2.1.1	Análisis cromatográfico	46
2.1.2	Implementación del método de extracción	47
2.1.2.1	Extracción Soxhlet de alcaloides	48
2.1.2.1.1	Limpieza de los extractos de semilla.	48
2.1.2.2	Extracción de alcaloides asistida por ultrasonido	49
2.1.2.3	Extracción de alcaloides asistida por radiación de microondas	50
2.1.2.4	Extracción de alcaloides con modificación del pH de la matriz.	50
2.2	CULTIVO EXPERIMENTAL	50
2.2.1	Análisis de suelos	51
2.2.2	Especies de plantas utilizadas	51
2.2.3	Condiciones de estrés aplicadas sobre material vegetal	52
2.2.3.1	Estrés por herbivoría natural	52
2.2.3.2	Estrés por herbivoría simulada	54
2.2.3.3	Estrés hídrico	54
2.2.3.4	Estrés por herbicidas	54
2.2.3.5	Blanco de estrés	55
2.2.4	Análisis de material vegetal	55
2.2.4.1	Análisis preliminares en follaje, sin estrés ambiental.	55
2.2.4.1.1	Limpieza de los extractos de follaje.	56
2.2.4.2	Análisis de follaje en condiciones de estrés ambiental.	57
2.3	CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	57
3	RESULTADOS	59
3.1	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.	59
3.1.1	Determinación de factores de respuesta.	59

3.2	IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS	62
3.3	IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PA'S	72
3.3.1	Análisis preliminar en semillas	72
3.3.2	Análisis de varianza	73
3.3.3	Selección del método de extracción de PA'S	78
3.4	CARACTERIZACIÓN DE FOLLAJE	82
3.4.1	Análisis preliminares	83
3.4.2	Condiciones de estrés ambiental	85
3.4	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EN <i>CROTALARIAS</i>	93
3.5.1	Alcaloide en semillas de <i>Crotalaria retusa</i>	93
3.5.2	Alcaloides en semillas de <i>Crotalaria nitens</i>	101
3.6	ANÁLISIS DE ALIMENTO CONTAMINADO	104
4.	CONCLUSIONES	106
5.	RECOMENDACIONES	108
	BIBLIOGRAFÍA	109
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	120
	ANEXO 1	130
	ANEXO 2	136

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de alcaloides por grupos.	10
Tabla 2. Señales químicas por RMN ¹³ C para alcaloides pirrolizidínicos monoéster de bases necinas insaturadas [75].	39
Tabla 3. Señales químicas por RMN ¹³ C para alcaloides pirrolizidínicos diéster macrocíclicos de bases necinas insaturadas [75].	40
Tabla 4. ANOVA de dos factores con más de una lectura por muestra.	45
Tabla 5. Repetibilidad de la medición de los factores de respuesta para el estándar interno, difenilamina, por GC/FID.	60
Tabla 6. Repetibilidad de las áreas cromatográficas a diferentes concentraciones de difenilamina (ISTD), por GC/FID	61
Tabla 7. Alcaloides aislados en <i>Crotalaria nitidula</i> .	63
Tabla 8. Niveles superior e inferior para los factores pH y tiempo	73
Tabla 9. Valor de “y” (concentración) para las réplicas del PA (Ik 2397), según método de extracción.	74
Tabla 10. Valores promedio de concentración relativa al istd para el PA con Ik 2397.	75
Tabla 11. Efecto de cada factor y de las interacciones entre dos factores.	75
Tabla 12. Valor del parámetro F.	76
Tabla 13. Caracterización de suelos.	83
Tabla 14. Tiempos de siembra y recolección de follaje en análisis preliminares.	84
Tabla 15. Tiempos de siembra y recolección de follaje en condiciones de estrés ambiental.	86

Tabla 16. Variación del contenido de PA's en Crotalarias, bajo diversas condiciones de estrés .	87
Tabla 17. Señales químicas por RMN 13C para el alcaloide aislado en semillas de <i>Crotalaria retusa</i> .	98
Tabla 18. Desplazamientos químicos (d, ppm) de los hidrógenos en el espectro de RMN 1H del alcaloide aislado en semillas de <i>Crotalaria retusa</i> .	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de compuestos aromáticos producidos por plantas.	6
Figura 2. Alcaloides derivados de aminoácidos de ornitrina y lisina.	9
Figura 3. Estructuras del ácido lisérgico y compuestos relacionados.	9
Figura 4. Estructuras de algunas drogas alcaloides.	11
Figura 5. Estructura química de la Saxitoxina PSP.	12
Figura 6. Estructuras químicas de micotoxinas producidas por el hongo <i>Aspergillus flavus</i> .	13
Figura 7. Estructuras de algunos alcaloides pirrolizidínicos detectados en especies de <i>Crotalaria</i> .	18
Figura 8. Estructuras base de alcaloides pirrolizidínicos.	20
Figura 9. Equipo de extracción Soxhlet.	30
Figura 10. Equipo de extracción en fase sólida (SPE).	32
Figura 11. Detección de PA's con el reactivo de Erlich (reacción de color).	34
Figura 12. Fórmulas estructurales de fragmentos de ácidos necínicos.	38
Figura 13. Dos especies de <i>Crotalaria</i> A. C. <i>retusa</i> y B. C. <i>nitidula</i> .	52
Figura 14 Polilla 1, <i>Utetheisa ornatrix</i> Hubner.	53
Figura 15. Polilla 2. Familia Notodontidae.	53
Figura 16. Estructura química de la Atrazina.	55
Figura 17. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico con Ik 1499.	64
Figura 18. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con Ik 1499.	64
Figura 19. Espectro de masas del alcaloide pirolizidínico con Ik 2096.	65
Figura 20. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con Ik 2096.	66
Figura 21. Espectro de masas del alcaloide pirolizidínico con Ik 2195.	67

Figura 22. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con Ik 2195 experimental.	67
Figura 23. Espectro de masas del alcaloide pirolizidínico con Ik 2397.	68
Figura 24. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con Ik 2397 experimental.	69
Figura 25. Espectro de masas del alcaloide pirolizidínico con Ik 2497.	69
Figura 26. Espectro de masas del alcaloide pirolizidínico con Ik 2499.	70
Figura 27. Posibles estructuras de alcaloides pirrolizidínicos con Ik experimentales 2497 y 2499.	70
Figura 28. Variación del contenido de PA (Ik 2397), según método de extracción.	77
Figura 29. Eficiencia de la extracción de alcaloides pirrolizidínicos para diferentes tiempos de extracción, sin modificación de pH.	79
Figura 30. Eficiencia de la extracción de alcaloides pirrolizidínicos para diferentes tiempos de extracción y pH.	80
Figura 31. Eficiencia de la extracción de alcaloides pirrolizidínicos.	81
Figura 32. Cromatogramas típicos para evaluar el contenido del alcaloide en 40 g de follaje de <i>Crotalaria retusa</i> , a 150 días de crecimiento, inyección splitless. FID.	85
Figura 33. Cromatogramas típicos de extractos de follaje de <i>Crotalaria retusa</i> , obtenidos por extracción asistida por radiación de microondas. MSD. A. Estrés por herbivoría. B. Estrés hídrico.	89
Figura 34. Cromatogramas típicos de extractos de follaje de <i>Crotalaria nitidula</i> , obtenidos por extracción asistida por radiación de microondas. MSD. A. Estrés por herbivoría; B. Estrés hídrico.	89
Figura 35. Variación en la composición de PA's en <i>Crotalaria retusa</i> según condiciones de estrés.	91
Figura 36. Estructura química de la loliolida.	92
Figura 37. Espectro de masas de la monocrotalina.	94

Figura 38. Estructura química de la monocrotalina.	94
Figura 39. Posibles rutas de fragmentación de la monocrotalina.	95
Figura 40. Espectro infrarrojo del alcaloide (monocrotalina) aislado en semillas de <i>Crotalaria retusa</i> .	96
Figura 41. Posibles estructuras por DRX para el alcaloide denominado monocrotalina.	100
Figura 42. Espectro infrarrojo de alcaloide "A", aislado de <i>Crotalaria nitens</i> .	102
Figura 43. Espectro infrarrojo de alcaloide "B", aislado de <i>Crotalaria nitens</i> .	102
Figura 44. Espectros de masas de los alcaloides "A" y "B", aislados de <i>Crotalaria nitens</i> .	103
Figura 45. Cromatogramas típicos de extractos en alimento para aves. A. Alimento contaminado con semillas de <i>Crotalaria retusa</i> ; B. B. Alimento para aves (Blanco). FID.	104

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Ruptura enzimática de glicoalcaloides.	15
Esquema 2. Biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos.	25
Esquema 3. Interacciones existentes entre factores medioambientales.	27
Esquema 4. Proceso de partición en fase sólida.	33
Esquema 5. Formación de iones característicos en el espectro de masas de la retronecina.	65
Esquema 6. Ruta de fragmentación de la licopsamina.	68
Esquema 7. Esquema de fragmentación de alcaloides pirrolizidínicos diéster macrocíclicos de base necina saturada.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
CI-MS	Chemical ionization (Ionización Química)
DSP	Diarrheic shellfish poisoning (Veneno disenterico de crustáceos)
FAB	Fast atom bombarding (Bombardeo con átomos acelerados)
FID	Flame Ionization Detector (Detector de ionización en llama)
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRGC	High Resolution Gas Chromatography (Cromatografía de gases de alta resolución)
HRGC/MSD	High Resolution Gas Chromatography/Mass Selective Detector (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un detector selectivo de masas)
I _k	Índice de retención de Kováts
IR	Espectroscopía infrarroja
TF-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
ICN	Instituto de Ciencias Naturales de Colombia
ISTD	Estándar interno
LD ₅₀	Dosis letal media
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono-13
NPK	Nitrógeno, fósforo y potasio
M _w	Microondas
PSP	Paralytical shellfish poisoning (Veneno paralizante de crustáceos)

PA's	Pyrrolizidine Alkaloids (Alcaloides pirrolizidínicos)
R _f	Factor de respuesta
SFE	Supercritical Fluid Extraction (Extracción con fluido supercrítico)
SNC	Sistema nervioso central
Sx	Soxhlet
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina)
t _R	Tiempo de retención
t _{RR}	Tiempo de retención relativo
Us	Ultrasonido

TÍTULO: AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS TÓXICOS ALCALOIDALES EN PLANTAS DEL GÉNERO DE *CROTALARIA* Y ALIMENTO CONTAMINADO PARA AVES *AUTOR: ALBA TERESA ALVAREZ MARTÍNEZ

PALABRAS CLAVES : Alkaloides pirrolizidínicos, *Crotalaria*, extracción asistida por radiación de microondas (MW), orugas, estrés ambiental.

Las *Crotalias* son leguminosas ampliamente utilizadas en técnicas de rotación de cultivos por su habilidad de fijar nitrógeno en el suelo, retardando procesos de erosión de los mismos. La contaminación de granos y alimentos para animales especialmente aves, con semillas de *Crotalaria* que contienen alcaloides pirrolizidínicos, ha sido un tema de especial atención en las últimas décadas, tanto por su importancia económica así como por los problemas de hepatotoxicidad y neumotoxicidad que generan.

Es conocido que estos alcaloides juegan un rol en las funciones ecoquímicas en plantas de las especies de *Senecio* y *Crotalaria*; la interacción más aceptada comprende la relación planta-insecto herbívoro, el cual ha desarrollado mecanismos de detoxificación a estos metabolitos secundarios. La síntesis de estos alcaloides por parte de las plantas considera otras formas de estrés ambiental. implicaciones que se relacionan con la supervivencia de la planta.

El objetivo de este trabajo fue establecer la variación en los contenidos de alcaloides pirrolizidínicos en dos especies de *Crotalaria*, sujetas a diferentes condiciones de estrés ambiental. Se hicieron extracciones del material vegetal y de semillas, asistidas por radiación de microondas (metanol, 5 min.). Los tipos de estrés incluyeron, estrés por herbivoría, herbivoría simulada e hídrico. En los extractos se identificaron varios compuestos derivados de la retronecina, que constituye la estructura base de los alcaloides pirrolizidínicos. El estrés por herbivoría se llevó a cabo con orugas de las familias *Artiidae* y *Notodontidae*, en su último periodo larval (instar) observándose mayor numero de alcaloides comparado con los otros tipos de estrés.

* Tesis de grado

** Facultad de ciencias,
Escuela de Química
Maestría en química
Directora: Elena E. Stashenko, Química Ph.D.

TITLE: ISOLATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF ALKALOID TOXIC PRINCIPLES IN PLANTS OF THE GENERA OF *CROTALARIA* AND CONTAMINATED FOWL FOOD

AUTOR: ALBA TERESA ALVAREZ MARTÍNEZ

KEY WORDS: Pyrrolizidine alkaloids, *Crotalaria*, extraction attended by microwaves radiation (MW), caterpillars, environmental stress.

The *Crotalaria*s are leguminous widely used in rotation technical cultivation using their ability to fix nitrogen in soils which detains erosion processes. The grain and food contamination for animals especially for fowl, with seeds of *Crotalaria* that contain pyrrolizidine alkaloids, it has been a topic of special attention in the last decades, as by its economic importance as by the hepatotoxic and neumotoxic problems that it generates.

It is known that these alkaloids play a role in the ecochemist functions in plants of the specie of *Senecio* and *Crotalaria*, the most accepted interaction understands the relationship plant–herbivorous insect, which has developed mechanisms of detoxificación to these secondary metabolits. The synthesis of these alkaloids from those plants considers other forms of environmental stress, implications that are related to the survival of the plant.

The aim of this work was to establish the variation in the contents of pyrrolizidine alkaloids in two types of *Crotalaria*, they were subjected to different conditions of environmental stress. They were made extractions of the solid material and seeds, attended by microwave radiation (methanol, 5 min). The types of stress included were, herbivory, simulated herbivory and hidric stress. In the extracts were identified several compounds derived from the retronecin, that constitutes the structure base of the pyrrolizidine alkaloids. The herbivory stress was carried out with caterpillars of the Artiidae and Notodontoidae families, in its last larvar period (instar), it was observed greater number of alkaloids extracted, compared to the others types of stress.

** Sciences Faculty,
Chemistry's School
Magister chemistry
Director: Elena E. Stashenko, Chemist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de mejorar las formas tradicionales de cultivo, el hombre ha incorporado en los suelos diversos productos químicos, algunos de ellos nocivos para la salud humana; tales rutinas logran mayores niveles de productividad del alimento con la pérdida del valor cultivable de los suelos. Sin embargo, en las últimas décadas esta práctica ha sido reemplazada con técnicas de rotación de cultivos, con la incorporación sucesiva de plantas fijadoras de nitrógeno, habitualmente con Leguminosas, incluidas las del género *Crotalaria*.

Sin embargo, esta práctica agrícola puede provocar la contaminación de granos y alimentos preparados a base de sorgo, con semillas de *Crotalaria*, las cuales en último término se incluyen en la dieta de los animales, especialmente aves. La ingestión de los alcaloides pirrolizidínicos presentes tanto en la planta como en las semillas de *Crotalaria*, puede disminuir el ritmo de crecimiento de los animales y causar su intoxicación, originando grandes pérdidas económicas a pequeños y grandes avicultores.

El consumo de alimentos, que contienen alcaloides pirrolizidínicos, origina lesiones tales como necrosis hemorrágica irreversible, cirrosis hepática, daño pulmonar, alteraciones carcinogénicas y teratogénicas [1-4]. Las alteraciones teratogénicas, desempeñan un papel muy importante en las enfermedades de los animales por herencia, pueden causar defectos esqueléticos y dérmicos, los cuales hacen al animal más susceptible a

enfermedades por agentes patógenos. Estudios previos establecen concentraciones de alcaloides pirrolizidínicos a niveles de hasta un 5 % en peso seco de semilla [5].

La toxicidad de alcaloides pirrolizidínicos ha sido atribuida a la formación de pirroles reactivos a partir de ésteres de 1,2 dihidropirrolizidinas [6,7]. Las dosis letales son del orden de $LD_{50} = 75$ mg del tóxico (monocrotalina)/kg de peso corporal, determinadas mediante experimentos con ratas [8], lo que clasifica a esta sustancia como altamente tóxica (Clasificación II EPA), estableciendo que el 50 % de los animales expuestos a ésta dosis, mueren.

La contaminación con alcaloides pirrolizidínicos, también puede ocurrir en productos alimenticios de consumo humano, e.g la miel. Sin embargo, los mayores registros que se han documentado se establecen por consumo del té de plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos, algunos de ellos solubles en agua [9-11].

El control de calidad de los alimentos, es un tema de especial atención para la Comunidad Andina de Naciones (como se estableció en el Protocolo de Bioseguridad, mayo 1999) debido a la restricción en la comercialización internacional de productos alimenticios eventualmente contaminados con metales pesados, pesticidas, impurezas botánicas y otros productos tóxicos, en la que se incluyen los alcaloides pirrolizidínicos [12,13].

Esta situación no puede desligarse de las implicaciones económicas que conlleva, puesto que para el caso colombiano, el volumen de producción de alimentos como el sorgo es comparable al de países como Venezuela, del orden de 222 Mil. ton/año (datos promedio de 2002), lo que equivale a US\$ 25'530.000 para la producción nacional de sorgo, teniendo en cuenta un

precio promedio de referencia de 115 US\$/ton, establecido por el sistema andino de franjas de precios [14,15].

La problemática del control en la calidad de los productos agrícolas y alimenticios, se centra en la carencia de normas o especificaciones técnicas para la extracción y cuantificación de alcaloides pirrolizidínicos, debido a las dificultades técnicas y analíticas por la presencia de sustancias interferentes, dentro de las cuales se incluyen proteínas, grasas, flavonoides y clorofilas, etc. El contenido proteico y de grasas en muestras de alimento, no permiten procesos eficientes de extracción del alcaloide con solventes polares, debido a la solubilidad de algunas proteínas, las cuales tienden a aglomerarse impidiendo concentrar el analito para su posterior detección; así mismo, las grasas pueden interferir cuando se tienen alcaloides lipofílicos, con estructuras susceptibles de sufrir hidrólisis en procesos de transesterificación. Adicionalmente, los procedimientos tradicionales de extracción, emplean periodos largos de tiempo y grandes cantidades de muestra.

En el presente trabajo, se realizó la identificación y cuantificación de alcaloides pirrolizidínicos, presentes en semilla y follaje de dos (2) especies de *Crotalaria*, una de las cuales fue detectada en cultivos de sorgo colombiano.

Se establecieron los niveles del alcaloide en la planta, en diferentes condiciones de estrés ambiental, mediante la implementación de una metodología rápida, sensible y segura para la extracción y detección de estas sustancias tóxicas.

Para la extracción de los alcaloides en semilla y follaje se emplearon diferentes técnicas de aislamiento, tales como extracción Soxhlet, extracción asistida por ultrasonido y/o por radiación de microondas, implementandose ésta última para el análisis de alcaloides pirrolizidínicos (PA's). El estudio de la composición e identificación de los alcaloides pirrolizidínicos, se realizó por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) con detectores de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD).

Inicialmente, se realizó la identificación tentativa de los alcaloides pirrolizidínicos con base en sus índices de retención de Kováts y la cuantificación se llevó a cabo por el método de estandarización interna; detectándose por GC/MS la presencia de 6 alcaloides en semilla de *Crotalaria nitidula* y 8 en follaje de *Crotalaria retusa*, con la utilización de la técnica de extracción asistida por radiación de microondas.

Resultados parciales de la presente investigación, fueron presentados en el IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, COLACRO IX y en el 3^{er}. Congreso Colombiano de Cromatografía celebrados en Cartagena de Indias, Colombia, en febrero de 2002. Así mismo, se participó con el trabajo "The use of pulsed splitless injection for trace detection of toxic pyrrolizidine alkaloids in food", en el 24th International Symposium on Chromatography, realizado en Leipzig, Alemania, en septiembre de 2002.

1 ESTADO DEL ARTE

Las plantas poseen una gran capacidad para producir sustancias altamente complejas. Algunas de éstas son productos de su metabolismo primario, necesarias para llevar a cabo funciones normales de nutrición. Sin embargo, las plantas se han especializado en la producción de otro tipo de compuestos necesarios para su supervivencia y reproducción, los cuales, se han establecido como subproductos del metabolismo secundario.

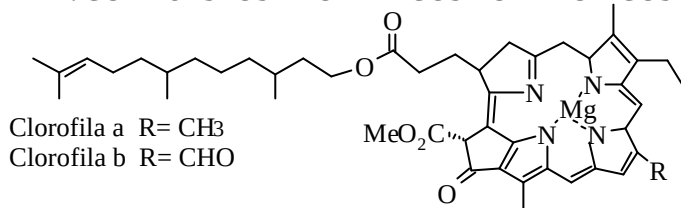
Durante el proceso evolutivo, las plantas desarrollaron un complejo mecanismo de interacción mutua adecuado para su proceso de reproducción, entre los organismos vivos alrededor de la misma (e.g. los insectos); sin embargo, existen organismos perjudiciales que pueden alterar su ritmo de crecimiento, con lo cual se activan procesos encaminados a la elaboración de sustancias, algunas tóxicas para el ser humano por ingestión, pero de utilidad para la planta como mecanismo de defensa.

Dentro del conjunto de sustancias producidas por las plantas, se pueden enumerar [16]:

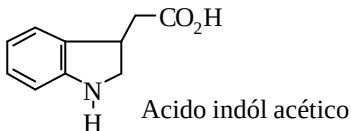
- Lípidos: A. Hidrocarburos saturados e insaturados; B. Hidrocarburos funcionales e.g. alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos grasos; C. Hidrocarburos terpénicos e.g. hemiterpenos, C_5 , monoterpenos, C_{10} ; sesquiterpenos, C_{15} ; diterpenos, C_{20} ; triterpenos, C_{30} ; tetraterpenos, C_{40} .
- Compuestos aromáticos: A. Fenólicos e.g. taninos y flavonoides (**Figura 1**); B. compuestos no fenólicos, e.g. clorofila y auxinas
- Carbohidratos, aminos, proteínas, ácidos nucleicos y alcaloides

Figura 1. Estructuras de compuestos aromáticos producidos por plantas.

A. COMPUESTOS AROMÁTICOS NO FENÓLICOS

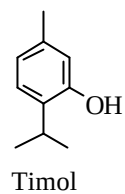
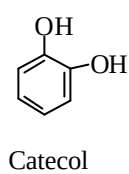
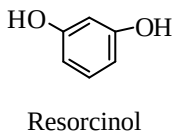
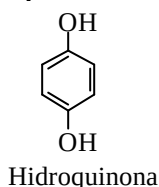


Auxina

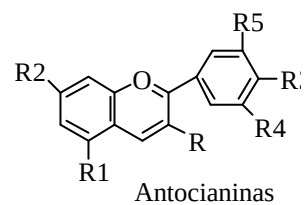
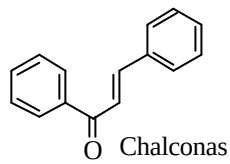
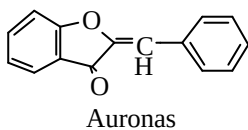
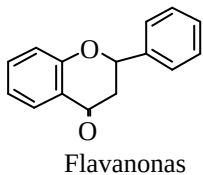
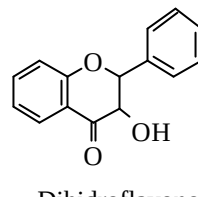
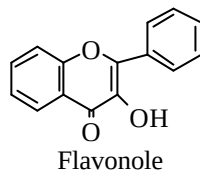
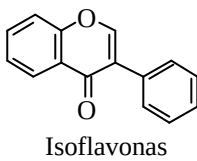
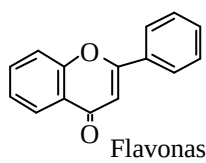


B. COMPUESTOS AROMÁTICOS FENÓLICOS

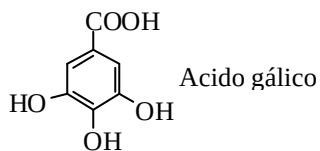
Simples



Flavonoides



Taninos



Los compuestos fenólicos, terpenos y las toxinas nitrogenadas (glucosinolatos y alcaloides) se consideran como parte del proceso del metabolismo secundario. En este sentido se definen los compuestos secundarios, como sustancias ecológicamente eficaces de valía para la planta en relaciones de mutualismo, competencia y protección [17]; dentro del grupo de compuestos con mayor atención para su estudio se hallan los alcaloides.

En los sistemas vegetales, cerca del 40% de la totalidad de familias de plantas contienen al menos una especie que produce alcaloides; la mayor incidencia de dichas sustancias se presenta en las familias de las Leguminosas, Solanáceas y las Compuestas.

Algunos alcaloides son considerados toxinas (sustancias químicas con efectos potencialmente tóxicos sobre humanos, como resultado de su ocurrencia natural en los alimentos y el medio ambiente). Tal es el caso de los alcaloides del tipo pirrolizidinas, los cuales poseen una marcada acción hepatotóxica sobre mamíferos, por ingestión de sus extractos acuosos (e.g. *Senecio formosus*) y/o consumo de alimentos procesados contaminados con alcaloides de plantas del género de las *Crotalarías* [10,11].

Las sustancias tóxicas, en general penetran al organismo por dos grandes vías. La primera es la vía pulmonar, que tiene un papel primordial en el caso de tóxicos que pueden presentarse en la atmósfera. La otra vía es la digestiva, la cual es la más común, dado que la mayoría de los tóxicos se encuentran en el sentido más amplio del término, en diferentes concentraciones en los alimentos tanto de origen animal, como vegetal y en el agua. A pesar de que esta vía de penetración de las sustancias tóxicas es en general, menos eficaz que la pulmonar, no por ello es menos importante,

considerando la gran posibilidad de difusión de los compuestos tóxicos en la alimentación humana y animal.

El origen de las toxinas en alimentos puede ser por plantas, que contienen sustancias tóxicas, bacterias, algas, hongos y animales. Los tipos de toxinas presentes en alimentos son en su mayoría de tipo alcaloidal; las principales toxinas comprenden: glucosinolatos, ficotoxinas (en comida de mar), micotoxinas, estrógenos (esteroides), compuestos alergénicos, toxinas bacteriales, y alcaloides pirrolizidínicos, entre otros [1].

1.1 ALCALOIDES

Los alcaloides son moléculas cíclicas consideradas como la más diversa clase de metabolitos secundarios derivados de moléculas de aminoácidos, de los cuales se conocen alrededor de 5000 compuestos.

Los diferentes tipos estructurales de alcaloides que se encuentran, se resumen en:

- Derivados de aminoácidos aromáticos de fenil alanina y tirosina;
- Derivados de los aminoácidos de ornitina y lisina (
- **Figura 2**);
- Derivados del ácido lisérgico (**Figura 3**).

La clasificación de los alcaloides está basada en una mezcla de criterios químicos y botánicos con la cual, éstos también pueden agruparse de acuerdo con la familia de plantas de la que provienen, como se describe en la **Tabla 1**.

La clasificación según estructura química se lleva a cabo sobre las pirrolidinas, piridinas y alcaloides indólicos [18].

Figura 2. Alcaloides derivados de aminoácidos de ornitrina y lisina.

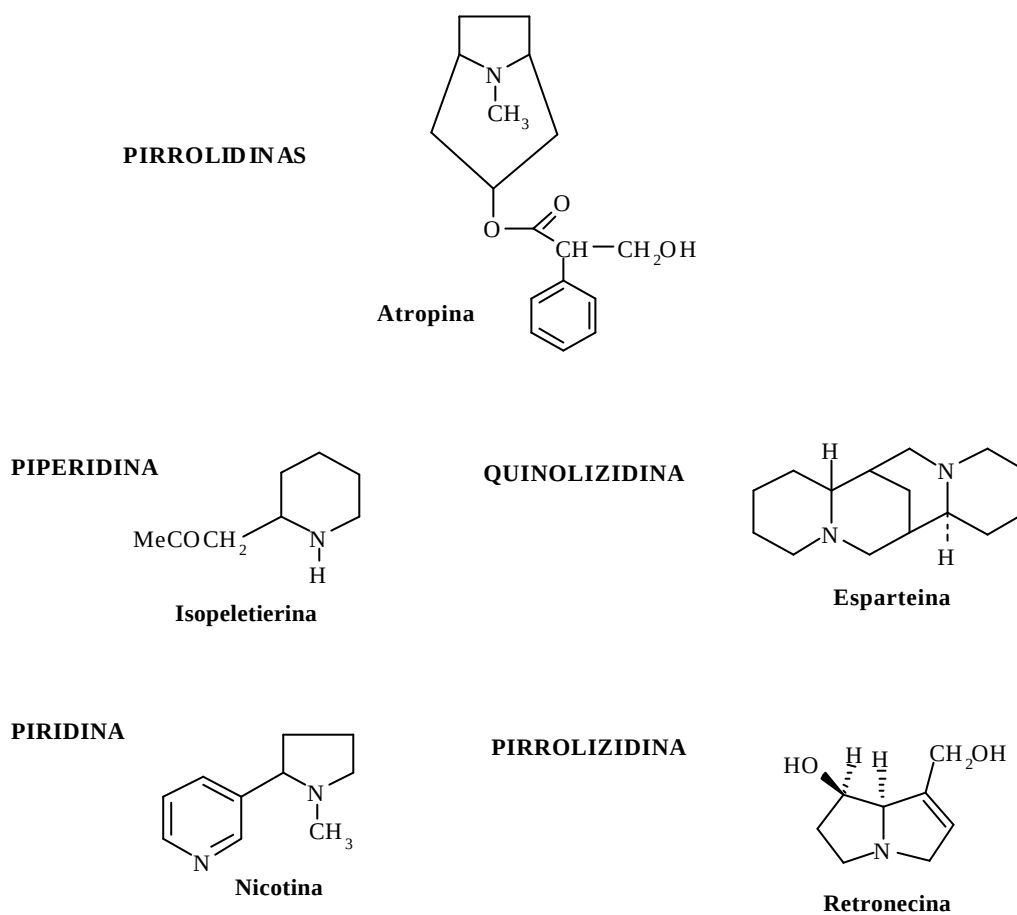
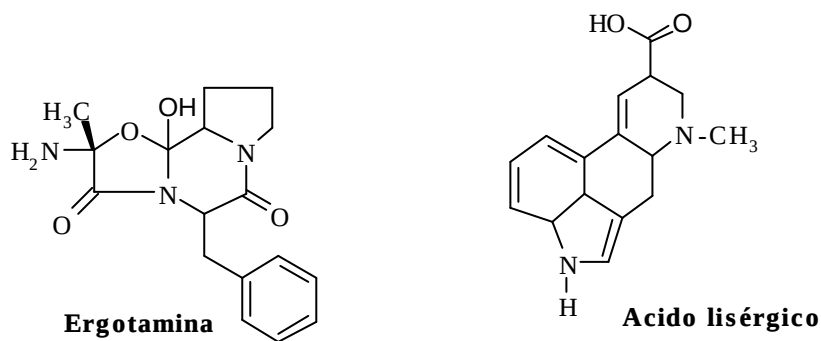


Figura 3. Estructuras del ácido lisérgico y compuestos relacionados.



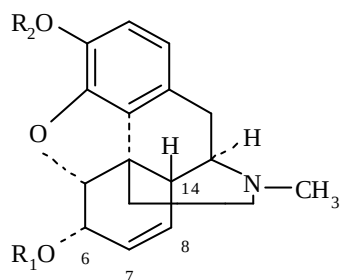
La acción fisiológica de los alcaloides es muy variada; pueden producir dilatación de la pupila ocular (atropina), marcada acción estimulante sobre el sistema nervioso central (SNC) e.g. cocaína, vasodilatación e.g. papaverina, acción expectorante e.g. emetina, acción simultánea depresora y estimulante e.g. morfina, acción diurética y estimulante del SNC e.g. cafeína, teobromina, teofilina (**Figura 4**) [19].

Tabla 1. Clasificación de alcaloides por grupos.

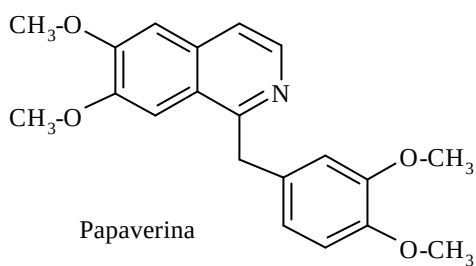
Grupo de alcaloide	Ejemplo	Grupo de alcaloide	Ejemplo
Del opio ^a	morfina, apomorfina, tebaína, codeína, dihidrocodeína, papaverina	fedra	efedrina, clorhidrato de pseudoefedrina, trifolidina
Tropano	atropina belladona homotropina, benzotropina,	Fisostigmina	salicilato de fisostigmina neostigmina (metil sulfato)
Xantina ^c	cafeína, teobromina, teofilina	Chinchona ^a	quinina estricnina quinacrina
Ipecacuana ^a	cefaleína fenólica, emetina	Rauvolfia	reserpina
Ergot ^b	colchicina, ergotamina	Otros Alcaloides	aconitina, pilocarpina, niquetamida cocaína

^a Alcaloides quinólicos e isoquinólicos ^b Alcaloides indólicos ^c Alcaloides purínicos [19,21]

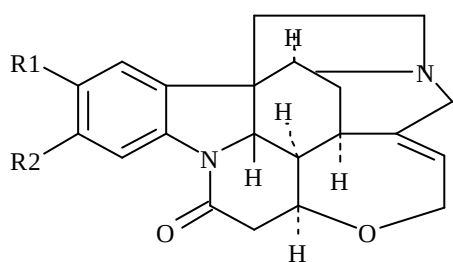
Figura 4. Estructuras de algunas drogas alcaloides.



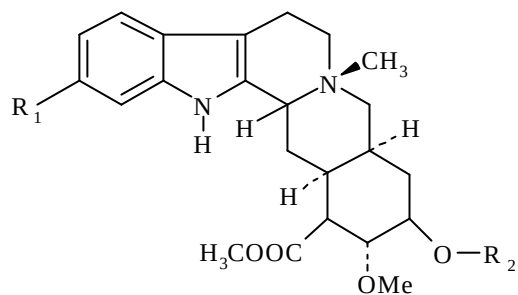
Morfina : $R_1=R_2 = H$
 Codeina: $R_1= H, R_2= CH_3$



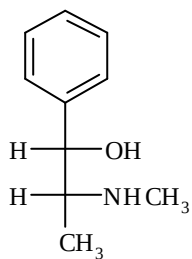
Papaverina



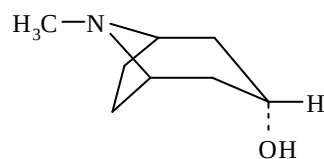
Estricnina : $R_1 = R_2 = H$



Reserpina: $R_1= O-CH_3$
 $R_2= 3,4,5\text{-trimetoxibenzoilo}$



D- Efedrina



Atropina

Compuestos tales como el opio y la cocaína, fueron utilizados en sus inicios para el alivio de dolores intensos por lesiones físicas; sin embargo, muchos

de los compuestos mencionados, por su uso continuado crean hábito y/o deterioro físico y mental [20].

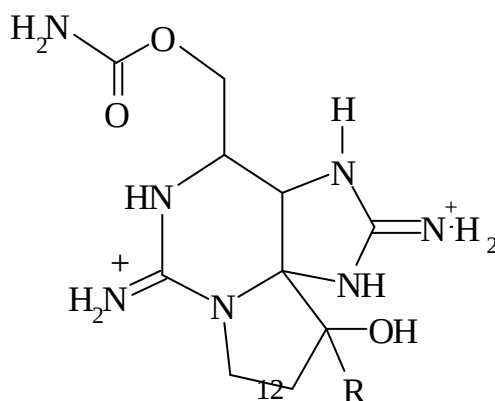
1.2 TOXINAS ALCALOIDALES

Los alcaloides existen en anfibios, organismos marinos y microorganismos; los ejemplos más representativos son:

- La neurotoxina existente en la piel de una especie de rana venenosa Colombiana (*Dendrobates lehmanni*); sustancia utilizada por el animal como mecanismo de defensa.
- La tetrodotoxina (ficotoxina) presente en el sistema reproductor de un tipo de pez globo japonés y en otros anfibios suramericanos.

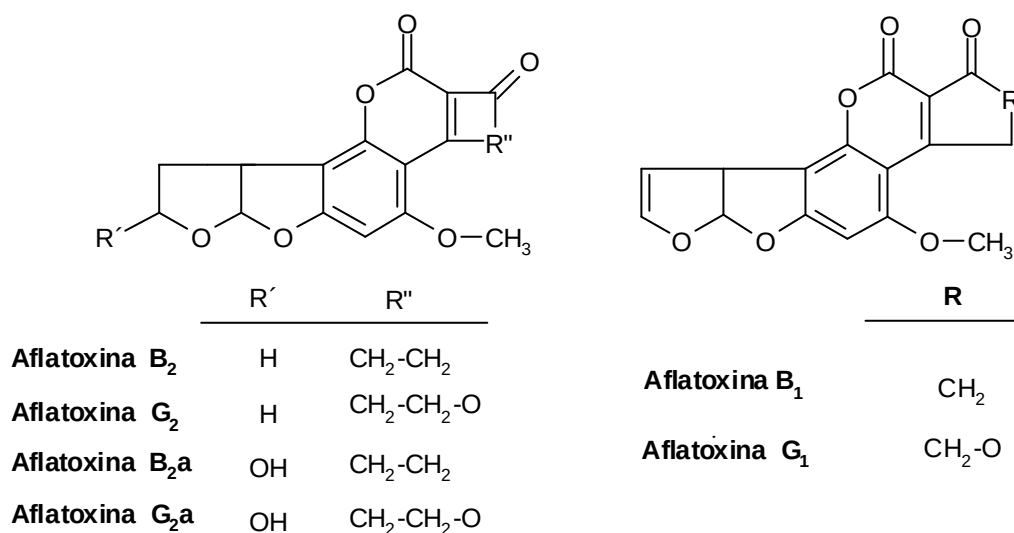
Dentro de las ficotoxinas más importantes se encuentran la PSP (Paralytical shellfish poisoning) y la DSP (Diarrheic shellfish poisoning). Existen cerca de veinte PSP's, las cuales son todas solubles en agua y cuya estructura base es una tetrahidro purina sustituida. Las toxinas más poderosas son las saxitoxinas (**Figura 5**) y las tetradoxinas [1].

Figura 5. Estructura química de la Saxitoxina PSP.



Por otra parte, los alcaloides en plantas se pueden producir por la presencia de hongos toxigénicos, originando la infección de la planta y produciendo micotoxinas (**Figura 6**), cuyas especies más representativas pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Alternaria* y *Aspergillus*. El ataque de los hongos puede darse en cereales después de la cosecha, durante el transporte o almacenamiento si las condiciones ambientales para su producción son favorables (temperaturas entre 12 a 41 °C, humedad relativa del 70 a 80 % y humedad sobre los granos del 15 %).

Figura 6. Estructuras químicas de micotoxinas producidas por el hongo *Aspergillus flavus*.



Las micotoxinas, son toxinas de acción carcinogénica en seres humanos y animales, son proteínas con diversos compuestos de alta actividad farmacológica. Las micotoxinas pueden ser de carácter exógeno o endógeno,

según el lugar de su producción en el hongo. De este tipo de alcaloides se conoce su marcada acción neurotóxica, siendo éstos responsables de los problemas de vasoconstricción o adelgazamiento de vasos sanguíneos, lo que conduce a la muerte de tejidos por disminución en la irrigación sanguínea (ergotismo) [22, 23].

Según registros históricos, una alta tasa de mortalidad ocurrida en la Edad Media, se asoció con el consumo de pan de centeno contaminado; el hongo responsable fue el *Claviceps purpurea* (Ergot) [1, 24].

Los glicoalcaloides o glucosinolatos, son otro tipo de metabolitos secundarios presentes en plantas que contienen glicósidos. Los glicósidos son un grupo de sustancias unidas a azúcares, las cuales mediante hidrólisis, conducen a la formación de aldehídos, cetonas y cianuros orgánicos (glicósidos cianogénicos).

La función principal de los glicoalcaloides es servir como mecanismo químico de defensa de la planta ante ciertos depredadores, tales como pestes de insectos, con efectos inhibitorios a la acción de los hongos.

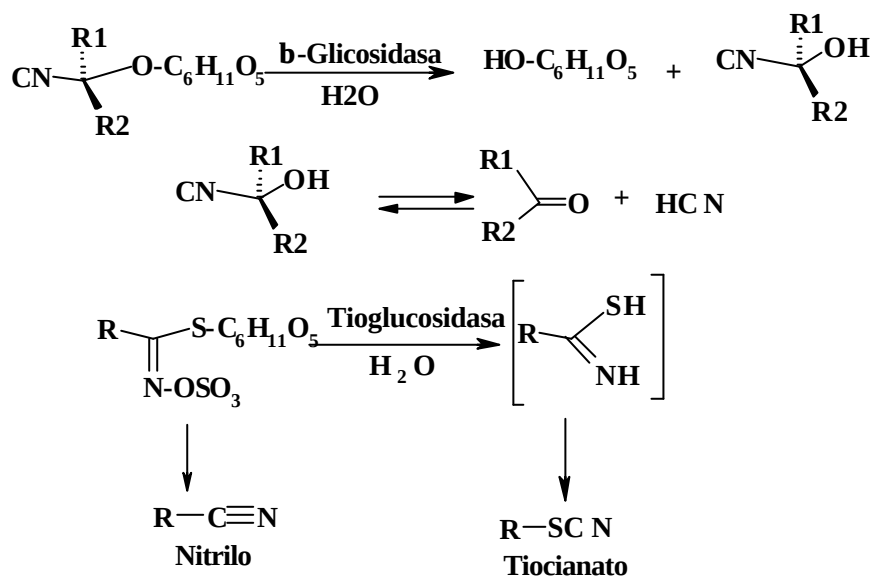
Las plantas que poseen glucosinolatos con glicósidos que contienen azufre, pertenecen a la familia de las Brassicaceas, por ejemplo las semillas de mostaza (*B. juncea*, y *B. nigra*), en vegetales como repollo, brócoli y coliflor; glicósidos cianogénicos en plantas de la familia Solanácea como el tomate, la papa y en especies del género *Sorghum* [25].

Plantas como el sorgo, son utilizadas como recurso forrajero del suelo; dichas plantas son la principal dieta de animales como los rumiantes y constituyen la principal causa de intoxicación en estos animales. La cantidad

de ácido cianhídrico que puede ser ingerida por animales (no lactantes) de 500 kg es de 500 ppm, lo que equivale al consumo de 2 kg de materia seca de sorgo; a su vez, en rumiantes en lactación, el nivel de tolerancia es de 1630 mg HCN/kg materia seca [26].

Existen cerca de 100 tipos de glucosinolatos, los cuales exhiben propiedades anticarcinogénicas. Sin embargo, los efectos tóxicos se deben principalmente a que conducen para el caso de los glicósidos cianogénicos (por ruptura de la molécula en presencia de β -glucosidasa produciendo ácido cianhídrico (**Esquema 1**), a la atrofia del nervio óptico, complicaciones en el sistema nervioso central, parálisis muscular y al cese de los procesos de respiración celular; anemia debida a los glicósidos pirimidínicos, etc. [22].

Esquema 1. Ruptura enzimática de glicoalcaloides.



1.2.1 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Los alcaloides pirrolizidínicos (PA's) pertenecen al segundo tipo estructural, son el grupo de alcaloides simples más venenosos; Se estima en 8000 especies el número de plantas que contienen PA's, las cuales a su vez corresponden al 3 % del total de plantas que florecen.

1.2.1.1 Principales fuentes de PA's

Las familias de plantas más ampliamente estudiadas, corresponden a las Boraginaceas, Compuestas y las Leguminosas; dentro de las Leguminosas, tan solo las del genero *Crotalaria* contienen alcaloides pirrolizidínicos; en las Boragináceas ocurren en todos los géneros (200 especies en el genero *Heliotropium*) y en las Compuestas se han hallado en cerca de 160 especies con alcaloides tóxicos [27]. En ésta última familia de plantas (género *Astearaceas*), se encuentran alcaloides pirrolizidínicos principalmente en plantas del género *Senecio* (*S. formosus*, *S. vulgaris*, *S. callosus* y *S. bracteatus*) las cuales son ampliamente utilizadas en remedios herbales para infusión de sus hojas; provocando intoxicación por ingestión [28, 29].

Estudios previos de los niveles de alcaloides en *Symphytum officinale* (Comfrey) en diferentes estados de crecimiento de la planta, establecen mayores contenidos de alcaloides en las partes aéreas (follaje) durante la floración y en las raíces al final de la formación del fruto [30].

Existen cerca de 500 especies de *Crotalaria*s, en todo el mundo; son especies herbáceas pequeñas a medianas en tamaño, con hojas lisas, crecimiento erguido, vaina redondeada, flores amarillas, amarillo-café, azul o púrpuras;

conocidas vulgarmente como "Cascabel", "Sonaja", "Campanita" e "Hierba de sapo", entre otros, debido a que sus semillas maduras son sueltas dentro de la vaina [31].

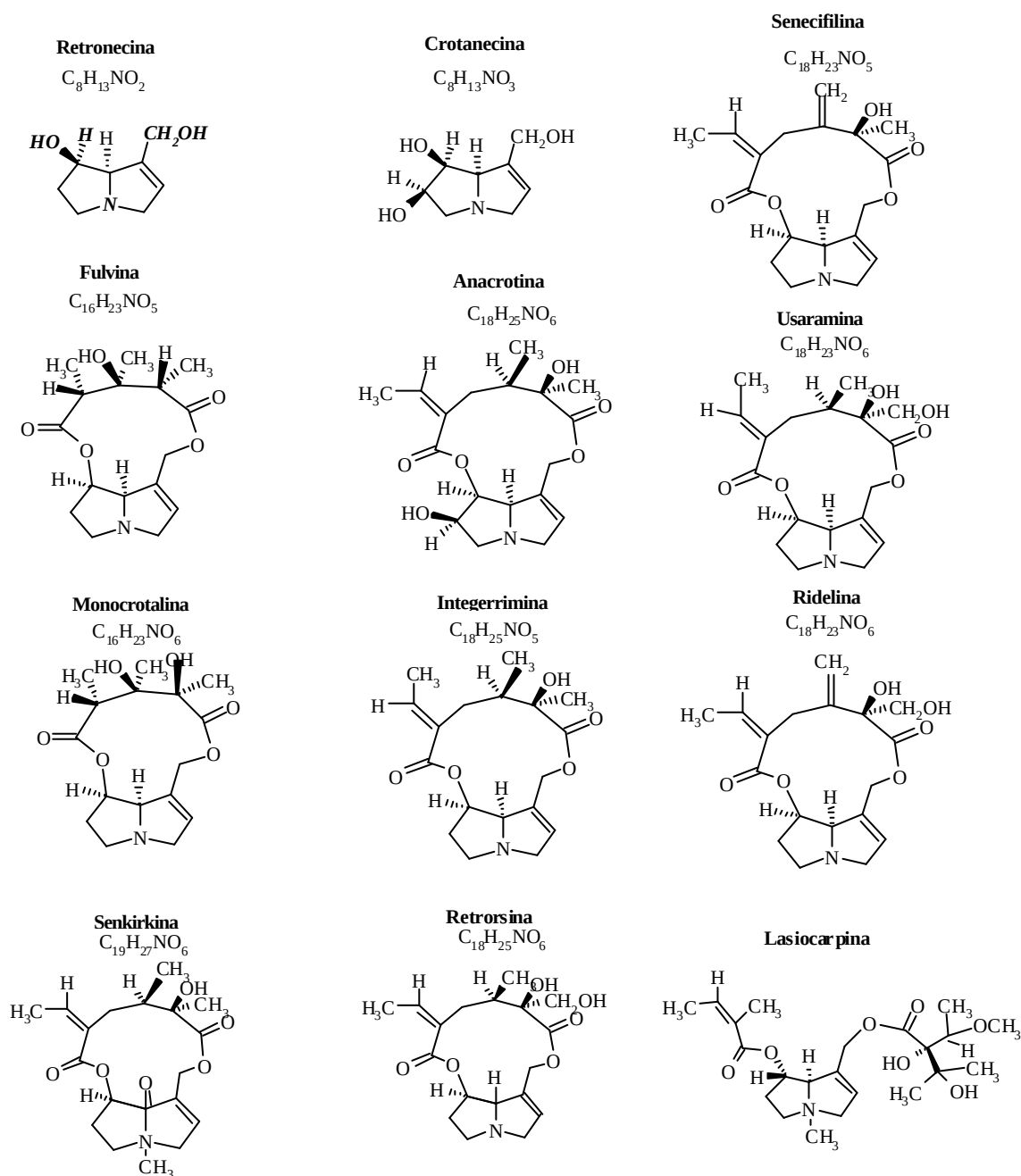
Estas plantas crecen en suelos preferentemente drenados, con alta iluminación solar y en climas cálidos; el estado de floración se alcanza en promedio a 110 días dependiendo de la especie [32, 33].

Se puede mencionar algunas especies importantes, tales como: *C. intermedia*, *C. lanceolata*, *C. mucronata*, *C. spectabilis* y *C. incana*, las cuales crecen extensivamente en Suramérica. La especie más comúnmente distribuida en el trópico es la *Crotalaria incana*, la cual habita en campos cultivados, a orillas de las carreteras y en lugares erosionados. Los principales compuestos hallados en especies de *Crotalaria* se observan en la **Figura 7** [34].

1.2.1.2 Utilización de las Leguminosas en la agricultura

Leguminosas como las *Crotalarias*, poseen un alto valor como forraje, abono verde y se usan en control de la erosión; su follaje posee entre 0.5 – 1 % de nitrógeno, el cual al ser incorporado al suelo mejora su fertilidad y la retención de nutrientes, dando lugar a mejor estructura del suelo, retardando los procesos de erosión de los mismos. Se alcanzan mayores niveles de productividad de alimentos cuando se utilizan técnicas de rotación (siembra sucesiva de diferentes cultivos), sin la pérdida del valor cultivable de los suelos [13, 35].

Figura 7. Estructuras de algunos alcaloides pirrolizidínicos detectados en especies de *Crotalaria* [34].



Estas especies, son generalmente resistentes en suelos pobres en nutrientes del clima tropical, requiriendo baja cantidad de fertilizantes puesto que son fijadoras de nitrógeno. Forman gran cantidad de nódulos debido a bacterias de especies comunes como el *Rhizobium*. La bacteria simbiótica ataca los pelos radiculares de la planta huésped, induciendo el crecimiento de las células alrededor de la bacteria; en los nódulos formados se fija nitrógeno atmosférico, el cual es liberado en forma de iones amonio y nitrato promoviéndose el intercambio con la planta de nutrientes y abrigo de la misma. Este proceso establece concentraciones mayores de ^{15}N en los nódulos de Leguminosas a diferencia de otras plantas [36- 38].

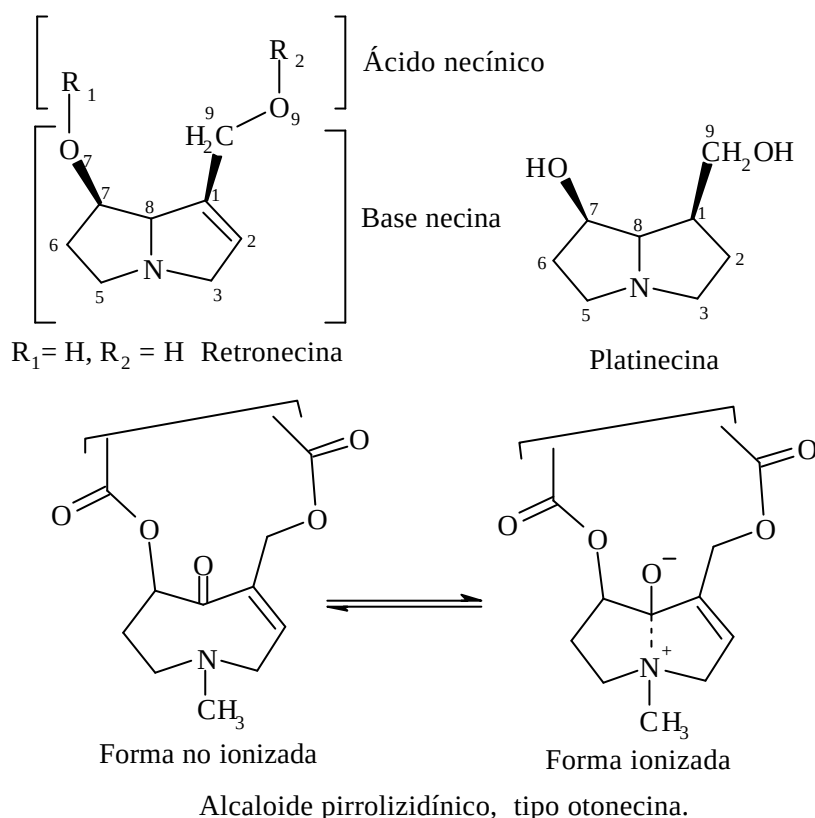
La desventaja de su cultivo en general, radica en que puede albergar algunas especies de insectos nocivos para los cítricos; poseen semillas resistentes las cuales pueden germinar años después de esparcidas contaminando otras cosechas, así como su contenido de alcaloides pirrolizidínicos [33, 35], los cuales son sintetizados en las raíces de las plantas, cuyo producto primario generalmente es el N-óxido del PA, para luego ser transportados y distribuidos a sus diferentes partes [39].

1.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN TÓXICA DE LOS ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Químicamente, las pirrolizidinas se distinguen por la presencia de dos (2) anillos de cinco miembros fusionados, los cuales contienen un átomo de nitrógeno enlazante entre los dos anillos, formando un alcaloide terciario. El anillo es frecuentemente sustituido con un grupo hidroximetileno en la posición C_1 y un grupo hidroxilo en la posición C_7 . Esta estructura se

denomina base necina (**Figura 8**). Los alcaloides pirrolizidínicos con una insaturación en la posición 1,2 necina, se clasifican en retronecina y otonecina cuando son saturados del tipo platinecina.

Figura 8. Estructuras base de alcaloides pirrolizidínicos.



Los alcaloides pertenecientes al tipo retronecina, son solubles solo en solventes orgánicos de naturaleza polar. En cambio, los alcaloides tipo otonecina, son solubles tanto en solventes orgánicos no polares, como en agua [9]. Esto sugiere que hay una interacción trans-anular entre N_4 y C_8 en la base necina, tal que ella pueda existir en una forma cargada; la alta solubilidad en solventes acuosos explica los problemas de salud por ingestión de remedios herbales que contienen alcaloides pirrolizidínicos en agua.

Los compuestos hallados en especies de *Crotalaria* y *Senecio* son ésteres de amino alcoholes (base necina). La toxicidad de estos compuestos aumenta con la sustitución por grupos éster o cicloéster, sin embargo, alcaloides con base necina saturada tipo platinecina no son tóxicos debido a su baja reactividad, al no ser fácilmente oxidados a pirroles reactivos [9].

Una variedad de plantas ha sido utilizada en medicina indígena, remedios caseros para combatir diversas dolencias, tal es el caso del Árnica de Bogotá (*Senecio formosus*), cuyas infusiones son utilizadas como sudorífica, depuradora de la sangre y antisifilítica, pero debido a su contenido de retrorsina (**Figura 7**), genera enfermedades venooclusivas, conducente en la mayoría de los casos a ascitis (acumulación de líquido en el abdomen) y coma hepático. Los alcaloides tipo platinecina, han sido utilizados en el pasado en tratamientos de hipertensión arterial, úlceras internas y en drogas oftalmológicas (tartrato de platifilina al 1%) [11, 32, 40].

Los PA's producen en primera instancia, lesiones venooclusivas conducentes al desarrollo de cirrosis; poseen actividad carcinogénica y mutagénica, la cual depende del metabolismo y la forma reactiva que producen en el organismo en el cual actúan. En experimentos con células hepáticas embrionarias humanas, la retrorsina mostró ser más tóxica que la lasiocarpina (**Figura 7**), a diferencia de en ratas, en la cual actúan de forma inversa. Todos estos resultados indican, que los tejidos hepáticos embrionarios humanos son más hábiles en metabolizar alcaloides pirrolizidínicos para producir pirroles [2, 4].

La presencia del enlace doble en el núcleo pirrolizidinico en la posición 1,2, establece su actividad carcinogénica debido a que este enlace facilita la

deshidrogenación al correspondiente pirrol, el cual está sujeto a ataque nucleofílico [4].

Investigaciones realizadas por A. Mattocks [41], establecen la presencia de N-óxidos, así como los correspondientes metabolitos pirrólicos, formados del alcaloide pirrolizidínico mediante rearrreglo de la insaturación en sistemas microsomales hepáticos, cuyo mecanismo de acción en el organismo es enteramente diferente. Los alcaloides pirrolizidínicos más lipofílicos, dan lugar a velocidades de su metabolismo más altas. La relación de N-óxidos/metabolito pirrólico cambia dependiendo del tipo de éster del alcaloide; y es alta para alcaloides diésteres y baja para diésteres macrocíclicos de 12 miembros y monoésteres.

Los niveles de metabolitos pirrólicos enlazados a tejidos hepáticos (responsables de la hepatotoxicidad en ratas) no reflejan las velocidades de formación de tales metabolitos, determinados mediante ensayos *in vitro*. Influyen factores adicionales, tales como la química, la estabilidad y la reactividad del metabolito tóxico [41].

La toxicidad aguda de un producto químico suele ser expresada como "dosis letal" (LD_{50}), que es la dosis de un compuesto tóxico, que puede matar al 50 % de los animales expuestos a esta sustancia. La LD_{50} se expresa generalmente en miligramos de sustancia activa por kilogramo de peso corporal (mg/kg), unidades que dependen del tipo de compuesto. Las dosis letales por consumo de alcaloides pirrolizidínicos, son del orden de $LD_{50}=75$ mg (monocrotalina)/kg, determinadas mediante experimentos con ratas [8].

Niveles de toxicidad en pollos, con diversas especies de *Crotalaria*, fueron determinados por Corbun. W. [42]. De tal trabajo se estableció mediante

cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), el contenido de alcaloides pirrolizidínicos, utilizando monocrotalina y espectabilina como estándares de calibración. Altos niveles de alcaloide fueron hallados en semillas de *Crotalaria* (*C.*) *spectabilis* (3.85%), *C. retusa* (2.69%), *C. alata* (1.60%), *C. quinquefolia* (1.19%) y *C. argyrolobioides* (1.01%); esta última especie produce señales tóxicas, pero no la muerte cuando se alimenta al animal con cantidades de 10 mg de alcaloide/kg de peso corporal; las primeras cuatro especies producen la muerte del animal, cuando se alimenta con dosis de 2 a 6 mg/kg peso corporal.

Las aves con problemas en el hígado muestran síntomas imprecisos y generales, tales como pérdida de apetito, apatía, disminución del peso, debilidad, diarrea, plumaje en mal estado, sed y aumento en la producción de orina, etc. En un estado más avanzado presentan uratos (porción blanca de las heces) teñidas de verde o amarillo, inflamación abdominal, acumulación de líquido en abdomen (ascitis), alteración en la coagulación de la sangre, hemorragias intestinales, reblandecimiento y sobrecrecimiento del pico y de las uñas. Los síntomas pueden pasar desapercibidos hasta que la enfermedad está muy avanzada [43]. Esto hace difícil el diagnóstico en sus primeras fases, con lo cual es más fácil la prevención en el suministro de alimento contaminado con alcaloides pirrolizidínicos.

La mayor susceptibilidad de intoxicación con alcaloides pirrolizidínicos se presenta en aves, a diferencia de los ovinos, los cuales poseen mayor resistencia a dichas sustancias. Investigaciones llevadas a cabo por Craig y colaboradores [44] sugieren que el mecanismo de protección primaria en los ovinos está localizado en la microflora ruminal anaerobia; las bacterias

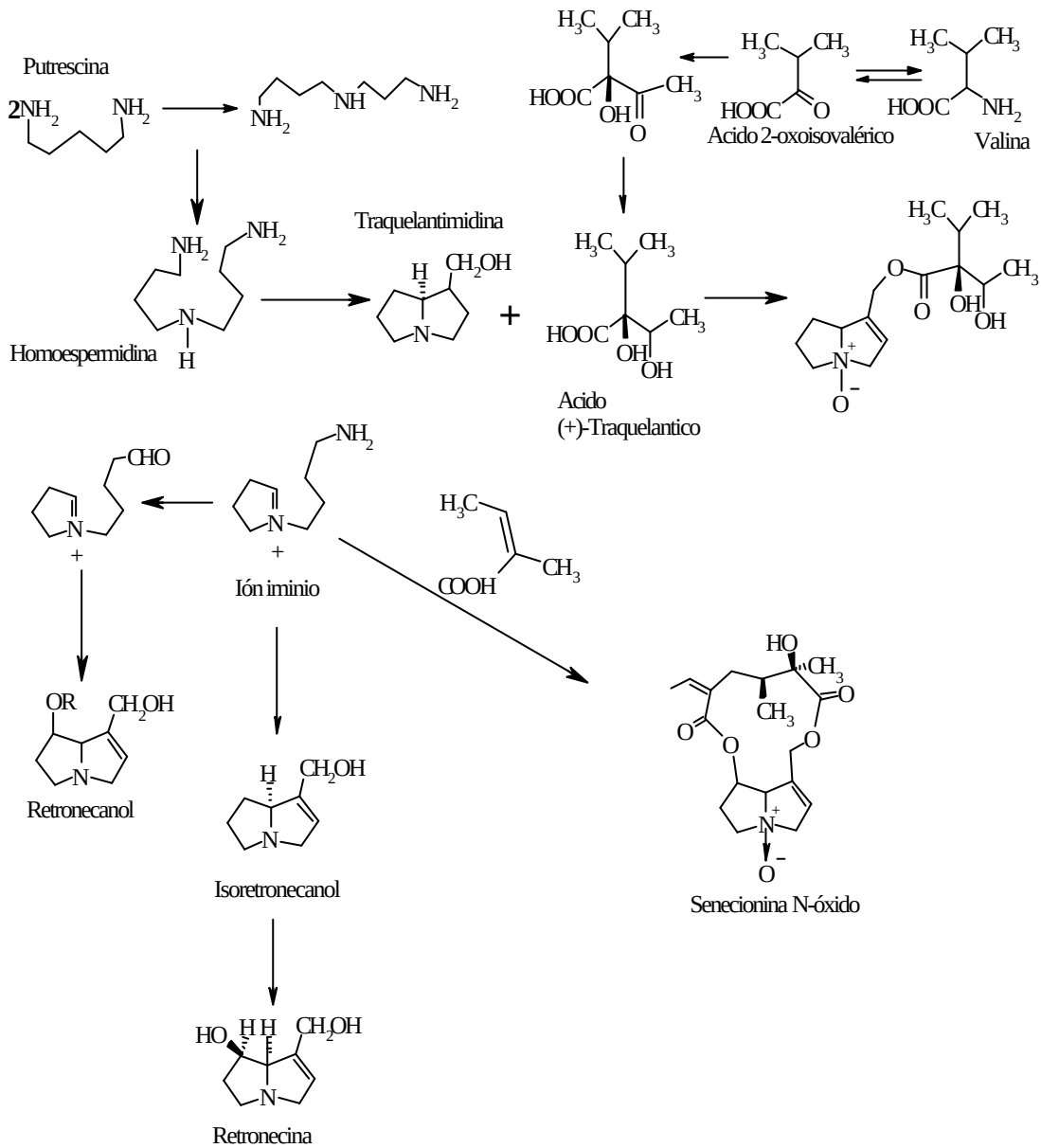
ruminales metabolizan rápidamente los pirroles reactivos, desechando altos niveles de éstos en el hígado.

1.2.3 BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

La biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos se establece inicialmente en la raíz, en este centro de producción los alcaloides se hallan predominantemente en forma de N-óxidos, los cuales son más fácilmente transportados por la planta a sus diferentes partes. Estos metabolitos son localizados y almacenados en tejidos periféricos de hojas y tallos; sin embargo, son traslocados de hojas viejas a hojas jóvenes recientemente formadas, con lo cual el contenido de PA's es mayor en estas últimas; en las flores y semillas los alcaloides se acumulan generalmente en su forma base como una amina terciaria lipofílica [45, 46].

La síntesis de la base necina (Esquema2) comienza con una unión primaria de moléculas de putrescina y/o aminobutilo, conformando la homoespermidina como primer intermediario, formada a partir de la homoespermidina sintetasa, enzima que cataliza la transferencia de un grupo aminobutilo, putrescina o espermidina a una segunda molécula de putrescina. Las bases necinas de la mayoría de alcaloides (tipo senecionina y licopsamina) son derivados de aminoácidos alifáticos. Estudios realizados por Hartman [39] sobre biosíntesis en Astearaceas, establecen un estricto proceso controlado y coordinado de producción de alcaloides con el crecimiento de las raíces, el cual desciende cuando cesa el crecimiento de las mismas.

Esquema 2. Biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos.



1.2.4 MECANISMO DE DEFENSA DE LAS PLANTAS.

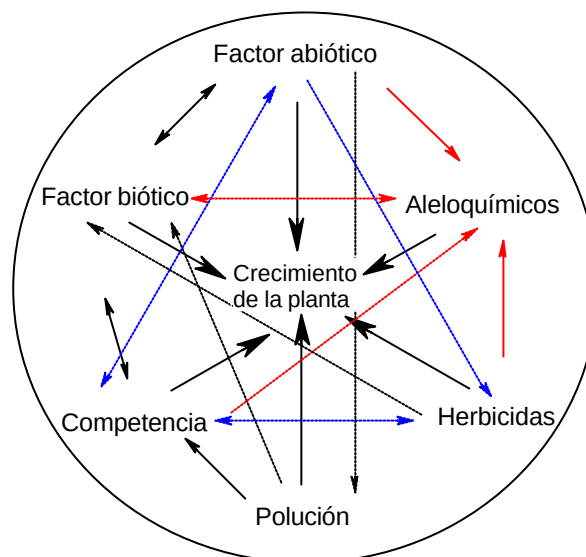
La química ecológica es el estudio de las interacciones químicas entre organismos y su medio; estos mecanismos de interacción hacen parte del proceso evolutivo de los organismos vivos, permitiendo el desarrollo de diversas estrategias de defensa encaminadas a la supervivencia y continuidad de la especie.

Para el caso específico de las plantas, éstas han desarrollado mecanismos de defensa, por medio de la producción de mezclas complejas de compuestos orgánicos. Su crecimiento está condicionado a una serie de interacciones variadas con factores medioambientales (exógenos), los cuales determinan la síntesis y producción de metabolitos secundarios; los factores se pueden agrupar en:

- Factores bióticos, insectos, herbivoría, agentes patógenos, enfermedades;
- Factores abióticos, luz, humedad, radiación UV, nutrientes, temperatura, pH del suelo;
- Competencia por espacio, agua, luz y nutrientes;
- Polución, metales pesados, ozono, productos químicos;
- Herbicidas y pesticidas.

Los aleloquímicos, entre ellos los compuestos fenólicos, quinonas, terpenos, ácidos orgánicos y alcaloides, entre otros, son la suma de compuestos establecidos por equilibrio químico-ecológico o interacción de factores, así como se describe en el **Esquema 3** [47].

Esquema 3. Interacciones existentes entre factores medioambientales.



Dentro de los factores endógenos que afectan el desarrollo normal de las plantas se encuentran las enzimas (para el control químico en los organismos multicelulares) y las hormonas. Las fitohormonas abarcan etileno, auxinas, giberelinas, citoquininas y el ácido abscísico cada uno activo a bajas concentraciones dentro de la planta; otros factores endógenos relevantes son la edad de la planta, edad del tejido, el estado fenológico, las características anatómicas y morfológicas de las hojas [48, 49].

Estudios específicos con glicoalcaloides (sección 1.2), han determinado que su presencia se establece como mecanismo químico de defensa de la planta ante depredadores (insectos). La concentración de alcaloides depende de factores tales como el clima, el crecimiento bajo, las condiciones inadecuadas de almacenamiento y el ataque por hongos [1].

Para el caso de los alcaloides pirrolizidínicos, se acepta que la condición de herbivoría tiene alta incidencia en la producción de estos metabolitos. Sin

embargo, su rol en defensa contra insectos herbívoros aún no es muy clara. Ensayos de herbivoría en laboratorio desarrollados por Van Dam y colaboradores [50] en *Cynoglossum officinale*, con diferentes especies de larvas, apoyan la teoría de la producción de PA's como protección de la planta, en especial de sus órganos más valiosos.

En los ensayos realizados con *Senecio misser* en áfidos (*Myzus persicae*), insectos de la familia de los Homópteros, se estableció una inhibición fuerte de la actividad alimenticia de los áfidos, por la presencia de alcaloides pirrolizidínicos en la planta [51].

Los mecanismos de defensa de las plantas consisten, en general, en la síntesis de sustancias químicas que inhiban las proteasas de los herbívoros, con el fin de reducir el daño en los tejidos. La distribución puede ser variable en los diferentes tejidos vegetales, en puntos específicos o en toda la planta dependiendo de su valía para la misma, así como la redistribución, que avanza según el desarrollo fenológico y cuya detección puede ser al cabo de horas, días o semanas [17, 52].

1.3 ANÁLISIS DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

1.3.1 TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1.3.1.1 Extracción asistida por ultrasonido

Técnica de extracción rápida y efectiva que utiliza frecuencias de ultrasonido (16 kHz) para la ruptura o separación del analito de la matriz. La irradiación

de un líquido por ultrasonido, genera pequeñas burbujas que se expanden y colapsan, fenómeno conocido como cavitación, que puede generar altas temperaturas locales y presiones en puntos definidos del líquido. Este proceso ocurre a temperaturas entre 40 a 50 °C por calentamiento del baño en el cual está inmerso el recipiente que contiene la muestra [55].

En tejidos vegetales o animales el colapso de las burbujas contra las células, causa la ruptura de las membranas, con lo cual los analitos pueden ser más fácilmente solubilizados en el solvente [53].

Las frecuencias de ultrasonido han sido utilizadas en la síntesis directa de compuestos organometálicos y de coordinación, mediante la activación de superficies metálicas, así como en procesos electroquímicos para el transporte de iones hacia la superficie del electrodo y en la limpieza de éstos [54].

1.3.1.2 Extracción Soxhlet

Técnica de extracción continua, aplicada a matrices sólidas o semisólidas. Consiste en la solubilización de los analitos de la matriz, empleando solventes generalmente polares de bajo punto de ebullición, en un proceso continuo de lavado de los analitos de interés por un tiempo generalmente largo de 12 a 24 horas, operando a la temperatura de ebullición del solvente (**Figura 9**). El extracto obtenido es concentrado por evaporación del solvente a presión reducida [56].

Figura 9. Equipo de extracción Soxhlet.



1.3.1.3 Extracción asistida por radiación de microondas

La radiación de microondas, corresponde a la región del espectro electromagnético entre el infrarrojo (IR) y las ondas de radio; abarca las frecuencias entre 300 MHz y 300 GHz (longitudes de onda de 1cm a 1m).

Esta técnica de aplicación de energía intensa a 915 ó 2450 MHz en hornos convencionales, genera una orientación de las moléculas del analito junto con las del solvente bajo un campo eléctrico aplicado, dando lugar al aumento local de la temperatura y la solubilización de los compuestos de interés, co-ayudado por el rápido calentamiento del solvente, cuando éste posee constante dieléctrica alta, causado por la rotación rápida de las moléculas en un campo eléctrico alternante [55].

Los procedimientos generales de extracción por radiación de microondas, se llevan a cabo utilizando metanol y/o mezclas de metanol/ácido acético y metanol: hidróxido de amonio o sodio, a temperaturas inferiores del punto de ebullición del solvente. Sin embargo, ello depende de la compatibilidad del solvente con el analito [57].

El empleo de esta técnica de extracción, ha tenido amplia aceptación en las últimas dos décadas para la extracción y fraccionamiento de matrices sólidas. Desarrollada inicialmente para la digestión ácida de minerales, fue aplicada posteriormente para la extracción de productos naturales. Tal es el caso de los aceites esenciales, permitiendo extracciones más rápidas y eficientes que las tradicionales [58].

1.3.1.4 Extracción en fase sólida

Extracción en fase sólida (SPE) es un método de extracción sólido-líquido, el cual permite aislar y concentrar los analitos de la matriz. Las sustancias son adsorbidas sobre la fase sólida (sorbente) contenida en cartuchos de polipropileno, y eluídas con un solvente apropiado (**Figura 10**). Este proceso puede ser llevado a cabo de igual forma, para la retención de compuestos indeseados (interferencias), en la solución de la muestra.

Dependiendo del tipo de fase sólida, la separación se lleva a cabo en fase normal (el sorbente es más polar que la fase móvil o la solución de la muestra), o en fase reversa, por medio de intercambio iónico y/o exclusión

por tamaño, así como se representa en el **Esquema 4**. El analito puede ser enlazado a la fase por un número de mecanismos semejantes a los de la cromatografía líquida, e.g. puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión hidrófoba e interacciones electrostáticas [59, 60].

Figura 10. Equipo de extracción en fase sólida (SPE).

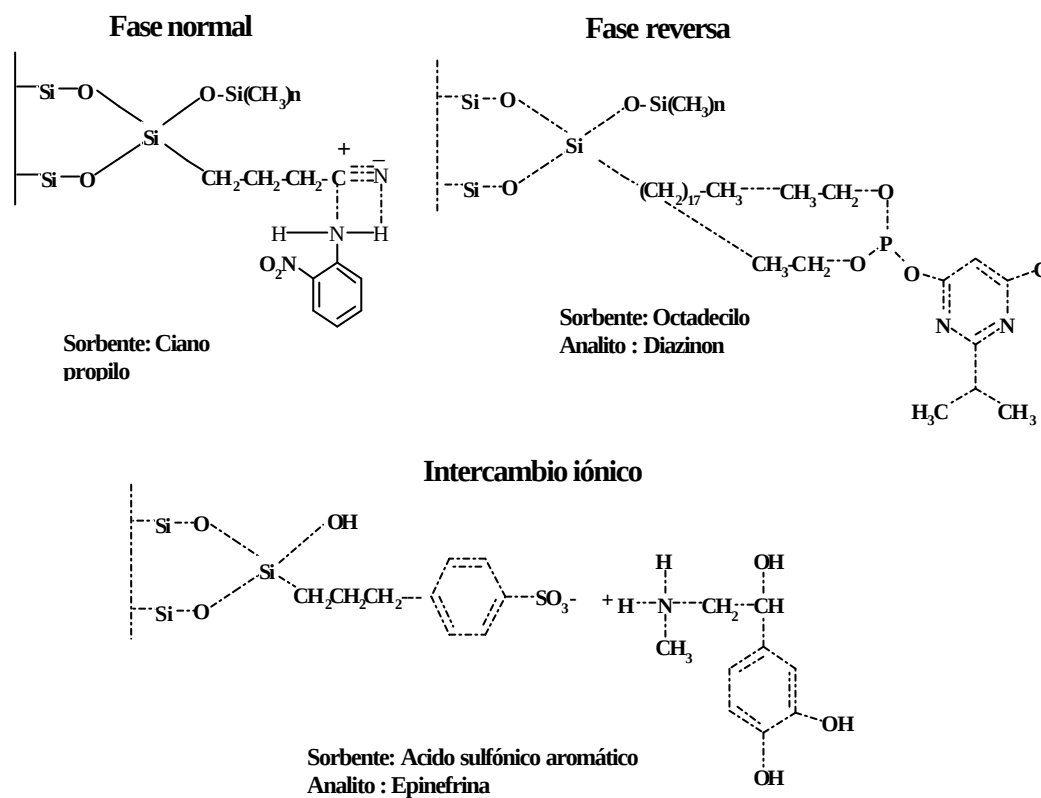


Las etapas de este proceso comprenden:

1. Acondicionamiento del cartucho con solventes, a fin de eliminar impurezas y preparar la fase adsorbente.
2. Adición de la muestra.
3. Lavado del cartucho con agua, solución buffer o solvente
4. Elución del analitos con solvente o mezcla de solventes de polaridad semejante a compuestos del interés.

Esta técnica de preparación de muestras tiene gran aplicación en la industria de alimentos, farmacéutica, análisis clínico, medioambiental y ciencias forenses (drogas de abuso, pesticidas etc) [59].

Esquema 4. Proceso de partición en fase sólida.



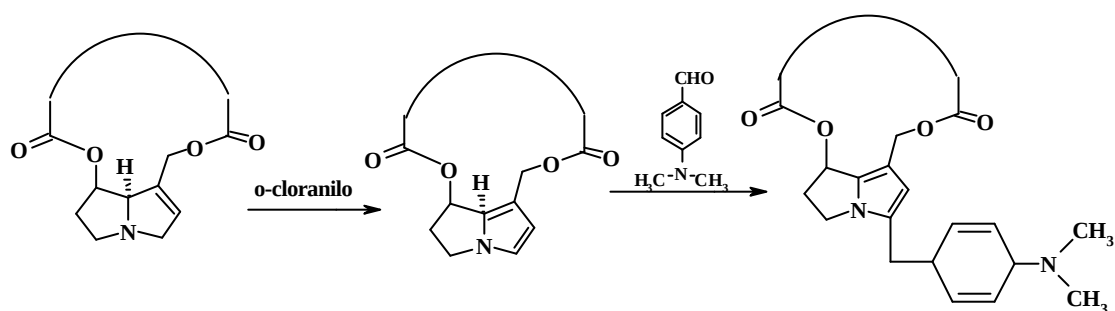
1.3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Diversos métodos de análisis se han desarrollado para la detección de alcaloides pirrolizidínicos; los más utilizados, comprenden los métodos preliminares por cromatografía en capa delgada, utilizando gel de sílice como fase estacionaria. El solvente más utilizado es metanol; sin embargo, en mezclas de alcaloides de diferente polaridad, la elución se realiza con mezcla cloroformo-metanol-amoníaco (85/14/1) o acetato de etilo-acetona-etanol-amoníaco (5/3/1/1); sistemas de solventes de mayor polaridad como n-

butanol-ácido acético-agua (4/1/5) son utilizados cuando se separan PA's N-óxidos sobre gel de sílice [61].

La detección de los alcaloides se lleva a cabo con agentes reveladores como vapores de yodo, soluciones de yodoplatinato acidificado, Dragendorff modificado ($\text{BiNO}_3/\text{AcOH}$; $\text{KI}/\text{H}_2\text{O}$) y Erlich; no obstante, la detección de alcaloides 1-2 saturados se dificulta por el empleo de esta técnica, especialmente con la solución de Dragendorff [62, 63].

Figura 11. Detección de PA's con el reactivo de Erlich (reacción de color).



El reactivo de Erlich permite la detección de pirroles ^{Color magenta} de $\text{CH}_2\text{N}^+\text{CH}_3$, la solución ácida de 4-dimetilaminobenzaldehído reacciona (en la posición α) con los pirroles obtenidos por deshidrogenación del PA inicial con una solución de o-cloranilo o por deshidratación del N-óxido de PA, con un complejo de Fe II (nitroprusiato) en ácido ascórbico y calentamiento por debajo de los 100°C , para formar un complejo coloreado (**Figura 11**). Estas pruebas pueden detectar niveles de N-óxidos de 0.002% en el material vegetal [41, 64].

La separación de alcaloides se lleva a cabo utilizando cromatografía en columna con alúmina neutra o gel de sílice como fase estacionaria con

solventes de carácter polar; sin embargo, el empleo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) provee un método de separación más versátil en mezclas complejas de tales sustancias.

La utilización de columnas Bondapak C₁₈ para sistemas en fase reversa (eluyendo con mezcla de metanol y buffer de fosfato) y columnas en resinas de estireno-divinilbenceno (eluyendo con acetonitrilo en solución de amoníaco), presentan ciertas desventajas, entre las cuales figuran corto tiempo de vida de los PA's debido al pH alto de las soluciones buffer; picos cromatográficos con "colas", lo cual origina baja resolución y alteración de los límites de sensibilidad (cambio en la respuesta del detector como función del cambio en la cantidad o concentración del analito) [61, 65].

El acople de cromatografía líquida a la espectrometría de masas, ha permitido la separación e identificación de mezclas complejas. Sin embargo, la confirmación inequívoca de la estructura de un compuesto debe contemplar, la combinación de más de una técnica de análisis. La utilización de la resonancia magnética nuclear (RMN) protónica y de ¹³C, permite la diferenciación entre compuestos de igual peso molecular, entre isómeros estructurales y geométricos. Por ello, el acople de HPLC a RMN podría ser una herramienta de separación y elucidación estructural excepcional en el análisis de extractos crudos con mezclas complejas de componentes [40, 66].

Métodos de detección de inmunoensayo recientes, desarrollados por Roseman y colaboradores [67], permiten determinar niveles de PA's diéster macrocíclicos del orden de ng/ml en muestras ambientales y biológicas. Estos procedimientos establecen la N-alquilación de los PA's con posterior

conjugación a una proteína de arrastre, desarrollando la prueba de inmunoensayo Elisa.

1.3.2.1 Análisis cualitativo de alcaloides pirrolizidínicos por cromatografía de gases de alta resolución

Los trabajos de Witte, Hartman y colaboradores [68], permitieron llevar a cabo la identificación preliminar de PA's, basados en el cálculo de los índices de retención de Kováts (I_k), en columnas capilares con diferentes fases estacionarias, DB-1, DB-5 y DB-17; y en columnas empacadas, OV-1701 y OV-5. Este trabajo interlaboratorio, estableció la reproducibilidad alta de los I_k para cerca de 100 alcaloides pirrolizidínicos, comparados con los métodos de derivatización de los PA's en sus derivados trimetilsilílicos, permitiendo así la aplicabilidad del método para la identificación preliminar de PA's.

Los I_k indican el orden de aparición de los compuestos en un cromatograma respecto a parafinas lineales, que eluyen de la columna en mezcla con la muestra problema. El I_k de una parafina normal, es cien veces el número de átomos de carbono que contenga el compuesto [69, 70]. La expresión utilizada para el cálculo de I_k , de compuestos diferentes a los alcanos, cuando se emplean condiciones isotérmicas es:

$$I_k = 100n + 100 ((\log t_{R,x} - \log t_{R,n}) / (\log t_{R,N} - \log t_{R,n})) \quad \text{Ecuación 1}$$

Cuando se utiliza la programación de temperatura, la expresión para el cálculo del I_k es:

$$I_k = 100n + 100 ((t_{Rx} - t_{Rn}) / (t_{RN} - t_{Rn}))$$

Ecuación 2

Donde:

t_{Rx} =Tiempo de retención del compuesto de interés

t_{Rn} = Tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto x;

t_{RN} = Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto x;

n = Número de átomos de carbono en el alcano, que eluye antes del compuesto x.

Los procedimientos de derivatización de PA's a sus derivados trifluoro-propílicos, permiten establecer la presencia de alcaloides tipo retronecina, del orden de μM , utilizando cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones (GC-ECD) aplicados para el análisis de PA's en leche. Estos análisis requieren procedimientos extensos de hidrólisis con bases fuertes, para formar la denominada base necina y su posterior reacción con el anhídrido heptafluoro-butírico; la desventaja de este método radica en que no permite diferenciar el tipo de alcaloide pirrolizidínico, mono-diéster macrocíclico o de cadena abierta y así mismo, determinar la toxicidad en alimentos [71].

1.3.2.2 Determinación estructural de alcaloides pirrolizidínicos

Por medio de espectroscopía infrarroja (IR), pueden detectarse insaturaciones, grupos hidroxilo y bandas de ésteres carbonílicos, los cuales son los grupos funcionales más representativos en PA's. El grupo carbonilo se presenta a $1730 - 1740 \text{ cm}^{-1}$ en PA's insaturados, con desplazamiento de la banda a $1710 - 1720 \text{ cm}^{-1}$ en el caso de PA's saturados. En diésteres tipo otonecina (**Figura 8**), se produce un incremento de la interacción transanular

N....C=O, causando un desplazamiento a baja frecuencia en la absorción del grupo carbonilo [61].

Métodos de análisis instrumental modernos incluyen la resonancia magnética nuclear, usada para la determinación de las bases libres de PA's y sus N-óxidos en material vegetal inmaduro de *Cynoglossum officinale*, utilizando p-dinitrobenceno como estándar interno [72]. Las señales características por NMR -¹H de H-2 (en la base necina) son a δ_H 5.5-5.7 para PA's insaturados, monoésteres y diésteres no ciclados; a δ_H 5.9-6.1 para alcaloides de 11 miembros y a δ_H 6.1-6.3 para alcaloides de 12 miembros [73, 74].

Las señales químicas por RMN ¹³C permiten establecer grupos carbonilo alrededor de δ 169.2±2, grupos metilo a δ 21.3±1.5, medidos en solución de cloroformo deuterado (CDCl₃). Las señales de grupos metoxi en el ácido necínico (**Figura 8**) aparecen a δ 56.8±0.3. Las señales químicas de algunos PA's monoésteres, esterificados en posición C₇ con los fragmentos **a**, **b** y **c** (**Figura 12**) se presentan en la **Tabla 2**. De igual forma, las señales de PA's diésteres macrocíclicos de base necina insaturada se presentan en la **Tabla 3** [75]; las diferencias en los valores entre estereoisómeros de PA's son pequeñas.

Figura 12. Fórmulas estructurales de fragmentos de ácidos necínicos.

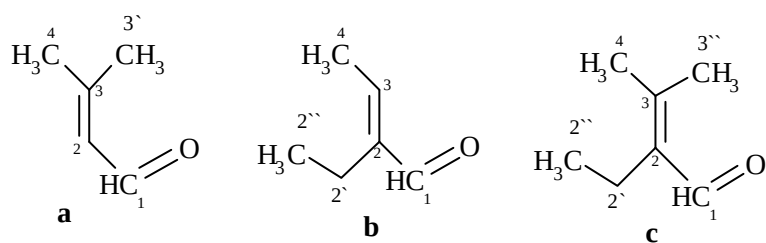


Tabla 2. Señales químicas por RMN ^{13}C para alcaloides pirrolizidínicos monoéster de bases necinas insaturadas [75].

Señales de los carbonos en la base necina										
Compuesto	Fórmula	Peso molecular	C ₁	C ₂	C ₃	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉
A - Angeloil-heliotridina	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	237	137,7	126,5	63,2	53,6	34,6	74.1	75.9	60.1
B - Angeloil-retronecina	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	237	138,1	127,7	62,1	53,8	30,2	77.7	79.2	59.8
C - Senecioil-retronecina	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	237	138,8	121,8	61,8	53,5	34,3	72.4	76.3	59.4
D - Angeloil-platinecina	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239	43,9	28,7	55,6	53,6	35,2	72.4	69.2	62.7
E - Licopsamina	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	133.0	130.2	62.9	53.9	36.2	71.0	87.2	62.5

Continúa **Tabla 2**

Señales de los carbonos en el fragmento de ácido necínico							
Compuesto	Fragmento de ácido necínico sustituido en C ₇	C ₁	C ₂	C ₂ '	C ₃	C ₃ '	C ₄
A -	b	168.7	124.4	20.5	140.8	-	15.9
B -	b	167.6	125.3	20.5	139.9	-	15.8
C -	a	168.0	115.0	-	138.8	27.6	20.5
D -	b	167.0	127.2	20.8	139.4	-	15.8
E -	c / en C₉	174.4	83.6	70.9	32.4	17.4	17.4

El fragmento de ácido necínico a C₇ corresponden a los presentados en la **Figura 12**.

Tabla 3. Señales químicas por RMN ^{13}C para alcaloides pirrolizidínicos diéster macrocíclicos de bases necinas insaturadas [75].

Señales de los carbonos en la base necina										
Compuesto	Fórmula	Peso molecular	C ₁	C ₂	C ₃	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉
A -Monocrotalina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	325	132.3	134.2	60.4	53.7	33.5	74.6	76.8	61.9
B -N-óxido de monocrotalina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₇	341	131.7	134.1	78.8	69.2	33.8	74.8	96.6	62.0
C -Senecifilina	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅	333	132.2	136.6	62.7	53.3	36.0	74.9	77.7	61.2
D -Interregimina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	335	131.8	136.4	62.2	63.2	33.8	75.4	77.4	60.8
E -Retrorsina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351	132.2	135.2	62.2	52.8	36.9	75.7	76.7	63.3

Continúa **Tabla 3**

Señales de los carbonos en el fragmento de ácido necínico										
Compuesto	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁
A	174.8	78.6	77.7	44.2	174.3	22.4	18.2	14.3	-	-
B	178.4	78.8	80.5	44.9	177.1	23.7	19.7	15.6	-	-
C	177.0	76.4	146.4	37.2	131.4	167.1	24.9	114.4	135.8	15.2
D	178.2	76.4	39.4	29.6	134.1	169.2	25.2	11.8	135.3	14.2
E	175.6	81.3	35.6	36.0	131.3	167.3	66.7	11.6	136.2	15.2

La caracterización de un compuesto por RMN, requiere la alta pureza de la sustancia; en la actualidad el acople de la cromatografía líquida de alta eficiencia a la RMN permite el aislamiento y la caracterización directa en mezclas complejas de extractos naturales [66].

1.3.2.2.1 *Análisis por GC-MS*

Los análisis de alcaloides pirrolizidínicos saturados e insaturados, pueden realizarse por cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC/MS), incluyendo la detección de metabolitos de los PA's (pirroles) en tejidos [41, 76].

El análisis por MS por impacto de electrones, provee la información estructural, que permite la diferenciar alcaloides con bases necinas saturadas e insaturadas, las cuales poseen iones fragmento característicos [68, 77], así:

➤ En alcaloides diésteres de base necina saturada (tipo platinecina): m/z 82, 95/96, 211, 222/237.

➤ En alcaloides monoésteres con sustitución en la posición del oxígeno (**Figura 8**) en:

O₇ éster, 1-2 insaturados picos a m/z 93, 136, 137, 138.

O₉ éster, 1-2 insaturados picos a m/z 80, 106, 111, 136, 137, 138.

O₉ éster, 1-2 saturados picos a m/z 55, 83, 96, 124, 142,

O₉ éster, 1-2 saturados, grupo OH en C₇, m/z 82, 95, 140, 158.

➤ Alcaloides diésteres macrocíclicos tipo otonecina:

m/z 94, 96, 110, 122, 123, 149, 150, 151

➤ Alcaloides diéster macrocíclicos de base necina insaturada, la fragmentación inicia en el éster alílico e involucra un rearrreglo tipo McLafferty [79].

El análisis de espectros de masas de metabolitos N-óxidos, obtenidos por impacto de electrones, en fluidos biológicos y material vegetal, presenta dificultades debido a la inestabilidad térmica de estas moléculas (son termolábiles), obteniéndose generalmente espectros donde no aparece la señal del ion molecular, pero se detecta el ión $[M-O]^+$ [80].

En espectros de masas, obtenidos por bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS), de diéster macrocíclicos N-óxidos, el pico de base corresponde a un ion molecular protonado $(M+H)^+$, y se registran fragmentos en m/z 80, 94, 106, 118, 120, 136 [].

La espectrometría de masas por ionización química (CI-MS), de iones negativos (OH^- , como reactante), presenta fragmentos $(M-H)^-$ y $(M+OH)^-$, que permiten diferenciar los PA's monoéster y diéster macrocíclicos. El ion $(M+OH)^-$ de un compuesto cíclico, es un aducto (por reacción de ataque nucleofílico), que conduce a la ruptura del anillo, y generando un pico de intensidad alta. La abundancia relativa de los iones de la cadena en bases necinas saturadas es baja, comparada con las bases necinas insaturadas [81].

1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Para determinar la validez de los resultados obtenidos en un experimento establecido el cual posea determinaciones repetidas (e.g. implementación de métodos de extracción y cuantificación de sustancias químicas), debe

estimarse el error relativo inherente en las determinaciones mediante el análisis estadístico de los datos.

Existen dos tipos de errores, aleatorios y sistemáticos. Los errores aleatorios, no se pueden eliminar pero pueden ser minimizados, y son causados por errores instrumentales, metodológicos y personales. Este tipo de errores dan lugar a la dispersión de los resultados alrededor del promedio.

La determinación de la dispersión de los resultados en un ensayo dado utiliza la desviación estándar (**s**), la cual se calcula así:

$$s = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Ecuación 3

$\bar{X}$: promedio

n: número de mediciones

x_i : valores de la variable

La comparación entre las desviaciones estándar, de diversos experimentos, con el mismo observable (y), permite establecer si las diferencias entre resultados se atribuyen a errores aleatorios. Una forma de calcularlo, se lleva a cabo con el cociente de los cuadrados de las desviaciones estándar (prueba F):

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Ecuación 4

σ_1 = desviación estándar del experimento 1

σ_2 = desviación estándar del experimento 2

1.4.1 ANÁLISIS DE VARIANZA

En un diseño de experimentos, en el cual exista más de un factor y una fuente de variación aleatoria, se aplica la técnica de análisis ANOVA (análisis de varianza).

El análisis de varianza, permite evaluar si las diferencias entre los tratamientos realizados son significativas (factor controlado) o pueden atribuirse al error experimental.

En un ANOVA de dos factores con más de una lectura por muestra, se calculan los parámetros Q , Q_A , Q_B , Q_{AB} y Q_W a partir de las siguientes relaciones:

Q : Sumas de cuadrados

Q_A : Suma de cuadrados entre los grupos, factor A

Q_B : Suma de cuadrados entre los grupos, factor B

Q_{AB} : Interacción entre factores

Q_W : suma de cuadrados dentro de los grupos,

$$Q = \sum_i \sum_j \sum_k \left(x_{ijk} - \bar{x} \right)^2 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$Q_B = IK \sum_j \left(\bar{x}_{.j.} - \bar{x} \right)^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$Q_A = JK \sum_i \left(\bar{x}_{i..} - \bar{x} \right)^2 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$Q_{AB} = K \sum_i \sum_j \left(\bar{x}_{ij.} + \bar{x} - \bar{x}_{i..} - \bar{x}_{.j.} \right)^2$$

Ecuación 8

i: columnas

j: filas

k: número de réplicas

Tabla 4. ANOVA de dos factores con más de una lectura por muestra.

	SS	Grados de libertad	Cuadrado promedio	F
Factor A	Q_A	$i - 1$	$\sigma^2_A = Q_A / (i - 1)$	$F^{(A)} = \sigma^2_A / \sigma^2_W$
Factor B	Q_B	$j - 1$	$\sigma^2_B = Q_B / (j - 1)$	$F^{(B)} = \sigma^2_B / \sigma^2_W$
Interacción	Q_{AB}	$(i - 1)(j - 1)$	$\sigma^2_{AB} = Q_{AB} / [(i - 1)(j - 1)]$	$F^{(AB)} = \sigma^2_{AB} / \sigma^2_W$
Dentro de grupos	Q_W	$ij(k - 1)$	$\sigma^2_W = Q_W / [ij(k - 1)]$	
Suma	Q	$ijk - 1$	$\sigma^2 = Q / (ijk - 1)$	

El valor de F calculado, se compara con el valor crítico de F que se halla en tablas, el cual asocia el número de grados de libertad y el nivel de probabilidad deseados. Si el valor de F calculado es menor que el valor crítico, entonces, no existe efecto significativo entre los factores [82].

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

2.1.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El sistema instrumental utilizado comprende, cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama, HRGC-FID (Hewlett-Packard, HP 5890A *Series II*), columna capilar HP-5 (30 m, 0.25 mm d.i., 0.25 μ m f.e.), con programación de temperatura de horno 100°C (1 min) hasta 250°C (30 min) @ 5°C/min, inyección *splitless*.

Como técnica confirmatoria para alcaloides pirrolizidínicos se utilizó cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un detector selectivo de masas, HRGC/MSD (Hewlett-Packard HP 5890A *Series II*/ HP MSD 5972) operado en el modo *full scan*; un sistema de datos HP MS ChemStation, con dos bibliotecas de espectros de masas NBS75K (75.000 espectros) y WILEY 138 (138.000 espectros). Columna HP-5MS (60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μ m f.e.), con fase estacionaria ligeramente polar de 5% de fenil poli(metilsiloxano); con programación de temperatura de 120°C(10 min) hasta 280°C (15 min) @ 4°C/min, inyección *splitless*. La temperatura de la cámara de ionización fue de 180 °C y la energía de los electrones bombardeantes de 70 eV. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas se obtuvieron por medio de barrido de radio frecuencia en un analizador cuadropolar en un rango de masas m/z 40 –450.

2.1.2 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Para la implementación del método de extracción se utilizaron semillas de *Crotalaria nitidula*, disponibles comercialmente en tiendas agroindustriales (importadas del Brasil por Semicol S.A), las cuales poseen una alta calidad fitosanitaria.

Se realizaron los ensayos preliminares (mediante extracción con solvente asistida por microondas) con semillas, correspondiente a los lotes 002 de Septiembre de 2001 y 000, 001, 002 de Marzo, Julio y Septiembre de 2002, respectivamente. Se estableció la utilización de semillas del lote 002 de 2002, en el cual se detectó la presencia de 6 metabolitos secundarios, tipo alcaloide pirrolizidínico.

Los métodos de extracción utilizados comprendieron, la extracción Soxhlet (Sx), asistida por ultrasonido (Us) y por radiación de microondas (Mw). El tiempo de extracción para Us y Mw, se estableció de acuerdo con la temperatura, a la cual el solvente de extracción alcanzó un incremento de 10 °C respecto al valor inicial, puesto que el calentamiento del solvente acelera la solubilización de los analitos de la matriz.

La cantidad de muestra evaluada fue 70 g, la cual permitió llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo para diferentes metabolitos secundarios presentes en la semilla. Cada método se realizó por triplicado para su validación estadística.

2.1.2.1 Extracción Soxhlet de alcaloides

Los tiempos de extracción para alcaloides pirrolizidínicos utilizando esta técnica, fueron 12 y 24 horas. Se pesaron las semillas (molida y seca) de *Crotalaria* (70 g), colocadas en el cuerpo del extractor Soxhlet (**Figura 9**). Se llevó a cabo la extracción con 250 mL de metanol. Después de la extracción con solvente, la solución se concentró en un rotoevaporador (Buchi, modelo W240) a presión reducida. El extracto así obtenido se sometió a limpieza, de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación.

2.1.2.1.1 Limpieza de los extractos de semilla.

La limpieza de los extractos, se llevó a cabo por acidificación con HCl 2N (5 mL) hasta pH 2; la mezcla se centrifugó por 5 minutos, eliminándose el residuo sólido obtenido; el sobrenadante se ajustó a pH 8 con la adición de 1 mL de hidróxido de amonio concentrado (NH₄OH). Los alcaloides fueron extraídos con 30 mL de acetato de etilo, en porciones de 5 mL por vez, previa adición de cloruro de sodio (5 g) para aumentar la eficiencia de la extracción.

La fase orgánica obtenida, fue concentrada en el rotoevaporador a presión reducida hasta alcanzar 5 mL aproximadamente. Los compuestos grasos aún presentes en la solución, se retiraron empleando el sistema de extracción en fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de sílice modificada con octadecilo C₁₈ enlazado (40 µm, 500 mg, Bakerbond SPE columns, J.T Baker), con capacidad de 3 mL. Se utilizó el equipo de cartuchos para fase sólida, modelo Baker SPE-246.

La etapa de acondicionamiento del cartucho, se llevó a cabo con un solvente no polar (hexano, 6 mL), uno de media polaridad (diclorometano, CH₂Cl₂, 6 mL) y por último, el mismo solvente en el cual se encuentra la muestra (acetato de etilo, 6 mL), ajustando la velocidad de flujo de una a dos gotas por segundo mediante aplicación de presión baja.

La aplicación de la muestra en el cartucho se realizó sin succión, reteniéndose en este punto los compuestos de naturaleza no polar (ácidos grasos). Para el lavado del cartucho se utilizaron 3 mL de acetato de etilo, posteriormente, el cartucho se secó, con aplicando el vacío. La solución obtenida se concentró bajo corriente de nitrógeno. Se adicionó el estándar interno (ISTD, difenilamina, 2400 ppm) (50 µL), ajustando el volumen a 1 mL con acetato de etilo; 1 µL de la solución se inyectó al HRGC/FID.

2.1.2.2 Extracción de alcaloides asistida por ultrasonido

La extracción de los alcaloides pirrolizidínicos asistida por ultrasonido se realizó durante 30 y 60 minutos, sin calentamiento. En un recipiente con tapa rosca se pesaron las semillas (70 g), se adicionó metanol (100 mL) y la mezcla se sometió a la extracción asistida por ultrasonido.

El extracto resultante se filtró en embudo Buchner al vacío, y el residuo se lavó con metanol (40 mL). La solución obtenida se concentró a un volumen aproximado de 40 mL en el rotoevaporador a presión reducida, y la solución concentrada se sometió a limpieza así como se describió en la Sección 2.1.2.1.1.

2.1.2.3 Extracción de alcaloides asistida por radiación de microondas

En un recipiente con tapa rosca se depositaron las semillas (70 g) las cuales fueron sometidas a extracción asistida por radiación de microondas con metanol (100 mL). La extracción se realizó en tiempos de 5 y 10 minutos cada una, en un horno microondas convencional Daewoo modelo KOG-211M, con una potencia de consumo de 1380 W, potencia de salida de 900 W, frecuencia de radiación de microondas de 2.45 GHz, y nivel de potencia 1 (10 % de la potencia máxima). El extracto fue concentrado a presión reducida y sometido a limpieza (Sección 2.1.2.1.1).

2.1.2.4 Extracción de alcaloides con modificación del pH de la matriz.

Se aplicaron los procedimientos de extracción descritos en los Numerales 2.1.2.1 a 2.1.2.3. Para la extracción asistida por Mw, Us y la extracción Sx se ajustó el pH de la matriz, mediante el uso de la buffer de carbonato/bicarbonato a pH 8.6 (20 mL); posteriormente, se adicionó metanol (80 mL) para llevar a cabo las extracciones asistidas por Mw y Us, y 230 mL para la extracción Soxhlet.

2.2 CULTIVO EXPERIMENTAL

Para la presente investigación, se desarrolló un cultivo experimental de dos especies de *Crotalaria*, *C. retusa* y *C. nitidula*, con el fin de estudiar el efecto de diversos estados de crecimiento y condiciones de estrés ambiental sobre la producción de alcaloides en la planta.

Las plantas se sembraron en predios de la Universidad Industrial de Santander, en dos sectores (S1, Sector 1; S2, Sector 2), que presentaron variabilidad en los suelos. Las semillas se diseminaron al azar en cuatro surcos por cada era construida.

2.2.1 ANÁLISIS DE SUELOS

La caracterización de suelos, para determinación del contenido de elementos mayores y menores, se llevaron a cabo con colaboración del Laboratorio Químico de Suelos (Ciudad universitaria), adscrito a la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural departamental.

Los análisis realizados comprendieron las determinaciones de pH, textura, elementos mayores, carbono (C), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K); elementos menores, boro (B), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu) y zinc (Zn).

2.2.2 ESPECIES DE PLANTAS UTILIZADAS

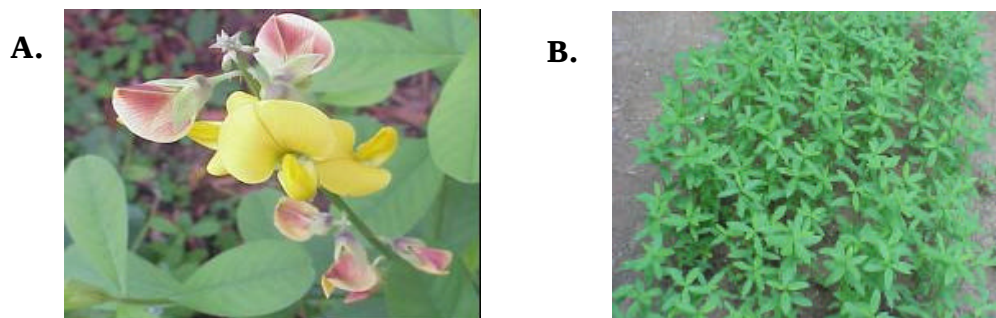
Las especies de *Crotalaria* utilizadas fueron clasificadas por el Instituto de Ciencias Naturales de Colombia (ICN), así:

Familia: Fabaceae

Especie: *Crotalaria retusa*

Crotalaria nitidula

Figura 13. Dos especies de *Crotalaria* A. *C. retusa* y B. *C. nitidula*.



2.2.3 CONDICIONES DE ESTRÉS APLICADAS SOBRE MATERIAL VEGETAL

Los tratamientos realizados en el cultivo experimental comprendieron el desarrollo de diversas condiciones de estrés, con el fin de obtener una respuesta de la planta para la producción de metabolitos secundarios, tipo alcaloide pirrolizidínico.

2.2.3.1 Estrés por herbivoría natural

Comprendió la utilización de orugas de Lepidópteros, de la familia Artidae (**Figura 14**) y Notodontidae (**Figura 15**), adaptados a la especie de *Crotalaria nitidula* y *Crotalaria retusa*, respectivamente.

Los Lepidópteros utilizados, fueron clasificados (hasta especie para la polilla 1 y familia para la polilla 2) con colaboración de la Dra. Ángela Amarillo, Entomóloga, U. Kentucky, EE.UU, así:

Familia: Arctiidae

Subfamilia: Arctiinae

Tribu: Callimorphini

Especie: *Utetheisa ornatrix* Hubner

Figura 14 Polilla 1, *Utetheisa ornatrix* Hubner.

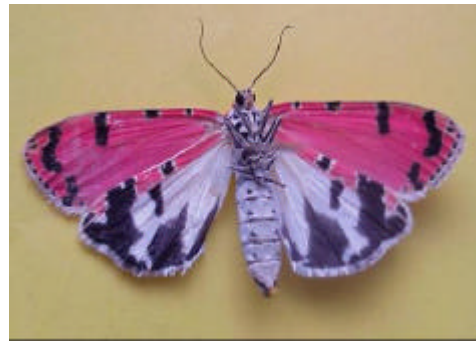
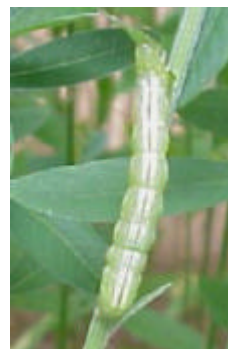


Figura 15. Polilla 2. Familia Notodontidae.



Los ejemplares fueron adquiridos en los alrededores de la ciudad de Bucaramanga, hallados en plantas silvestres de *Crotalaria*. Los Lepidópteros

se emplearon en estado de oruga, en su último periodo larval o instar, en el cual se establece su mayor tasa de herbivoría.

La tasa de herbivoría sobre la planta fue en promedio del 5 al 10%, por ubicación de cada ejemplar de oruga sobre el follaje. Las orugas desfoliaron parcialmente la planta. El material vegetal se recolectó a los diez (10) días de realizada la condición de estrés.

2.2.3.2 Estrés por herbivoría simulada

Se realizaron cortes parciales en las hojas de cada una de las especies, con una tasa promedio entre el 5 y 10%. La recolección del material vegetal se realizó a los diez (10) días de establecida la condición de estrés.

2.2.3.3 Estrés hídrico

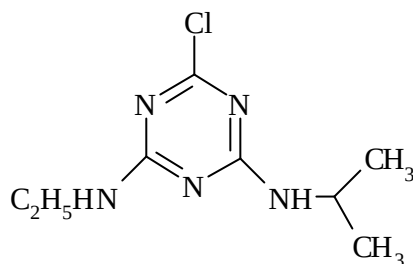
Fue realizado cuando las condiciones ambientales así lo permitían, por espacio de 2 a 3 semanas en ausencia parcial de agua, evitando la muerte de la planta.

2.2.3.4 Estrés por herbicidas

Se empleó un herbicida comercial del 80% de pureza, cuya base es el compuesto químico denominado Atrazina (**Figura 16**), ampliamente utilizado en el control de malezas para cultivos de sorgo. La dosis aplicada fue inferior (cuatro veces) a la recomendada ($100 \text{ mg L}^{-1}\text{m}^{-2}$), de acuerdo con las

especificaciones de aplicación del producto, con el fin de causar solo la condición de estrés, sin producir la muerte de la planta.

Figura 16. Estructura química de la Atrazina.



2.2.3.5 Blanco de estrés

Establece las mismas condiciones de iluminación (las cuales son variables para cada lote de siembra), así como el déficit de nutrientes del suelo e interacción con otros agentes bióticos. Estas plantas estuvieron parcialmente irrigadas, con el fin de evitar un estrés hídrico.

2.2.4 ANÁLISIS DE MATERIAL VEGETAL

2.2.4.1 Análisis preliminares en follaje, sin estrés ambiental.

En los extractos preliminares (sin condición de estrés) realizados al material vegetal, se utilizaron 25 a 40 g de follaje seco. Las técnicas aplicadas fueron extracciones Soxhlet, y asistida por ultrasonido y microondas. Para la extracción Soxhlet, la muestra se colocó en el cuerpo del extractor con metanol (150 mL), por 24 horas. La extracción asistida por microondas y

ultrasonido, se llevó a cabo por 5 y 60 minutos, respectivamente. Se depositó el material vegetal en un recipiente con tapa rosca. Cada extracto resultante, obtenido por ultrasonido y microondas, se sometió a filtración al vacío en embudo Buchner, y el residuo de filtrado se lavó con metanol (40 mL).

Las soluciones obtenidas por los tres métodos, se concentraron hasta un volumen aproximado de 40 mL en un rotoevaporador a presión reducida. Los extractos obtenidos se sometieron a limpieza, de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación.

2.2.4.1.1 Limpieza de los extractos de follaje.

Los extractos metanólicos se acidificaron con HCl 2N (5 mL). En este punto se retiraron pigmentos como la clorofila, por lavados sucesivos con éter etílico. Los N-óxidos presentes se redujeron con Zn metálico en polvo; la reacción de oxido-reducción se llevó a cabo por 2 horas con agitación constante. La mezcla se filtró y la solución de filtrado se ajustó a pH 8 con hidróxido de amonio (NH_4OH) concentrado (1 mL). Los alcaloides fueron extraídos con acetato de etilo (30 mL), en porciones de 5 mL por vez, previa adición de cloruro de sodio (5 g) para aumentar la eficiencia de la extracción.

La fase orgánica obtenida fue concentrada en rotoevaporador a presión reducida hasta alcanzar un volumen de 5 mL aproximadamente y bajo corriente de nitrógeno a un volumen inferior a 1 mL. Se adicionó el estándar interno (ISTD, difenilamina, 2400 ppm) (50 μL), ajustando el volumen a 1 mL con acetato de etilo; 1 μL de la solución se inyectó al HRGC/FID y al HRGC/MSD, para análisis confirmatorio de PA's.

2.2.4.2 Análisis de follaje en condiciones de estrés ambiental.

En un recipiente con tapa rosca se pesaron de 10 a 25 g de follaje seco, se adicionaron 100 mL de metanol y la mezcla se sometió a extracción asistida por radiación de microondas por espacio de 5 minutos, según determinación de las mejores condiciones para la extracción de alcaloides pirrolizidínicos (selección del método, sección 3.3.3). La solución obtenida, se concentró hasta un volumen aproximado de 40 mL, en rotoevaporador a presión reducida. El extracto se sometió a limpieza, de acuerdo con el procedimiento descrito en el numeral 2.2.4.1.1.

2.3 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

Para la identificación completa de alcaloides, se llevó a cabo su purificación y posterior caracterización mediante la utilización de las siguientes técnicas:

- Espectroscopía infrarroja (IR): los espectros se obtuvieron en un equipo NICOLET AVATAR modelo 360 FT-IR sobre pastillas de KBr (Laboratorio de Síntesis Orgánica fina, Escuela de Química, UIS).
- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono ^{13}C (RMN ^{13}C): los espectros se obtuvieron en un equipo RMN Bruker Avance de 300 MHz (Universidad de Antioquia, Departamento de Química, Medellín).
- Espectrometría de masas: los espectros se obtuvieron en un GC-MS Hewlett-Packard HP 5890A Series II/ HP MSD 5972, operado en el modo *full*

scan. Columna HP -5MS (60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μ m f.e.) (Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, UIS).

➤ Difracción de rayos X: los espectros fueron obtenidos en un difractómetro para muestras policristalinas de Rayos X, RIGAKU D-MAX-III/B (Laboratorio de Difracción de rayos X, Escuela de Química, UIS).

3 RESULTADOS

3.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

3.1.1 DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RESPUESTA.

El análisis cuantitativo se llevó a cabo empleando el método de estandarización interna, utilizando difenilamina como estándar interno. Debido a la presencia en los extractos de semillas de más de un alcaloide pirrolizidínico (de acuerdo con el análisis GC-MS), los cuales no están disponibles comercialmente, la determinación del factor de respuesta (R_f) empleó el estándar interno en diferentes concentraciones, y se calculó la pendiente de la recta asociada a la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{Área (cuentas)}}{\text{Concentración (mg/L)}} \quad \text{Ecuación 9}$$

La repetibilidad de las áreas cromatográficas y los factores de respuesta, se analizó mediante la desviación estándar (σ , Sección 1.4) y el coeficiente de variación (CV%).

$$CV \% = \frac{s}{\bar{X}} * 100 \quad \text{Ecuación 10}$$

$\bar{X}$: promedio de R_f

Las **Tablas 5 y 6** contienen los resultados de repetibilidad de los R_f y las áreas cromatográficas, respectivamente.

Tabla 5. Repetibilidad de los factores de respuesta para el estándar interno, difenilamina, determinados por GC/FID.

Concentración, mg/L	Área, cuentas	Factor de respuesta	R_f promedio	s	% CV
96	315888	3296	3300	112	3,45
	300695	3137			
	321523	3355			
192	732899	3824	3800	45	1,20
	715602	3733			
	722717	3770			
288	1151817	3999	4000	183	4,53
	1224272	4251			
	1121409	3894			
479	2099041	4380	4400	29	0,67
	2126835	4438			
	2116692	4417			

La cuantificación relativa al estándar interno, de los alcaloides pirrolizidínicos se determinó según la siguiente relación:

$$C_x = \frac{A_x}{R_f} * \frac{V_f}{W_x} \quad \text{Ecuación 11}$$

C_x : Concentración del alcaloide (mg PA/kg de semilla o follaje)

A_x : Área cromatográfica del alcaloide

R_f : Factor respuesta del estándar interno

V_f: Volumen final del extracto (L)

W_x : Peso de la muestra tomado (kg)

Tabla 6. Repetibilidad de las áreas cromatográficas a diferentes concentraciones de difenilamina (ISTD), determinado por GC/FID.

Concentración, mg/L	Área, cuentas	Área promedio	s	% CV
96	315888	310000	10774	3,45
	300695			
	321523			
192	732899	724000	8694	1,20
	715602			
	722717			
288	1151817	117000	52844	4,53
	1224272			
	1121409			
479	2099041	2110000	14065	0,67
	2126835			
	2116692			

Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación, es una estimación del error relativo que permite comparar la precisión de los resultados, las repetibilidades del R_f y de las áreas presentan valores aceptables (<5%), de acuerdo con las Buenas Practicas de Laboratorio [85].

3.2 IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La implementación del método de extracción se llevó a cabo con semillas del lote 002 de septiembre de 2002. Se utilizaron 70 g de semillas, metanol como solvente, y las técnicas de extracción Soxhlet, asistida por microondas y ultrasonido de acuerdo con lo descrito en el Numeral 2.1.2 de la Sección Experimental. Todos los extractos se analizaron utilizando el sistema HRGC/FID y como técnica confirmatoria de la presencia de alcaloides, GC/MS.

Los índices de retención de Kováts (I_k), se determinaron por comparación de los tiempos de retención con los de una mezcla patrón de hidrocarburos de C_7 a C_{18} , en columna HP-5. Los índices se compararon con los reportados en la literatura por Witte y colaboradores (Sección 1.3.2.1), utilizando igual fase estacionaria.

Se identificaron tentativamente en las semillas de *Crotalaria nitidula* 6 PA's por sus índices de retención de Kováts. Los alcaloides hallados se relacionan en la **Tabla 7**, donde aparecen iones característicos, con la identificación según bases de datos NBS75K y WILEY 138 e identificación con base en los I_k calculados, usando la literatura científica [76, 77, 79]. En los espectros de masas que se presentan en las **Figura 17, 19, 21, 23, 25 y 26**, se registraron fragmentos característicos de alcaloides pirrolizidínicos monoéster (m/z 80, 106, 111, 136, 137, 138) y diéster (m/z 80, 93, 106, 120, 136).

Tabla 7. Alcaloides aislados en *Crotalaria nitidula*.

Compuesto identificado según base de datos*	% de coincidencia con el espectro de la base de datos	Ik experimental	Identificación del compuesto según Ik [68]	Iones característicos m/z (I %)**
Retronecina	88	1499	Heliotridina(7S)/ 1495	41 (23), 53 (15), 68 (18), 80 (100), 94 (21), 111 (44), 155 (17)
9-0-Propionil retronecina	53	2096	N.D.	41 (34), 43 (61), 55 (20), 68 (16), 69 (18), 80 (100), 93 (24), 94 (32), 111 (53), 120 (21), 124 (18), 136 (21), 137 (20), 138 (12), 154 (10), 220 (12), 281 (22)
3'Acetil- licopsamina	70	2195	Licopsamina/ 2197 Intermedina / 2188	41 (20), 53 (12), 67 (13), 80 (29), 93 (100), 111 (9), 138 (69), 155 (20), 224 (5), 239 (3), 283 (1)
Interregimina	40	2397	Spartoidina/ 2400 Interregimina/ 2402	43 (62), 69 (19), 80 (32), 93 (49), 120 (83), 136 (100), 222 (7), 264 (2), 337 (3)
Senecionina	25	2497	Jacobine/ 2495	41 (11), 43 (24), 75 (17), 80 (12), 93 (21), 94 (18), 120 (100), 121 (28), 136 (29), 264 (28), 365 (1)
Jacobina	33	2499	Rindellina/ 2513	41 (40), 43 (54), 69 (20), 80 (35), 93 (62), 95 (75), 106 (19), 120 (100), 121 (62), 136 (53), 137 (44), 222 (17) 264 (3), 337 (1)

* Bases de datos utilizadas: NBS75K y WILEY 138

N.D. - No disponible

** **m/z (I %)** Relación m/z, I, % - Intensidad relativa

El compuesto con I_k 2096, no se encuentra reportado en la literatura científica [68]; la "calidad" de su identificación por comparación con espectros de masas de la base de datos fue del 53%, y correspondió a la 9-O-propionil retronecina, en cuyo espectro de masas aparecen fragmentos típicos de alcaloides monoéster insaturados.

Dentro del grupo de compuestos con base necina se hallan los estéreoisómeros retronecina y heliotridina (I_k 1499), cuyos espectros son muy similares, aunque sus índices de retención se diferencian en 30 unidades.

Figura 17. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico con I_k 1499.

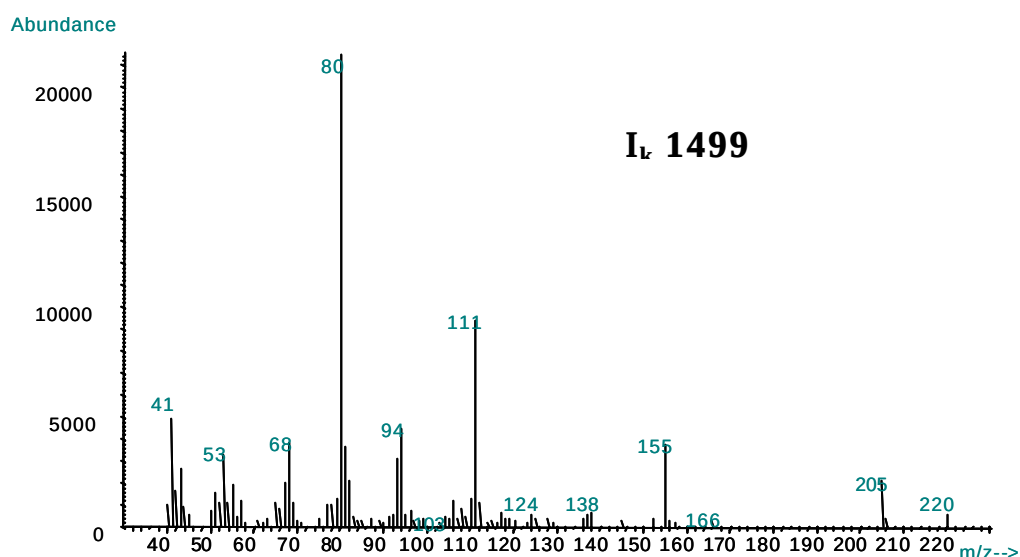
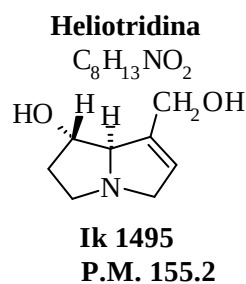
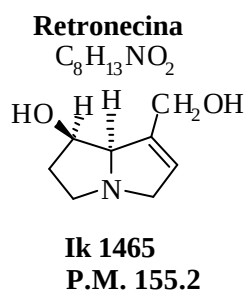


Figura 18. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con I_k 1499.



El espectro de masas de la retronecina, exhibe un pico de base en m/z 80, producto de la escisión en los carbonos 5 y 7 de la base necina, acompañada de la pérdida de un radical $\text{CH}_2\text{OH}^{\cdot}$.

Esquema 5. Formación de iones característicos en el espectro de masas de la retronecina.

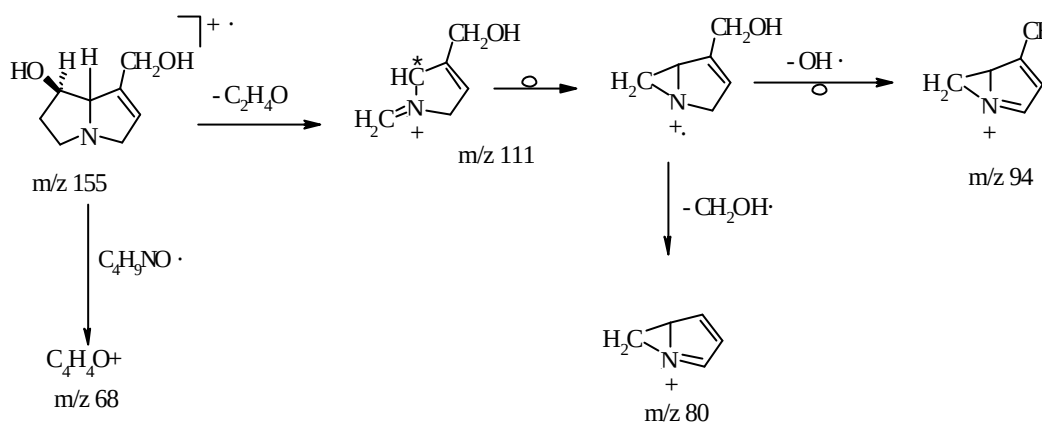
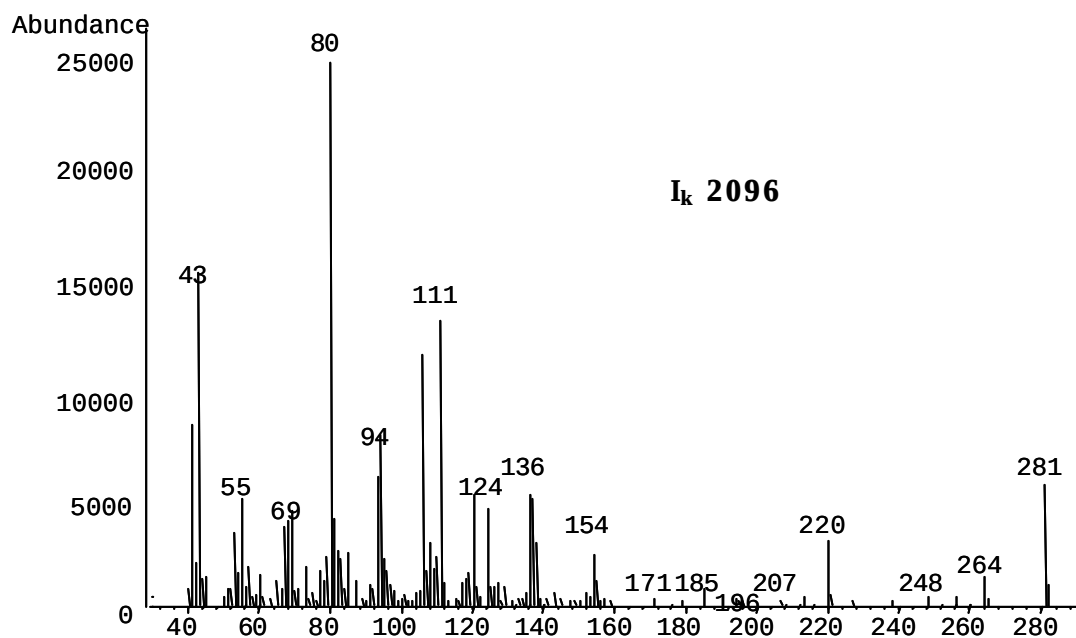


Figura 19. Espectro de masas del alcaloide pirolizidínico con I_k 2096.



En el espectro de masas de este compuesto aparecen iones en m/z 80 y 111, típicos para monoésteres sustituidos en la posición C₉, con base necina insaturada; los iones en m/z 137, 138, son productos de la ruptura en C₉-O.

La identificación realizada según la base de datos Wiley 138, establece como compuesto probable el 9-O-propionil retronecina; sin embargo, según la consulta en [84], otras posibles estructuras planteadas para este compuesto por comparación con su peso molecular (M^+ 281) y características de monoéster sustituido en C₉, a saber:

Figura 20. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con M^+ 2096.

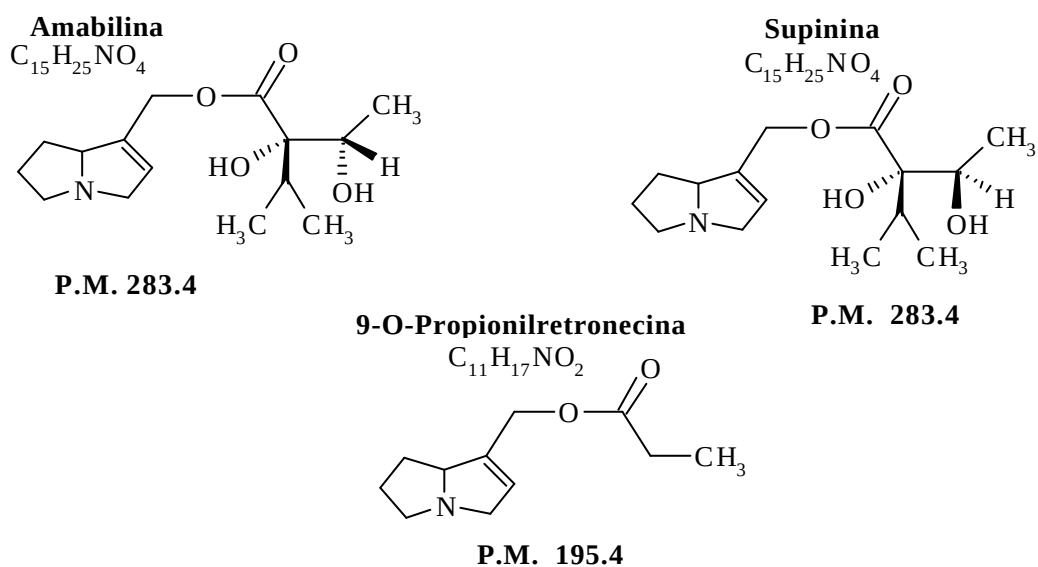
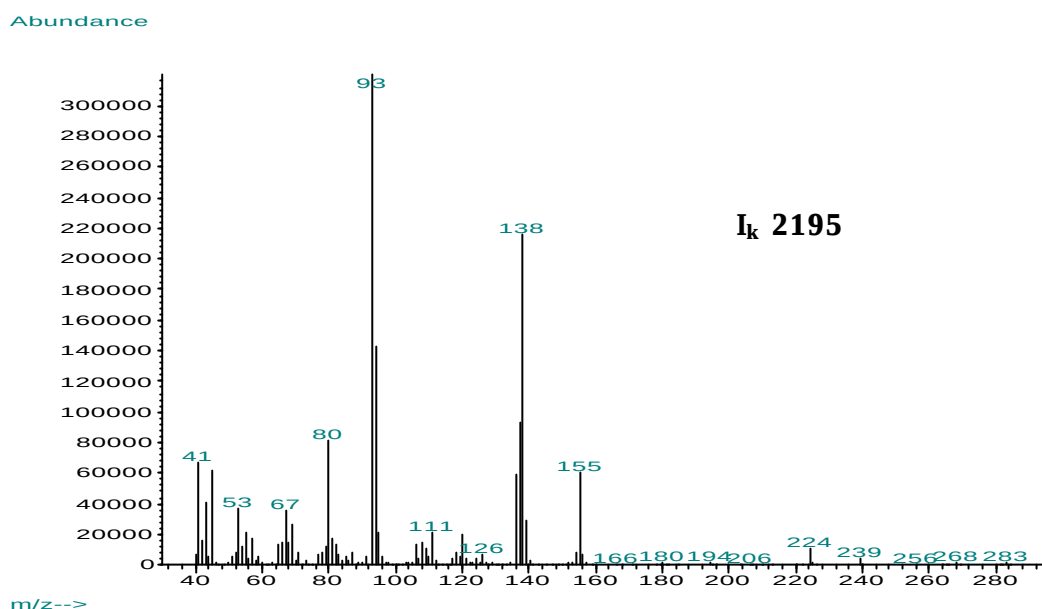
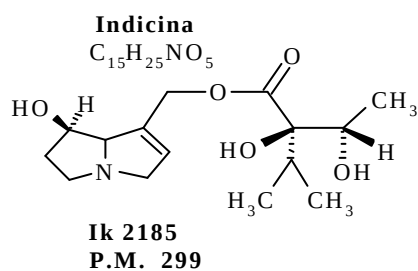
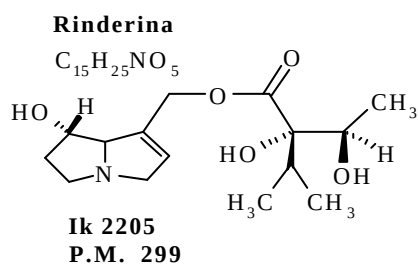
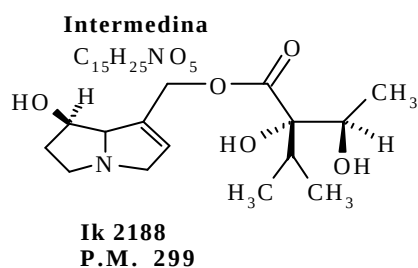
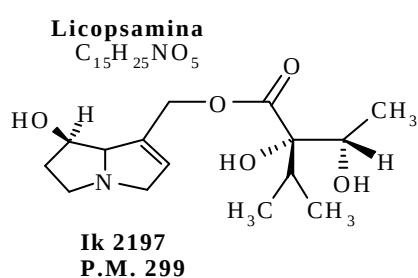


Figura 21. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico con I_k 2195.



Las posibles estructuras para el alcaloide con I_k 2195 experimental, según sus índices de retención de Kovàts [68], se presentan en la **Figura 22**.

Figura 22. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con I_k 2195 experimental



Esquema 6. Ruta de fragmentación de la licopsamina.

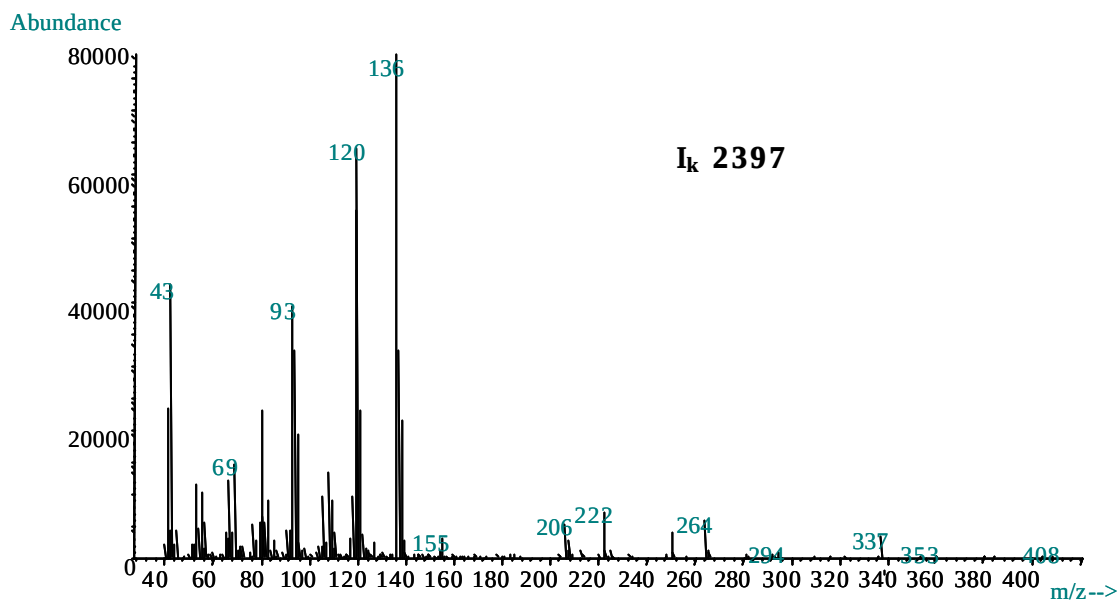
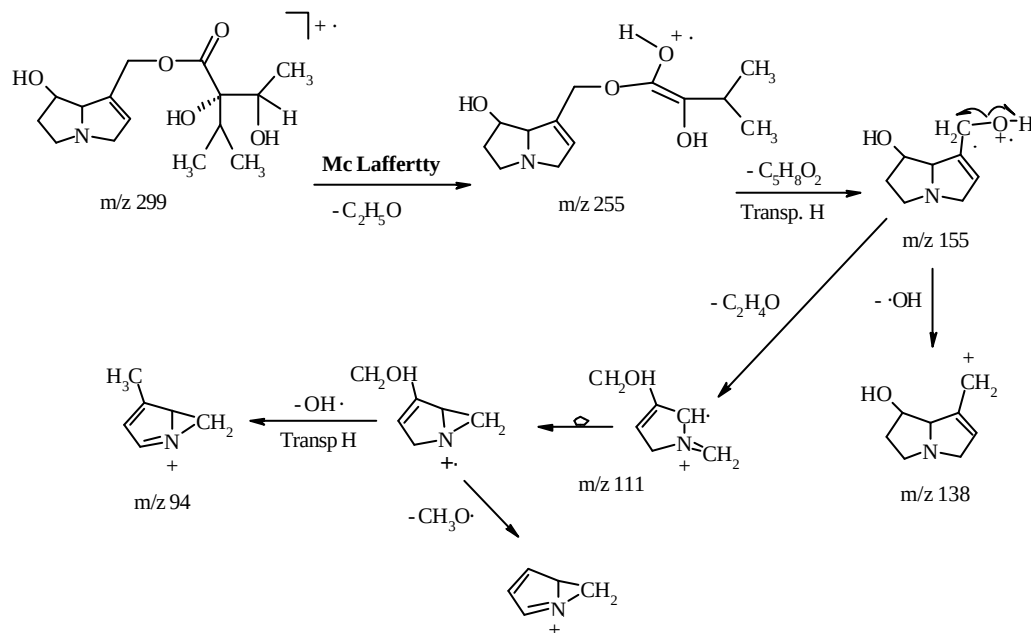


Figura 23. Espectro de masas del alcaloide pirolizidínico con I_k 2397.



Las posibles estructuras para los alcalos con I_k 2397, 2497 y 2499 experimentales, según sus índices de retención de Kováts reportados en [68], se presentan en las **Figuras 24 y 27**.

Figura 24. Posibles estructuras del alcaloide pirrolizidínico con I_k 2397 experimental.

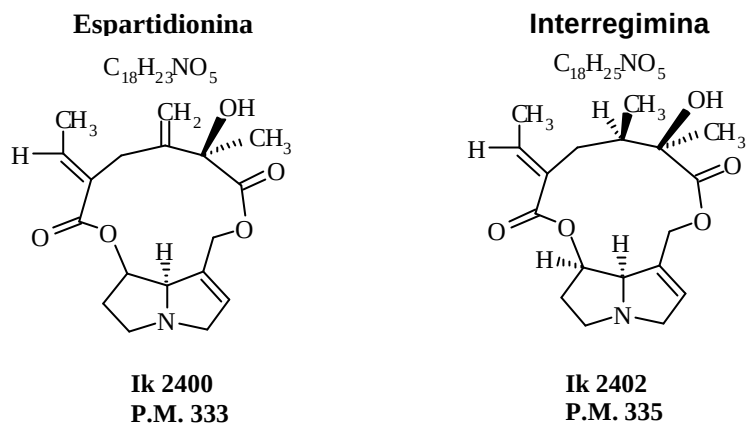


Figura 25. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico con I_k 2497.

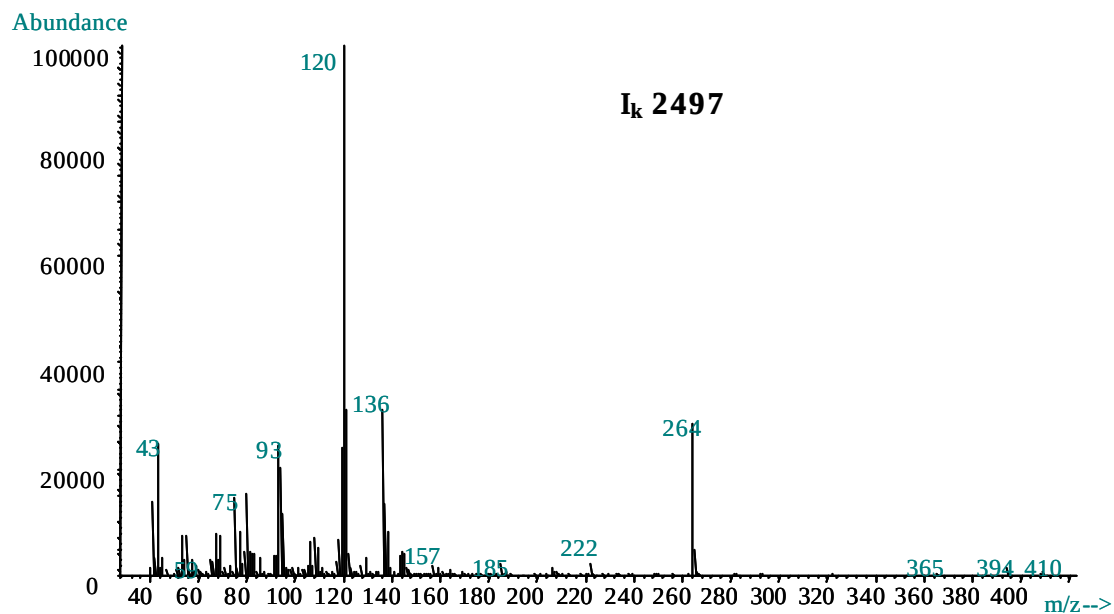


Figura 26. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico con I_k 2499.

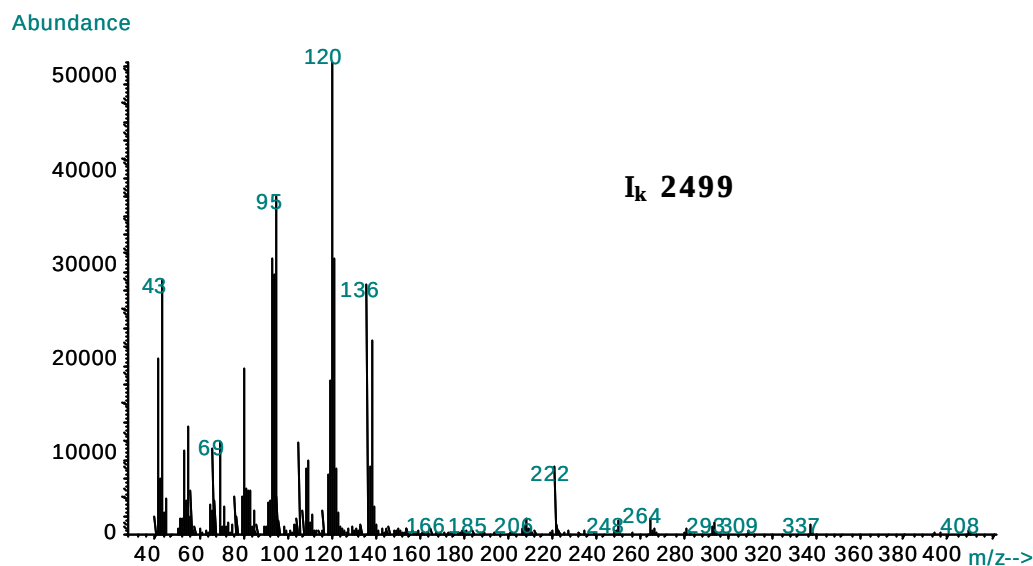
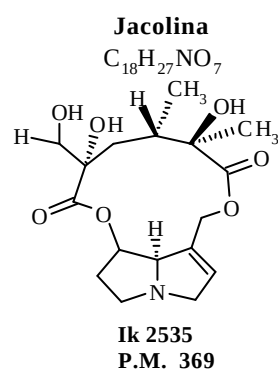
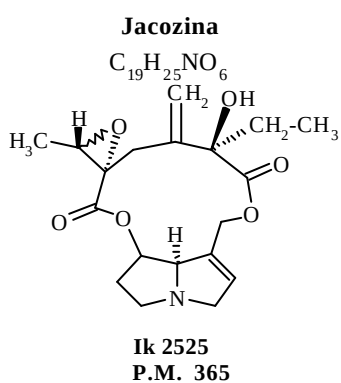
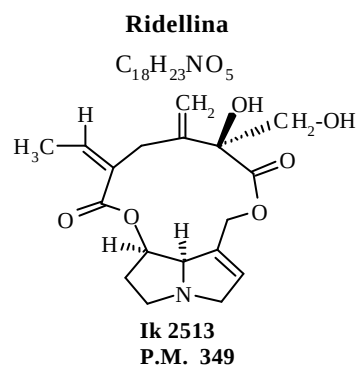
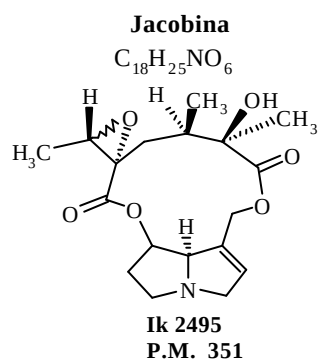


Figura 27. Posibles estructuras de alcaloides pirrolizidínicos con I_k experimentales 2497 y 2499.



Esquema 7. Esquema de fragmentación de alcaloides pirrolizidínicos diéster macrocíclicos de base necina saturada.



3.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PA'S

3.3.1 ANÁLISIS PRELIMINAR EN SEMILLAS

Se realizaron extracciones por Sx, Mw y Us de semillas de *Crotalaria nitidula* de tres lotes (002 - Septiembre /2001, 000 -Marzo/2002, 001-Julio/2002), las cuales no presentaron alcaloides pirrolizidínicos, según el análisis confirmatorio realizado por GC-MS.

Este hecho está relacionado con la calidad fitosanitaria alta de los cultivos de esta planta y por ende, de las semillas adquiridas comercialmente; los metabolitos pirrolizidínicos se forman en la planta como respuesta a una condición de estrés ambiental (Sección 1.2.4). Tan solo en semillas del lote 002 de Septiembre/2002, se halló la presencia de 6 metabolitos secundarios, tipo alcaloide. Este lote de semillas se utilizó para la implementación del método de extracción.

Previo a la extracción de alcaloides, se realizó la precipitación de proteínas con etanol, con lo cual se disminuyó considerablemente la viscosidad del extracto, permitiendo la manipulación de la muestra y su inyección al sistema cromatográfico. Los inconvenientes presentados fueron causados por la dificultad de precipitar proteínas en casos donde la cantidad de grasas es elevada, entorpeciendo la manipulación de la muestra; por tanto, el sistema de limpieza adoptado comprendió los pasos expuestos en la Sección 2.1.2.1.1.

Se descartó la utilización de la extracción con fluido supercrítico, debido a que el análisis cualitativo de los PA's por GC/MS, se llevó a cabo utilizando

70 g de semillas y por SFE tan sólo es posible analizar máximo 10 g del material. De igual manera, la extracción por sorbente sólido se anuló, por su capacidad baja para retener los analitos y alto consumo de solvente.

Este trabajo preliminar permitió determinar la importancia de la utilización de GC/MS para corroborar la presencia de PA's, de acuerdo con los patrones de fragmentación en sus espectros de masas (Sección 1.3.2.2.1). Se estableció que múltiples sustancias producidas por las plantas (en semilla y follaje), pueden eluir a igual tiempo de retención relativo y por ende poseer el mismo valor del índice de retención de Kováts.

3.3.2 ANÁLISIS DE VARIANZA

Se elaboró un diseño de 2 factores (pH y tiempo) con tres lecturas por muestra, y se aplicaron las ecuaciones presentadas en la Sección 1.4.1, de la parte teórica, para cada método de extracción utilizado, Soxhlet, asistidas por ultrasonido y radiación de microondas. Cada factor presentó dos niveles, superior e inferior, así:

Tabla 8. Niveles superior e inferior para los factores pH y tiempo

Factor	Niveles	
	Superior	Inferior
A (pH)	9	7
B (tiempo)	t	2t

Los tiempos de extracción (factor B) fueron 12 y 24 horas con Soxhlet, 5 y 10 minutos para extracción asistida por microondas y 0.5 y 1 hora con ultrasonido.

Para determinar cómo se afecta el parámetro observable "y" (concentración de PA's, mg/kg) por los factores pH y tiempo, se llevó a cabo el análisis de varianza, con base en el pico del alcaloide con I_k 2397, presente en la mayoría de los extractos realizados, cuyo espectro de masas es típico de alcaloides diéster macrocíclicos.

Las convenciones adoptadas relacionan el método de extracción (Sx, Mw, Us), tiempo (según **Tabla 8**), y por último, la modificación del pH, e.g. Sx24pH9.

Tabla 9. Valor de "y" (concentración) para las réplicas del PA (I_k 2397), según método de extracción.

	pH 7			pH 9			x.j
Us1h	2,38	1,98	1,71	0,39	0,39	0,42	1,21
Us05h	1,00	1,37	1,25	0,10	0,13	0,10	0,66
xi.	1,69	1,67	1,48	0,25	0,26	0,26	
Mw5	1,580	2,115	2,156	0,231	0,271	0,302	1,11
Mw10	1,959	1,730	1,993	0,466	0,337	-	1,30
xi.	1,77	1,92	2,07	0,35	0,30	0,30	
Sx12h	1,165	1,186	0,972	1,452	1,788	1,700	1,38
Sx24h	0,621	0,758	0,543	0	0	0	0,32
xi.	0,89	0,97	0,76	0,73	0,89	0,85	

Tabla 10. Valores promedio de concentración relativa (C_x/C_{std}) para el PA con I_k 2397.

Método	Promedio, mg PA/kg	s	CV, %
Mw10	1,9	0,14	7,55
Mw10pH9	0,40	0,09	22,86
Mw5	2,0	0,32	16,48
Mw5pH9	0,26	0,02	9,22
Sx12	1,1	0,12	10,68
Sx12pH9	1,6	0,24	14,68
Sx24	0,6	0,11	16,94
Sx24pH9	N.D.	-	-
Us05	1,2	0,19	15,61
Us05pH9	0,11	0,01	12,81
Us1	2,0	0,34	16,58
Us1pH9	0,40	0,02	4,25

N.D. No detectable

Los efectos de cada factor por separado y de las interacciones entre dos factores, según el método de extracción, se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Efecto de cada factor y de las interacciones entre dos factores.

Método	Factor A (pH)	Factor B (t)	Interacción (Q_{AB})	Error (Q_w)
	Q_A	Q_B	Q_{AB}	Q_w
Us	5,535	0,922	0,206	0,297
Mw	7,799	0,106	0,095	0,258
Sx	0,008	3,350	1,045	0,112

Tabla 12. Valor del parámetro F.

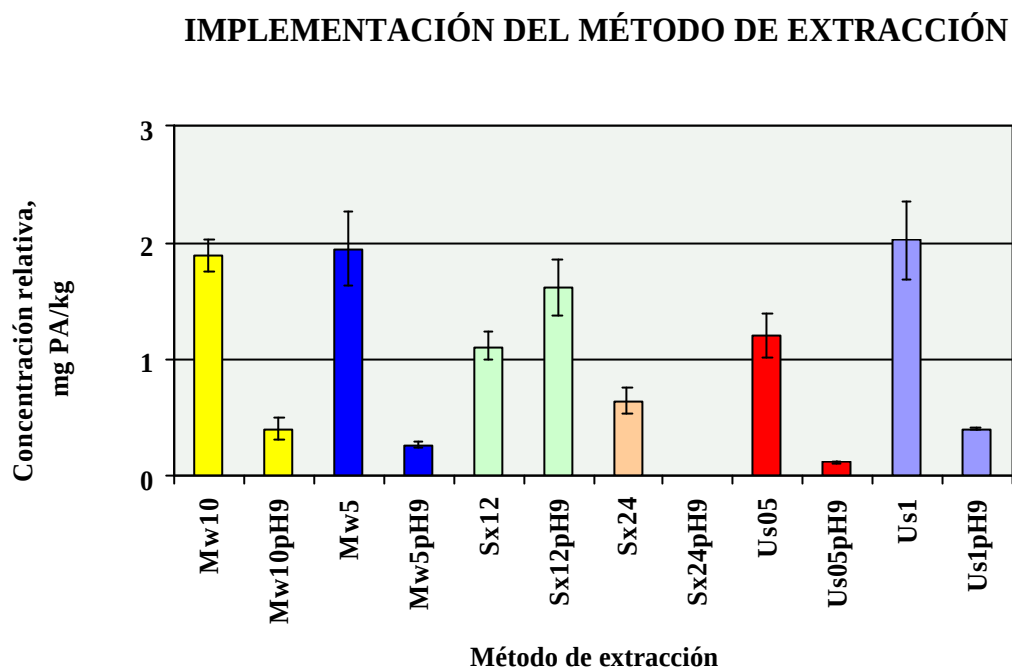
Método	Factor A (pH)	Factor B (t)	Interacción (Qab)	Valor crítico para F
	F	F	F	
Us	148,937	24,801	5,530	5,32
Mw	241,55	3,28	2,95	5,32
Sx	0,55	238,62	74,40	5,32

Los valores del parámetro F menores que sus valores críticos, permiten establecer que la influencia de dicho factor, no produce un efecto significativo sobre la variación en el observable “y” (concentración de PA’s); con lo cual la modificación del pH no altera significativamente la cantidad de alcaloide extraído por el método de extracción Soxhlet, contrariamente, a lo que sucede con los métodos de extracción asistidos por ultrasonido y microondas: este hecho se puede visualizar en la **Figura 28**.

El efecto del factor tiempo y la interacción entre factores no son significativos en el caso de la extracción asistida por radiación de microondas. Para la extracción por ultrasonido y Soxhlet, el factor tiempo y la interacción entre factores (pH y tiempo), tienen un marcado efecto sobre la extracción del alcaloide, siendo aún más significativa para el método Soxhlet.

La variabilidad de los resultados obtenidos, se percibe en la siguiente figura con sus correspondientes barras de error.

Figura 28. Variación del contenido de PA (Ik 2397), según método de extracción.



En la **Figura 28** se observa que la concentración de PA's por efecto de variación del tiempo para la extracción asistida por Mw a un mismo pH, no se altera significativamente; entre tanto, la variación del pH para un mismo tiempo sí la afecta. Para la extracción por ultrasonido, la variación del tiempo a un mismo pH, incrementa en casi un 50% el contenido de alcaloide; la variación de pH en cambio reduce drásticamente el contenido de PA, tal como lo confirma el análisis de varianza, con el cálculo del parámetro F.

Los contenidos de alcaloide, aislado tanto por Mw (a los dos tiempos) como por ultrasonido (a 1 h) sin modificación del pH son similares, con lo cual éstos dos métodos bajo las características descritas, presentan los mejores

resultados para la extracción de alcaloides; no obstante, la selección del método contempla otros parámetros que se establecen en la siguiente sección.

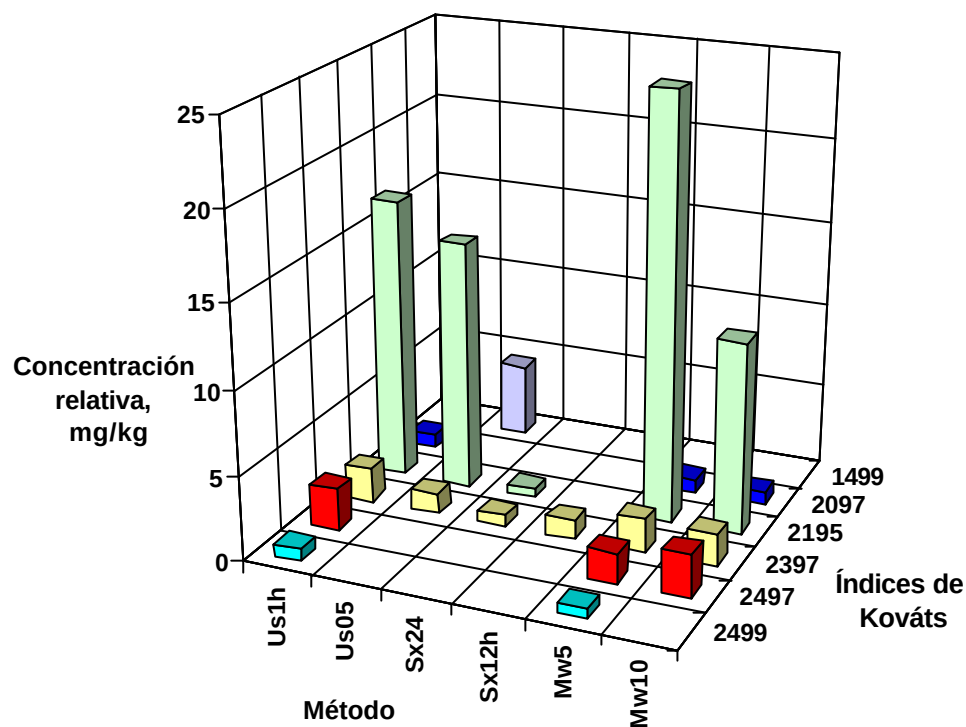
3.3.3 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PA's

La estimación de la eficiencia de la extracción de alcaloides pirrolizidínicos, utilizando diferentes métodos (con variación del pH y el tiempo de extracción), se realizó con base en el número mayor de alcaloides extraídos y la cantidad (concentración relativa) de cada uno, teniendo en cuenta, a su vez, tiempos más cortos de extracción y consumo de solvente bajo.

Como se observa en la Figura 29, existe una marcada influencia del método y del tiempo de extracción sobre el número y en cantidad de alcaloides extraídos. Por el método Soxhlet, se extraen 2 alcaloides del tipo diéster macrocíclico, en concentración relativa que no supera los 2 mg/kg; este método presenta eficiencia baja en la extracción de PA's con respecto a los métodos por ultrasonido y microondas, además de un mayor consumo de solvente (ver Sección Experimental) y tiempos más largos para llevar a cabo la extracción.

Para la extracción por Mw, la variación del tiempo establece la presencia de 5 y 4 alcaloides en tiempos de 5 y 10 minutos de extracción, respectivamente; sin embargo, la concentración relativa de los alcaloides es semejante excepto para el compuesto con I_k 2195, cuya cantidad aislada es mayor al tiempo de extracción menor.

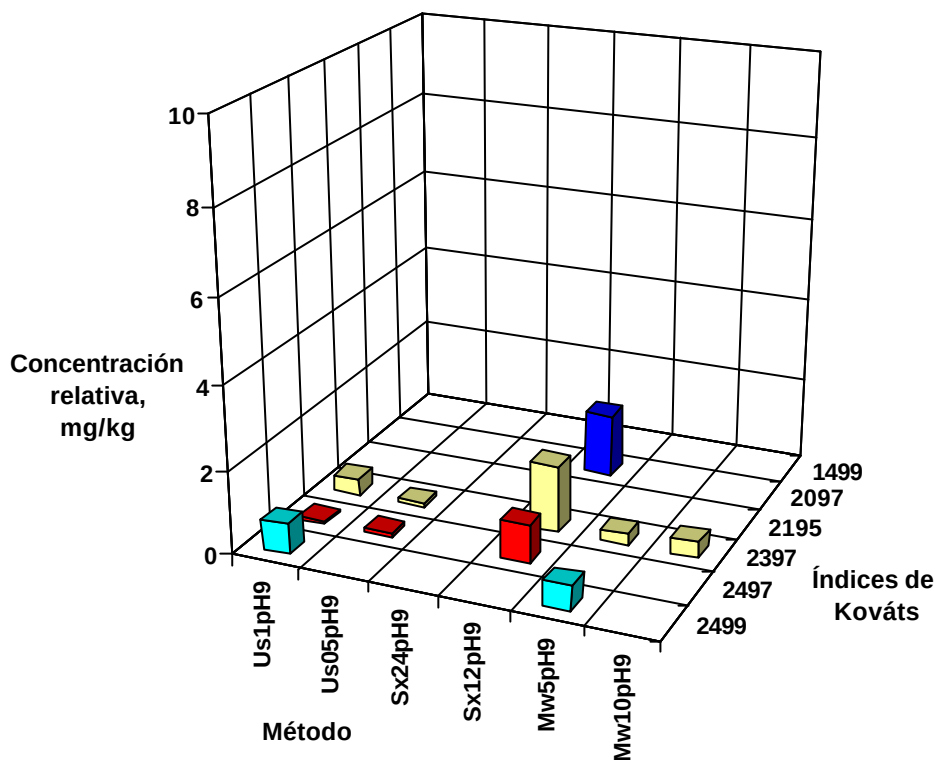
Figura 29. Eficiencia de la extracción de alcaloides pirrolizidínicos para diferentes tiempos de extracción, sin modificación de pH.



La extracción asistida por Us, presenta alta eficiencia para los tiempos de extracción más largos, permitiendo extraer igual número de alcaloides en concentraciones relativas semejantes a las obtenidas por el método de extracción por microondas.

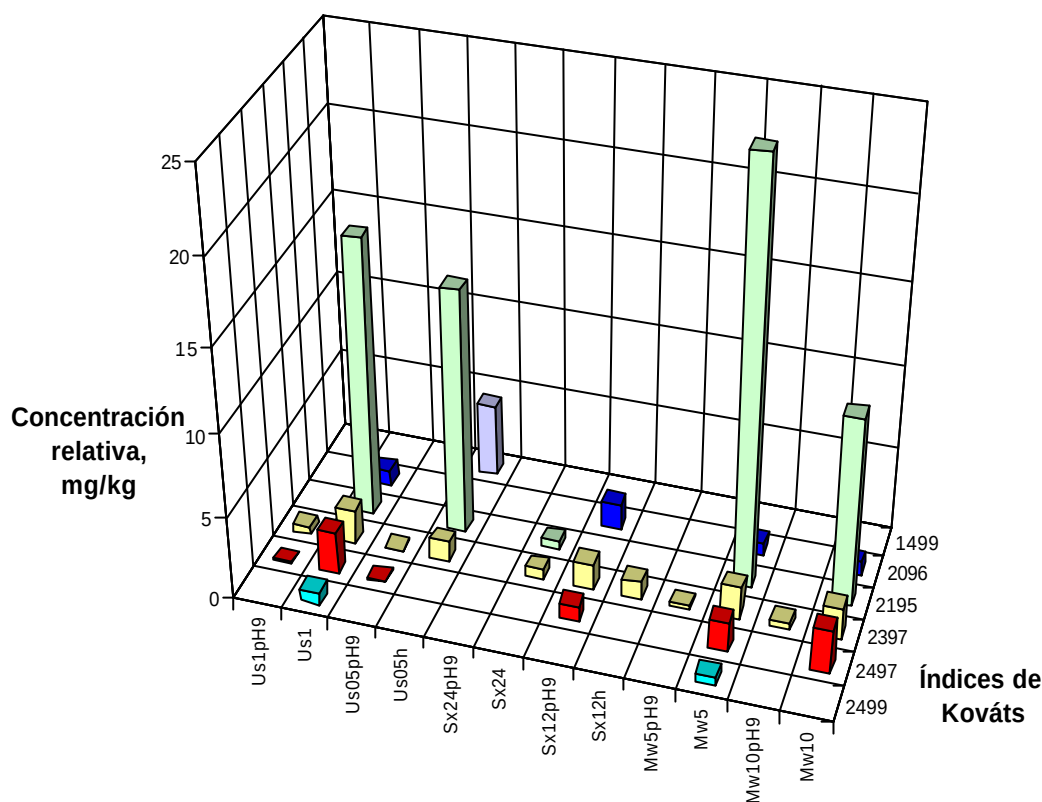
En la extracción por Us, la variación del tiempo no sólo afecta la concentración, sino el número y el tipo de PA's extraídos.

Figura 30. Eficiencia de la extracción de alcaloides pirrolizidínicos para diferentes tiempos de extracción y pH.



La eficiencia de la extracción a diferentes pH de la matriz, usando una buffer de carbonato/bicarbonato, reduce considerablemente el número y la cantidad de alcaloides pirrolizidínicos al aplicar los métodos de extracción de Mw y Us, debido a la susceptibilidad de estas estructuras a hidrólisis; sin embargo, estos procesos suceden en grupos éster, a pH altos, cuando se usan bases fuertes tipo NaOH y en el caso de material vegetal, la hidrólisis puede iniciarse en la presencia de iones de Fe^{2+} [77, 78].

Figura 31. Eficiencia de la extracción de alcaloides pirrolizidínicos.



Numerosas investigaciones han empleado la técnica de extracción Soxhlet para el aislamiento de PA's, generalmente, en periodos de 16 a 24 horas e incluso con modificación del pH de la matriz con hidróxido de amonio [65, 72, 86]. Sin embargo, la aplicación de otras técnicas de extracción, como Mw y Us a pH de la matriz, permitió establecer, que el número y la cantidad de metabolitos extraídos y detectados fue mayor. Estas técnicas emplean tiempos de extracción más cortos, cantidad de solvente menor, además, la extracción se realiza a temperaturas menores de 35 °C, lo que evita posibles modificaciones de estructuras por efecto de la temperatura.

Para el presente caso, la extracción por Us y Mw se llevó a cabo con un incremento no superior a 10 °C a la temperatura ambiente para el solvente; entre tanto, por Soxhlet se presentaron los rendimientos más bajos, ya que se trabajó a la temperatura de ebullición del solvente y periodos de tiempo prolongados.

Con base en los resultados anteriormente presentados, se establece que las mejores condiciones para la extracción del mayor número y la cantidad de alcaloides pirrolizidínicos son: ultrasonido a 1 hora (Us1h) y/o microondas a 5 minutos (Mw5) sin modificación del pH de la matriz.

3.4 CARACTERIZACIÓN DE FOLLAJE

Las plantas, objeto del presente estudio, fueron cultivadas en dos secciones (S1, S2), cuyos suelos no presentan variabilidad en su contenido de elementos mayores y menores, excepto para los contenidos de fósforo.

Ambos suelos presentan deficiencias en potasio y magnesio, elementos necesarios para el buen crecimiento de las plantas. Sin embargo, la diferencia sustancial en estos suelos radica en los contenidos de fósforo disponible, el cual es primordial en Leguminosas como la *Crotalaria* para alcanzar su etapa de madurez (floración).

Tabla 13. Caracterización de suelos.

ENSAYO	S1	S2
pH	7.8	7.7
% C	0.70	1.1
P (ppm)	1	150
Ca (meq./100g)	13.65	17.51
Mg (meq./100g)	0.90	1.20
Na (meq./100g)	0.43	0.35
K (meq./100g)	0.18	0.20
Al (meq/100g)	-	-
% Arena	70	70
% Limo	20	20
% Arcilla	10	10
*B (ppm)	0.08	0.20
*Fe (ppm)	3.8	11.1
*Mn (ppm)	0.95	3.76
*Cu (ppm)	0.17	0.58
*Zn (ppm)	0.86	3.80
CIC (meq/100g)	14	15

* Elementos menores; CIC: Capacidad de intercambio catiónico.

3.4.1 ANÁLISIS PRELIMINARES

Los extractos del material vegetal se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la Sección 2.2.4.1, a los lotes de siembra presentados en la **Tabla 14**.

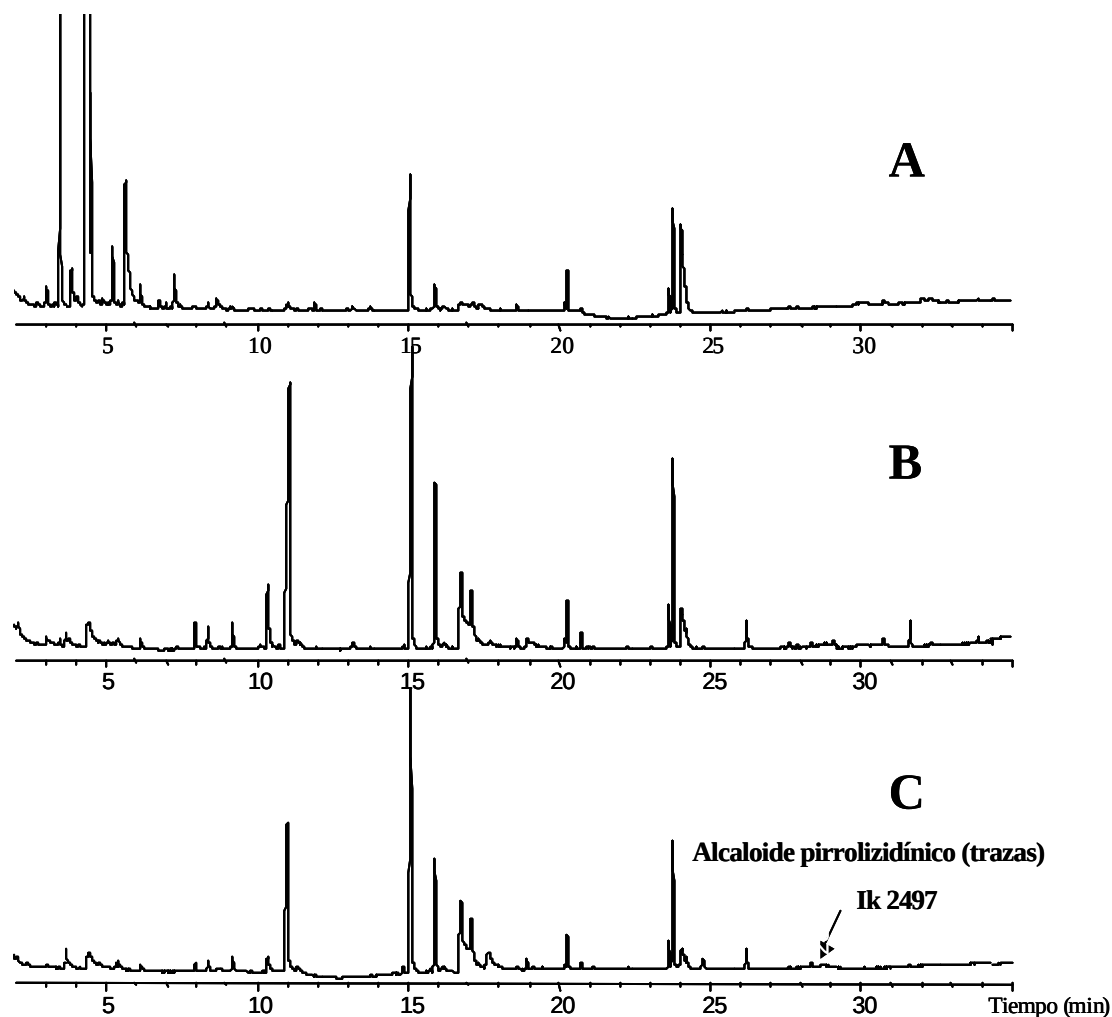
En los extractos no se registraron alcaloides, excepto para la muestra de *Crotalaria retusa*, a 150 días de recolección, al inicio de la etapa de floración usando la técnica de extracción asistida por microondas (**Figura 32**), donde se detectó un alcaloide diéster macrocíclico con M_r 2497 (**Sección 3.2**). Esto demuestra que debido a que las condiciones para estos cultivos experimentales estuvieron libre de estrés ambiental o provocado (maleza, insectos, sequedad, herbicidas), la respuesta de las plantas a la producción del alcaloide fue baja.

Tabla 14. Tiempos de siembra y recolección de follaje en análisis preliminares.

Suelo	Especie	Siembra - Recolección	Tiempo de crecimiento (días)
S1	<i>C. nitidula</i>	05 marzo - 15 mayo/2002	105
S1	<i>C. retusa</i>	23 junio - 1 nov/2001	120
		23 junio/2001 - 13 feb/2002	225
		05 marzo - 18 junio/2002	105
S2	<i>C. nitidula</i>	05 dic/2001 - 23 feb/ 2002	70
		05 dic/2001 - 14 mayo/2002	150
S2	<i>C. retusa</i>	21 julio - 29 nov/2001	120
		01 sept/2001 - 23 enero/2002	135
		05 dic/2001 - 14 mayo 2002	150

El tiempo de crecimiento se estableció desde la aparición de la plántula.

Figura 32. Cromatogramas típicos para evaluar el contenido del alcaloide en 40 g de follaje de *Crotalaria retusa*, a 150 días de crecimiento, inyección *splitless*. FID.



A- Extracción por Soxhlet (24 h)

B- Extracción asistida por ultrasonido (1 h)

C- Extracción asistida por microondas (5 min).

3.4.2 CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL

Es conocido que los alcaloides pirrolizidínicos juegan un rol importante y cumplen funciones ecoquímicas en plantas de las especies de *Senecio*, *Crotalaria* y *Ligularia*; la interacción más ampliamente aceptada comprende la

relación “planta-insecto herbívoro”. Las plantas han desarrollado mecanismos de detoxificación a estos metabolitos secundarios empleándolos para sus propios mecanismos de defensa [39].

También se pueden considerar otras formas de estrés ambiental para la síntesis de estos alcaloides por parte de las plantas, con lo cual fue necesario evaluar en qué condiciones la planta produce en mayor proporción estas sustancias.

Se aplicaron las condiciones de estrés descritas en la Sección 2.2.3 (estrés hídrico, por herbivoría, herbivoría simulada y por un herbicida) a los lotes de siembra presentados en la **Tabla 15**. Las plantas fueron recolectadas y almacenadas para su posterior análisis. Los extractos del material vegetal (follaje y raíces) se realizaron por Mw a un tiempo de 5 minutos, de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.2.4.2**.

Tabla 15. Tiempos de siembra y recolección de follaje en condiciones de estrés ambiental.

Suelo	Especie	Siembra - recolección	Tiempo de crecimiento (días)	Tipo de estrés
S1	<i>C. nitidula</i>	1 sept. - 11 nov/2002	70	Herbivoría simulada
S1	<i>C. retusa</i>	2 sept. - 11 nov/2002	70	Herbivoría simulada
S1	<i>C. nitidula</i>	8 sept. - 17 dic./2002	97	Estrés por herbicida
S1	<i>C. retusa</i>	1 sept. - 17 dic/2002.	103	Herbivoría simulada
S2	<i>C. nitidula</i>	24 mayo - 8 ago/2002	70	Herbivoría natural, Estrés hídrico
S2	<i>C. retusa</i>	25 mayo - 8 ago/2002	70	Herbivoría natural, Estrés hídrico
S2	<i>C. nitidula</i>	22 ago- 4 nov/2002	70	Herbivoría simulada
S2	<i>C. retusa</i>	22 ago - 4 nov/2002	70	Herbivoría simulada

* El tiempo de crecimiento se estableció desde la aparición de la plántula.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el detector de ionización en llama, en el cual se corrieron las réplicas de los extractos. La identificación de los alcaloides se realizó con base en sus índices de Kovàts y los espectros de masas.

La cantidad de muestra para el análisis de las raíces de las plantas en cada condición de estrés fue baja. Por esto, los datos en este punto no presentan réplicas.

Tabla 16. Variación del contenido de PA's en *Crotalarias*, bajo diversas condiciones de estrés.

Muestra/ Tipo de estrés	Alcaloide, I_k	X mg PA /kg muestra	Desviación estándar, s	CV%
<i>C.nitidula</i> Herbivoría (follaje)	2195	1,72	0,07	4,11
<i>C. retusa</i>	1890	27	2,32	8,75
Herbivoría	2195	8	1,47	18,10
(follaje)	2200	6	1,23	19,30
	2299	3,3	0,76	22,96
	2395	8,3	0,84	10,19
	2397	11,7	0,26	2,20
	2399	57	2,88	5,00
<i>C. retusa</i>	1890	24	2,94	12,31
Hídrico	2195	9	1,55	17,52
(follaje)	2200	2,3	0,13	5,68
	2299	3,1	0,88	28,41
	2395	2,4	0,48	19,80
	2397	4	1,05	27,64
	2399	20,00	0,07	0,36

Continuación **Tabla 16.**

Muestra/ Tipo de estrés	Alcaloide, I_k	X mg PA /kg muestra	Desviación estándar, s	CV%
<i>C. retusa</i>	1890	25	-	-
Herbivoría	2197	32	-	-
(raíces)	2499	1	-	-
<i>C. retusa</i>	1890	21	-	-
Hídrico	2197	18	-	-
(raíces)	2200	6	-	-
	2395	32	-	-
	2499	2	-	-

La presencia del indol es característica de los extractos de *Crotalaria retusa*, las dos condiciones de estrés para la producción de PA's con mayor incidencia fueron herbivoría y estrés hídrico [Figura 33] a diferencia de las demás condiciones de estrés aplicadas.

Los análisis por GC/MS de follaje y raíces permitieron registrar la presencia de alcaloides pirrolizidínicos adicionales a los ya descritos en la Sección 3.3.1. Los patrones de fragmentación fueron similares y característicos para diéster macrocíclicos, presentando ligeras diferencias con los alcaloides presentes en semillas de *Crotalaria nitidula* (semillas utilizadas en la implementación del método de extracción) con similar valor de I_k. Con esto se observó la gran cantidad de alcaloides pirrolizidínicos producidos por las dos especies de *Crotalaria*, cuya identificación inequívoca fue difícil de establecer.

Figura 33. Cromatogramas típicos de extractos de follaje de *Crotalaria retusa*, obtenidos por extracción asistida por radiación de microondas. MSD. A. Estrés por herbivoría. B. Estrés hídrico.

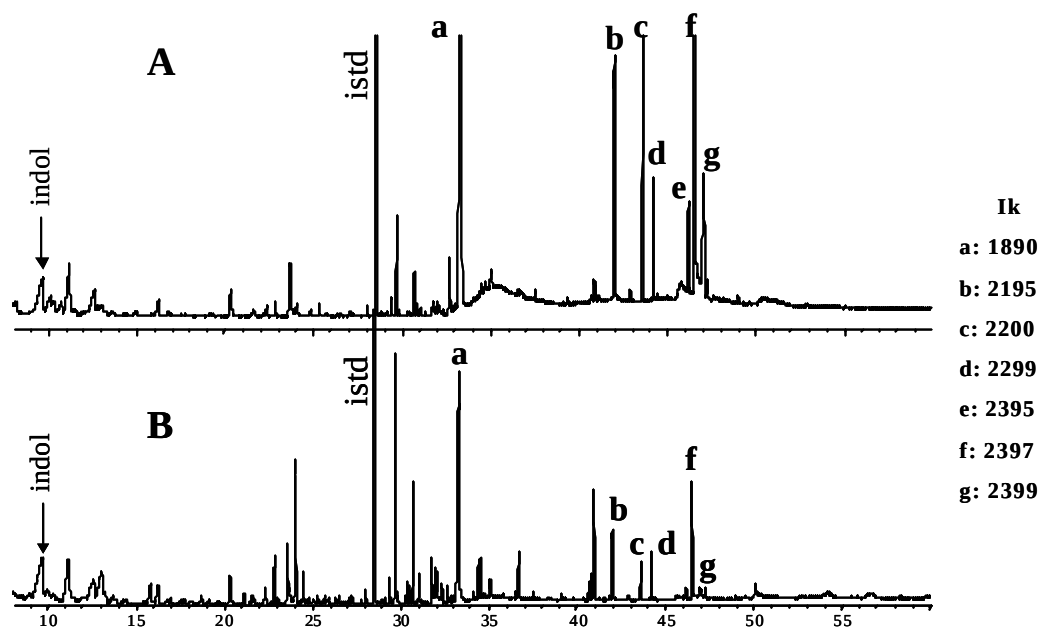
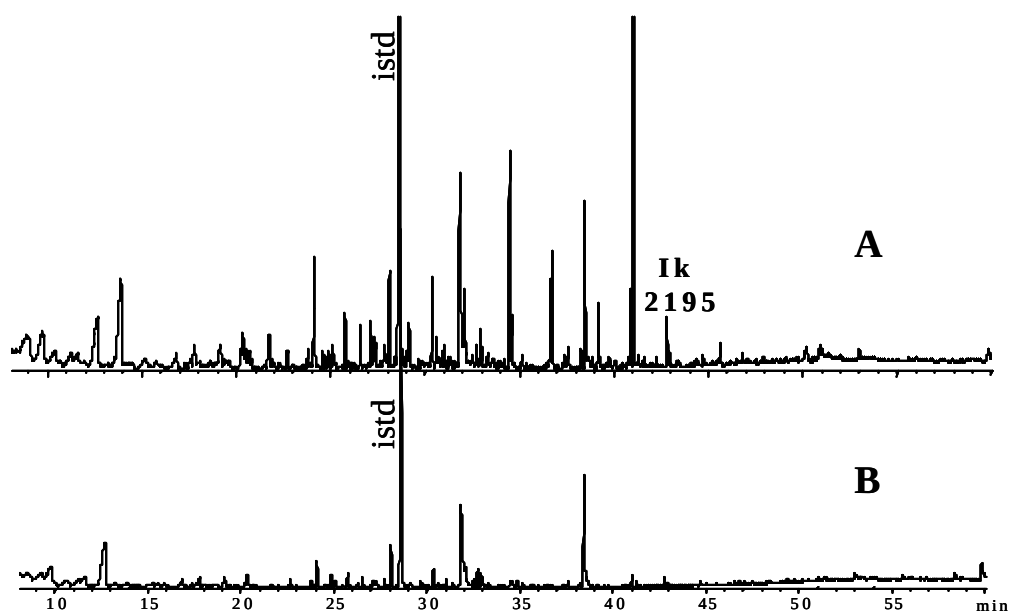


Figura 34. Cromatogramas típicos de extractos de follaje de *Crotalaria nitidula*, obtenidos por extracción asistida por radiación de microondas. MSD. A. Estrés por herbivoría; B. Estrés hídrico.

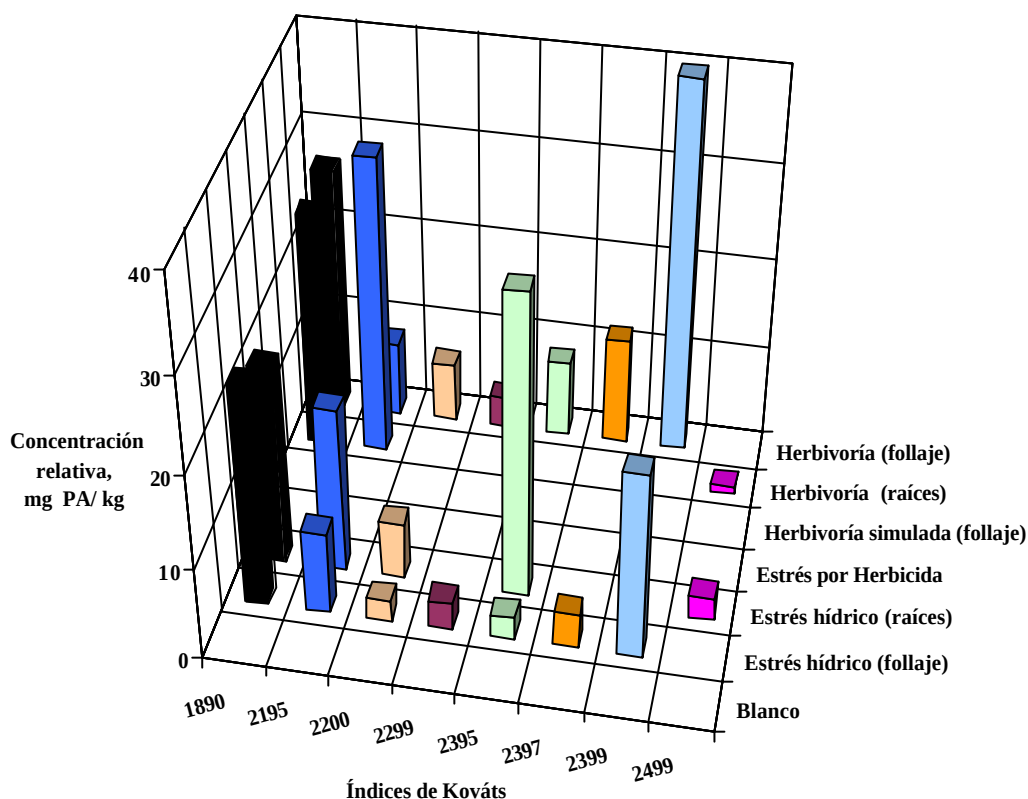


Por GC/MS se determinó la presencia de un solo alcaloide pirrolizidínico (con I_k 2195) para la *Crotalaria nitidula* (**Figura 34**) a condición de estrés por herbivoría, a diferencia de la *Crotalaria retusa*, para la cual se encontraron 8 alcaloides pirrolizidínicos totales en follaje y raíces (**Figura 33**). Los espectros de masas de los alcaloides con I_k 1890, 2195, 2200, 2299, 2395, 2397, 2399 y 2499, se presentan en el **Anexo I**.

La distribución de alcaloides en follaje y raíces de *Crotalaria retusa*, fue variable en la planta (**Figura 35**). Para la condición de estrés por herbivoría se hallaron 7 alcaloides en follaje y 3 en raíces, presentándose mayores niveles de los alcaloides en el follaje, concordante con la teoría de "defensa química" (Sección 1.2.4) al ser más útiles estos metabolitos para la planta en la protección del material vegetal, como agentes anti-alimentarios.

De igual forma, se encontraron 8 alcaloides totales en la condición de estrés hídrico para la *Crotalaria retusa*, 7 alcaloides en follaje y 5 en raíces (**Figura 35**). Para esta especie de *Crotalaria* se detectó un mayor número de alcaloides en las raíces durante el estrés hídrico respecto a la herbivoría. Según Ramos y colaboradores [17], los alcaloides son necesarios como reserva de nitrógeno, en el caso de la activación del proceso para la formación de nuevas hojas por pérdida o renovación de follaje.

Figura 35. Variación en la composición de PA's en *Crotalaria retusa* según condiciones de estrés.



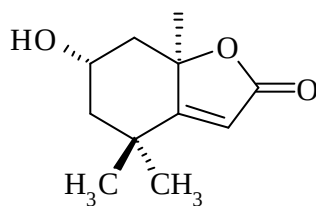
En resumen, las diferencias en el número y la concentración de los alcaloides estuvieron relacionadas con las especies de orugas utilizadas para el estrés por herbivoría y la especie de la planta (*C. retusa* y *C. nitidula*); así mismo, aunque la condición de estrés hídrico tiene menor incidencia, respecto a la herbivoría en la *C. retusa*, también conduce a la producción de PA's.

En la **Figura 35** se observa, que las condiciones de estrés por herbivoría simulada, así como la acción del herbicida Atrazina, no tienen incidencia sobre la producción de metabolitos tipo PA's por la planta. De igual forma, para los blancos de plantas no se detectaron alcaloides, con lo cual la condición de

estrés nutricional (elementos mayores y menores en el suelo) no tiene efecto en la producción de estos metabolitos.

Sin embargo, a pesar de no hallarse PA's en los extractos del blanco, de herbivoría simulada y estrés por herbicida, si se determinó por GC/MS la presencia de un terpeno denominado loliolida (**Figura 36**). Este compuesto, según literatura [87] es un metabolito secundario de tipo carotenoide, aislado en plantas acuáticas y algas marinas, el cual posee actividad inhibitoria en la germinación y actividad antirepelente.

Figura 36. Estructura química de la loliolida.



3.5 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EN CROTALARIAS

Los alcaloides fueron aislados en semillas de dos especies, *Crotalaria retusa* y *Crotalaria nitens*, respectivamente (Clasificadas por el Instituto de Ciencias Naturales de Colombia), esta última especie fue adquirida en los alrededores del plano metropolitano de Bucaramanga, la cual es una especie de amplia difusión en la zona.

3.5.1 Alcaloide en semillas de *Crotalaria retusa*

El alcaloide de *Crotalaria retusa* fue extraído mediante procedimiento Soxhlet, trabajo previo a la implementación del método de extracción, al ser ésta una técnica de extracción de amplia aceptación.

La separación y elución por cromatografía en columna del extracto obtenido, se llevó a cabo mediante el uso de gel de sílice de 60 mallas y el sistema de solventes: n-hexano, diclorometano, mezcla de diclorometano-acetato de etilo y acetato de etilo en este orden. La purificación del alcaloide se llevó a cabo por recristalización, utilizando acetato de etilo en caliente. Su caracterización se realizó mediante IR, GC-MS, RMN ^{13}C , RMN ^1H y difracción de rayos X.

La identificación por espectrometría de masas mediante comparación con los espectros de la base de datos Wiley 138, estableció el alcaloide denominado "monocrotalina" con un grado de coincidencia del 90%. El espectro de masas posee un patrón de fragmentación similar al del compuesto con m/z 2399 (Ver

anexos) obtenido en el análisis de follaje de plantas cultivadas en condición de estrés por herbivoría, para la *Crotalaria retusa*.

Figura 37. Espectro de masas de la monocrotalina.

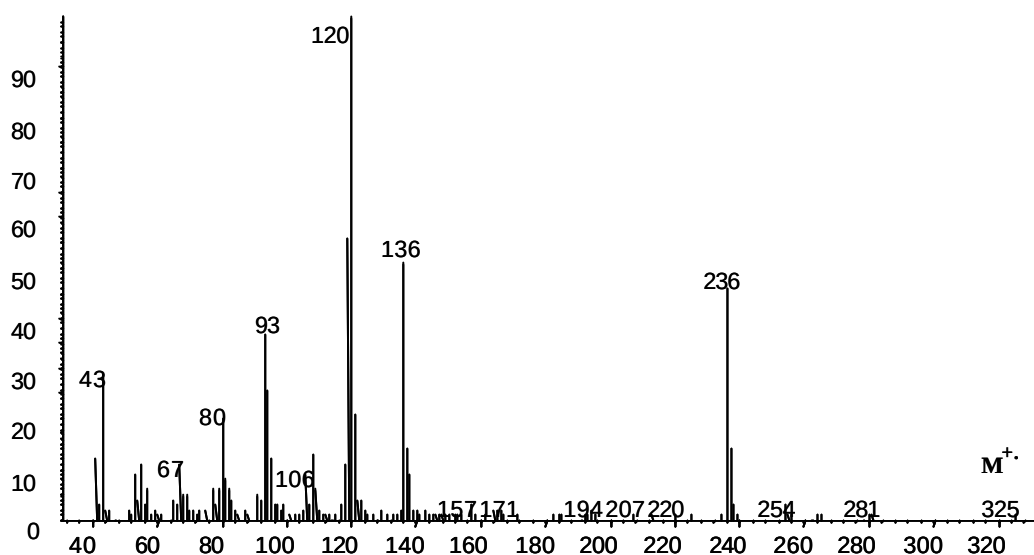
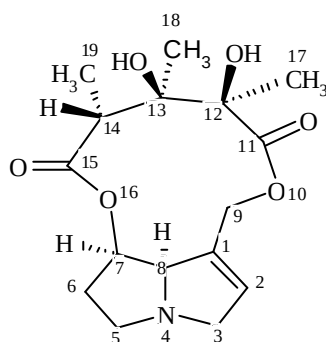


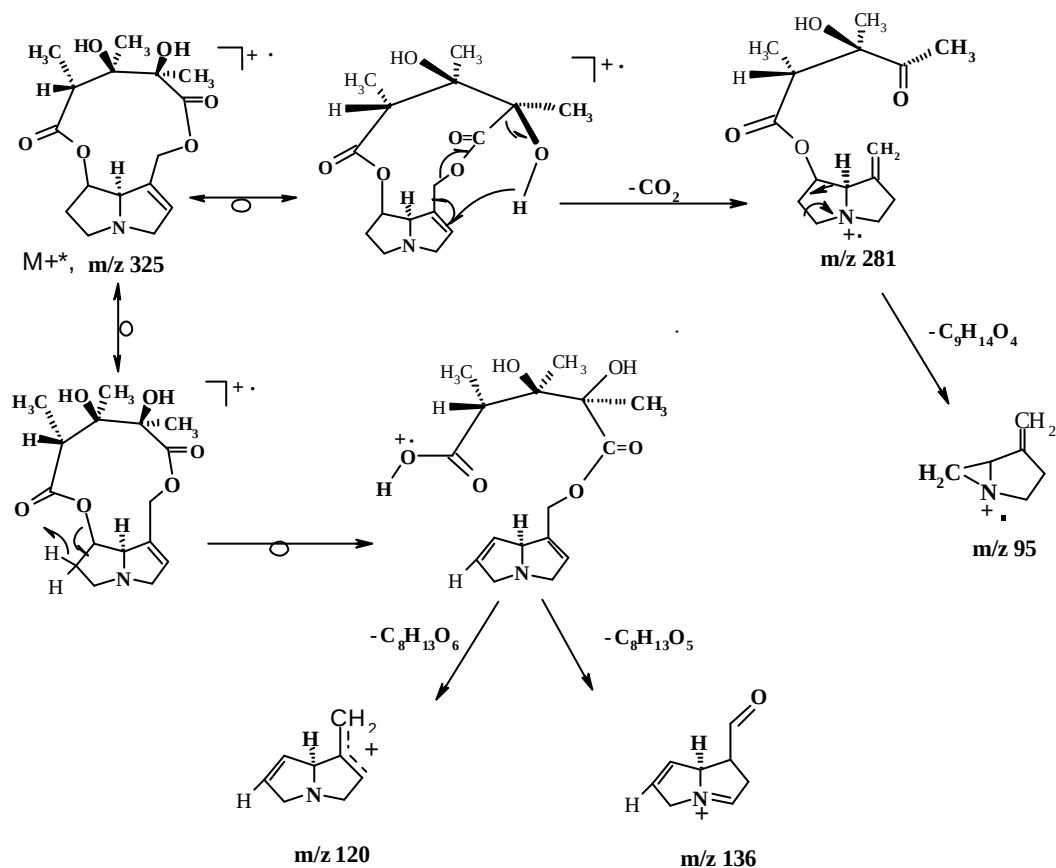
Figura 38. Estructura química de la monocrotalina.



El espectro de masas del alcaloide en semillas de *C. retusa*, presenta picos característicos en m/z 80, 93, 120, 136, típicos para alcaloides diéster. La fragmentación primaria de la molécula ocurre en el éster alílico y en el éster C_7 , acompañada de la eliminación del ácido necínico (Anc) y formación de los

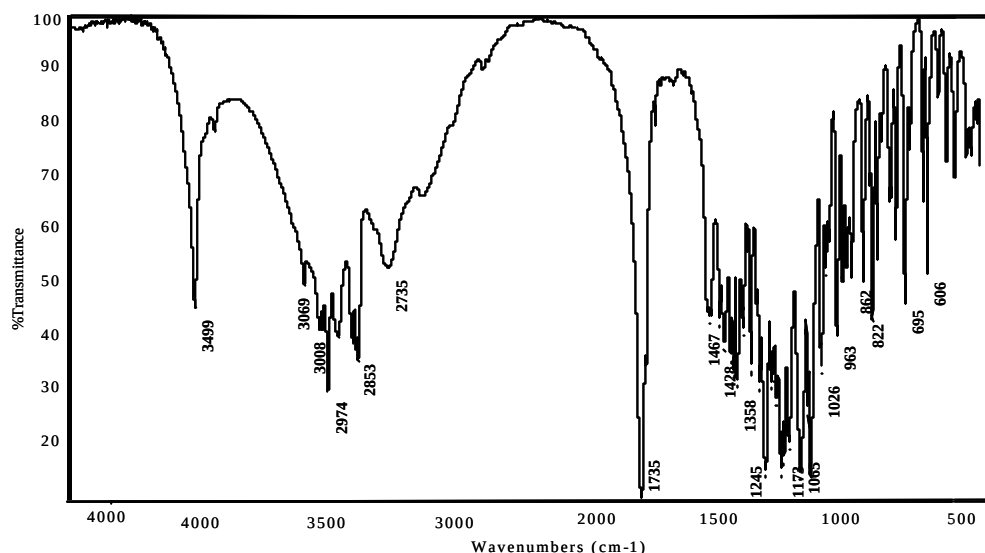
iones en m/z 136 y 120. Las posibles rutas de fragmentación de la monocrotalina se indican en la **Figura 39**.

Figura 39. Posibles rutas de fragmentación de la monocrotalina.



El espectro infrarrojo del alcaloide pirrolizidínico [Figura 40], confirma la presencia de grupos carbonilo de ésteres a 1735 cm^{-1} y de grupos OH a 3500 cm^{-1} , bandas de tensión simétrica y asimétrica de CH en grupos metilo a 2970 cm^{-1} .

Figura 40. Espectro infrarrojo del alcaloide (monocrotalina) aislado en semillas de *Crotalaria retusa*.



Un estudio estructural más detallado de este alcaloide, se realizó por espectroscopía de RMN de alta resolución. Las asignaciones de las señales químicas de los carbonos y protones se realizaron teniendo en cuenta los experimentos DEPT-135, DEPT -90, DEPT-45, COSY y MC.

El espectro de RMN ^{13}C (**Anexo 2.1**) del alcaloide pirrolizidínico confirma la presencia de 16 carbonos en la molécula, registrándose dos señales a 175 ppm correspondientes a dos tipos de grupos carbonilo.

El espectro DEPT 45 (**Anexo 2.2**) establece 11 señales para grupos CH_3 , CH_2 y CH , de las cuales 7 señales corresponden a grupos CH_3 y CH_2 a 62, 60, 54, 34, 23, 18 y 14 ppm, en comparación con el espectro DEPT 90 (**Anexo 2.2**) en el que se indica la presencia de 4 grupos CH a 135, 78, 76 y 44 ppm. Las señales químicas de los grupos CH en el PA, son consistentes con las exhibidas en los carbonos C_2 , C_7 , C_8 y C_{14} de grupos CH en la molécula de la monocrotalina (**Figura 38**).

La diferencia entre el espectro normal y el DEPT 45 estableció 5 carbonos cuaternarios a 176.7, 175.6, 134.7, 77.7 y 80 ppm; de igual forma, se relacionaron en la molécula de monocrotalina con las señales para los carbonos cuaternarios C₄, C₁₁, C₁₂, C₁₃ y C₁₅, siendo los carbonos C₁₁ y C₁₅ pertenecientes a dos grupos carbonilos.

El espectro DEPT 135 (**Anexo 2.1**) permitió distinguir entre los grupos CH₃ y CH₂, mediante el cual se confirmaron 3 señales de grupos CH₃ a 14, 18 y 23 ppm y 4 señales de grupos CH₂ a 34, 54, 60 y 62 ppm.

El espectro de correlación carbono-hidrógeno (**Anexo 2.3**), estableció las señales de los protones de grupos metilo (en C₁₉, C₁₈ y C₁₇) en el espectro de RMN ¹H a 0.9, 1.1, 1.2 ppm; la señal en 0.9 ppm aparece en forma de doblete, lo que indica la interacción a campo alto con un hidrógeno perteneciente a un carbono terciario, como se aprecia en el carbono C₄ en la estructura de la monocrotalina; este hecho se confirmó con los datos del espectro COSY (**Anexo 2.4**), en el cual se aprecia la interacción de los hidrógenos del grupo metilo a 0.9 ppm con el hidrógeno del CH en C₁₄ a 2.9 ppm.

El espectro de RMN ¹H (**Anexo 2.5**) también revela que los protones del grupo metileno en C₉ adyacente al oxígeno en O₁₀ no son equivalentes, ya que poseen características de protones AB. Los protones 9-Ha resuenan en la región de campo alto (3.6-3.8 ppm) en forma de doblete, entre tanto los protones 9-Hb resuenan a campo más alto (3.2-3.4 ppm) también en forma de doblete. Los desplazamiento químicos de los protones se corroboraron con ayuda del espectro COSY, en donde se observa la correlación entre los protones 9Ha/9Hb.

Los protones del grupo metileno en C₅ (2.4-2.6 ppm) resuenan a campo más bajo que C₆ (1.75 -1.95 ppm) debido al efecto electroatrayente del nitrógeno. Sin embargo, los protones en C₉ resuenan en la región de campo aún más bajo, que en C₅ y C₆, por el mayor efecto electroatrayente del oxígeno O₉, que causa la desprotección del entorno electrónico de los protones del CH₂. Los desplazamientos químicos (δ, ppm) de los hidrógenos en el espectro de RMN ¹H se presentan en la **Tabla 18**.

Los valores de las señales químicas por RMN ¹³C para el alcaloide aislado respecto a los establecidos en literatura [75] se relacionan en la **Tabla 17**.

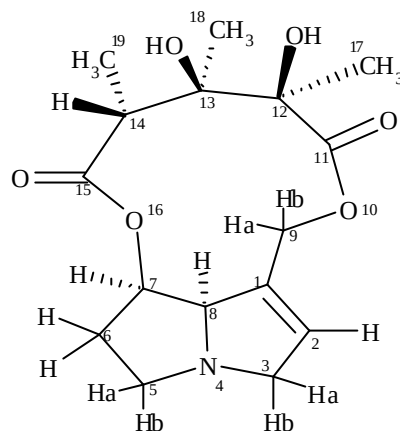
Tabla 17. Señales químicas por RMN ¹³C para el alcaloide aislado en semillas de *Crotalaria retusa*.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉
T.*	132.3	134,2	60,4	53,7	33.5	75	76,8	61,9	175	78,6	77,7	44.2	174,3	22.4	18,2	14,3
Exp**.	134.7	135.9	60,3	54,8	34.5	76	78,6	62,3	176.7	78.6	77.8	44.5	175,6	23,0	18,6	14,6
M-Nox	131.7	134.1	78.8	69.2	33.8	74.8	96.6	62.0	178.4	78.8	80.5	44.9	177.1	23.7	19.7	15.6

M-Nox: Monocrotalina N-óxido, T: Señal de la monocrotalina según literatura en * CDCl₃, Exp**: experimental en CD₃OD.

Comparando las señales químicas obtenidas en el espectro RMN¹³C del alcaloide aislado, con las reportadas en literatura [75], se establecieron diferencias pequeñas, teniendo en cuenta que sus espectros se obtuvieron en solventes deuterados diferentes (CDCl₃ y CD₃OD). Las señales químicas reportadas para un alcaloide pirrolizidínico de estructura similar, la monocrotalina N-óxido, se observaron marcadas diferencias en los carbonos C₃, C₅ y C₈.

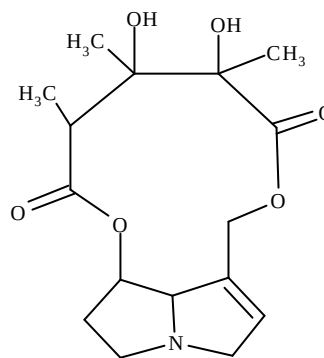
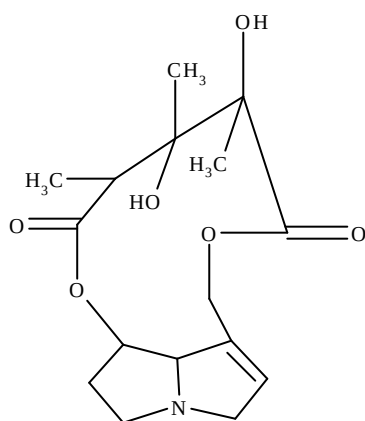
Tabla 18. Desplazamientos químicos (δ, ppm) de los hidrógenos en el espectro de RMN ¹H del alcaloide aislado en semillas de *Crotalaria retusa*.



2	3a	3b	5a	5b	6	7
5.88 (s)	3.30	3.66	2.47	2.97	1.82	4.91
	(dd, J = 16.21 Hz)	(dd, J = 16.18, 5.07 Hz)	(C, J = 3.02 Hz)	(m, J = 3.15, 6.35 Hz)	(m, J = 4.51, 1.95 Hz)	(m, J = 4.91, 5.30, 1.77 Hz)
8	9a	9b	14	17	18	19
4.20	4.36	4.58	2.87	1.21	1.14	0.98
(m, J = 2.14 Hz)	(d, J = 11.72 Hz)	(d, J = 9.59 Hz)	(C, J = 7.18 Hz)	(s)	(s)	(d, J = 7.19 Hz)

Por último la confirmación de la estructura del alcaloide se realizó por difracción de rayos X. El compuesto presentó el grupo espacial (P212121) y las constantes de celda a:10.16, b:11.44 y c:13.63. La búsqueda en la base de *Cambridge Crystallographic Data*, estableció dos posibles estructuras para el alcaloide denominado monocrotalina, las cuales presentan isomería conformacional así:

Figura 41. Posibles estructuras por DRX para el alcaloide denominado monocrotalina.



Reference Wang Shoudao, Sci.Sin. 24,497,1981

Formula $C_{18}H_{23}NO_6$

Space Group: P212121 Cell: a 13.578 b 11.433 c 10.153

R-Factor (%) 0.0 Temperature (K): 295 Density(g/cm3): 1.371

Reference Wang Shoudao, Kexue Tongbao (in Chinese), 23,670,1978

Formula $C_{18}H_{23}NO_6$

Space Group: P212121 Cell: a 13.578 b 11.433 c 10.153

R-Factor (%) 7.6 Temperature (K): 295 Density(g/cm3): 1.271

La caracterización completa de este alcaloide, estableció su identificación como monocrotalina, el cual es un compuesto tóxico con un LD₅₀ 75 mg/kg [8].

3.5.2 Alcaloides en semillas de *Crotalaria nitens*

Los alcaloides de *Crotalaria nitens* fueron aislados de semillas por extracción asistida por la radiación de microondas a un tiempo de 5 minutos en metanol, según el procedimiento establecido en la Sección 2.1.2.3. En el extracto se detectó la presencia de dos alcaloides (A y B) tipo diéster macrocíclico de base necina insaturada, su separación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna con fase estacionaria de alúmina neutra, con solventes: n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y mezcla de acetato de etilo-metanol respectivamente

El alcaloide A fue eluido en columna cromatográfica de alúmina con solventes, acetato de etilo:metanol en relación 9/1. El alcaloide B fue purificado en placa preparativa de gel de sílice. Los alcaloides presentaron apariencia de sólidos amorfos, color marrón. Las cantidades obtenidas fueron de 10 y 8 mg, respectivamente; su caracterización se llevó a cabo mediante IR y GC-MS, puesto que las cantidades tan bajas no permitían su caracterización estructural por resonancia magnética nuclear.

Los espectros IR de estos dos alcaloides (**Figuras 42 y 43**) presentan bandas de absorción similares. La presencia de grupos funcionales se estableció a través de la observación de las bandas de tensión simétrica y asimétrica de CH de grupos metilo (2970 cm^{-1}), las bandas características que indican la presencia de grupos carbonilo de ésteres a 1735 cm^{-1} y de grupos OH a 3500 cm^{-1} con banda confirmatoria entre $1305\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$.

Figura 42. Espectro infrarrojo de alcaloide "A", aislado de *Crotalaria nitens*.

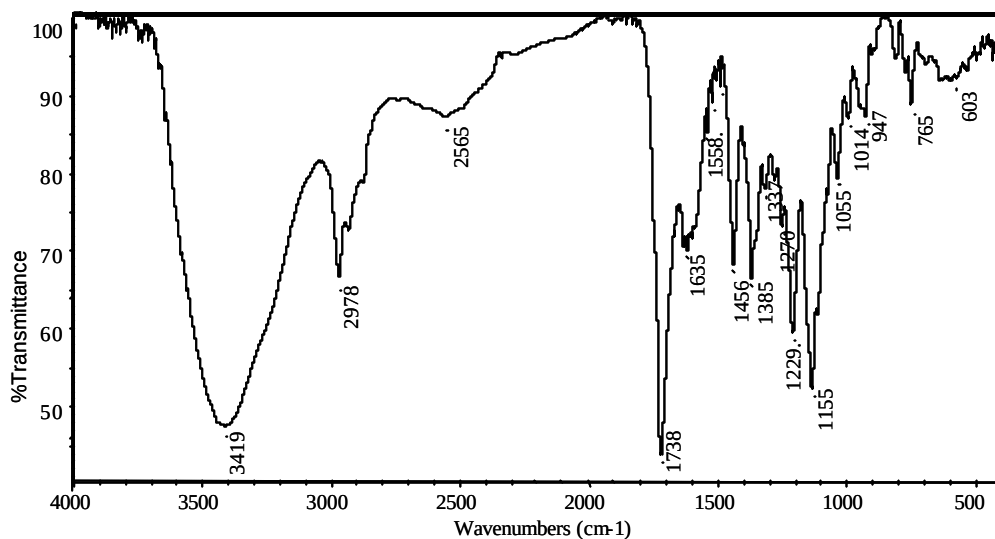
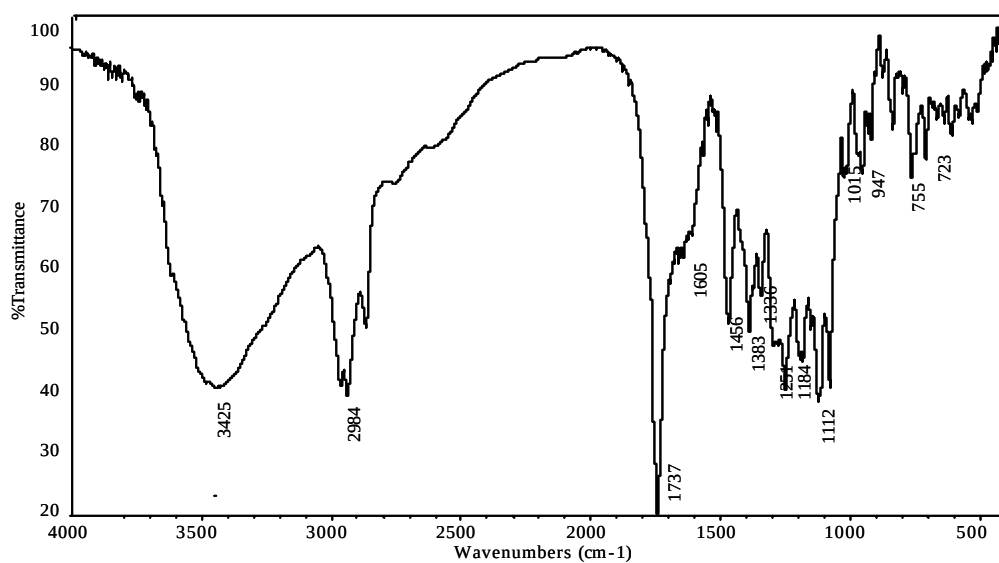


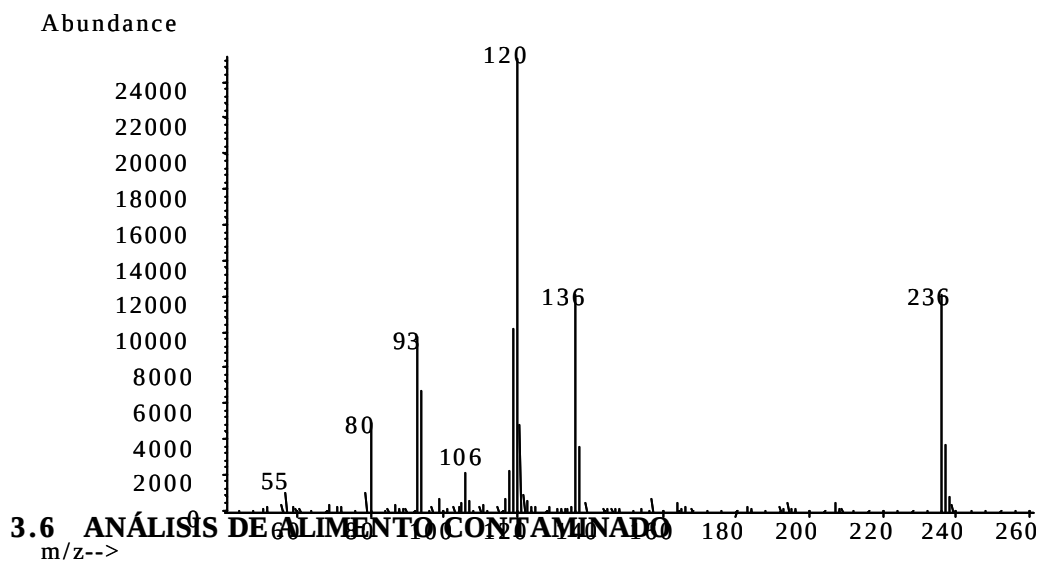
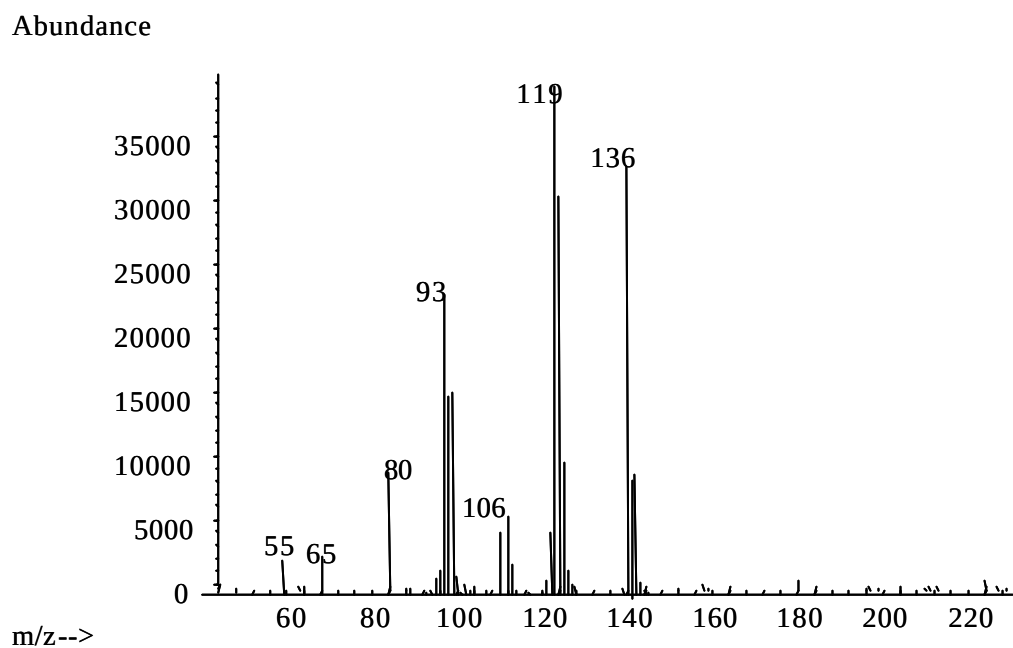
Figura 43. Espectro infrarrojo de alcaloide "B", aislado de *Crotalaria nitens*.



Los espectros de masas, presentaron picos característicos de diéster macrocíclicos en m/z 93, 119, 120, 136; los índices de retención para estos compuestos, fueron 2200 y 2397; su comparación con los reportados por

Witte y colaboradores [68], permitió identificar las estructuras probables presentadas en las **Figuras 22 y 24**, correspondientes a licopsamina y la espartidionina.

Figura 44. Espectros de masas de los alcaloides "A" y "B", aislados de *Crotalaria nitens*.



3.6 ANÁLISIS DE ALIMENTO CONTAMINADO

Se realizaron los análisis de los extractos, obtenidos de alimento para aves (sorgo) contaminados con semillas de *Crotalaria retusa* (**Figura 45 A**) y el blanco (**Figura 45 B**), utilizando el mejor método de extracción establecido (Mw, 5 min, sin modificación del pH).

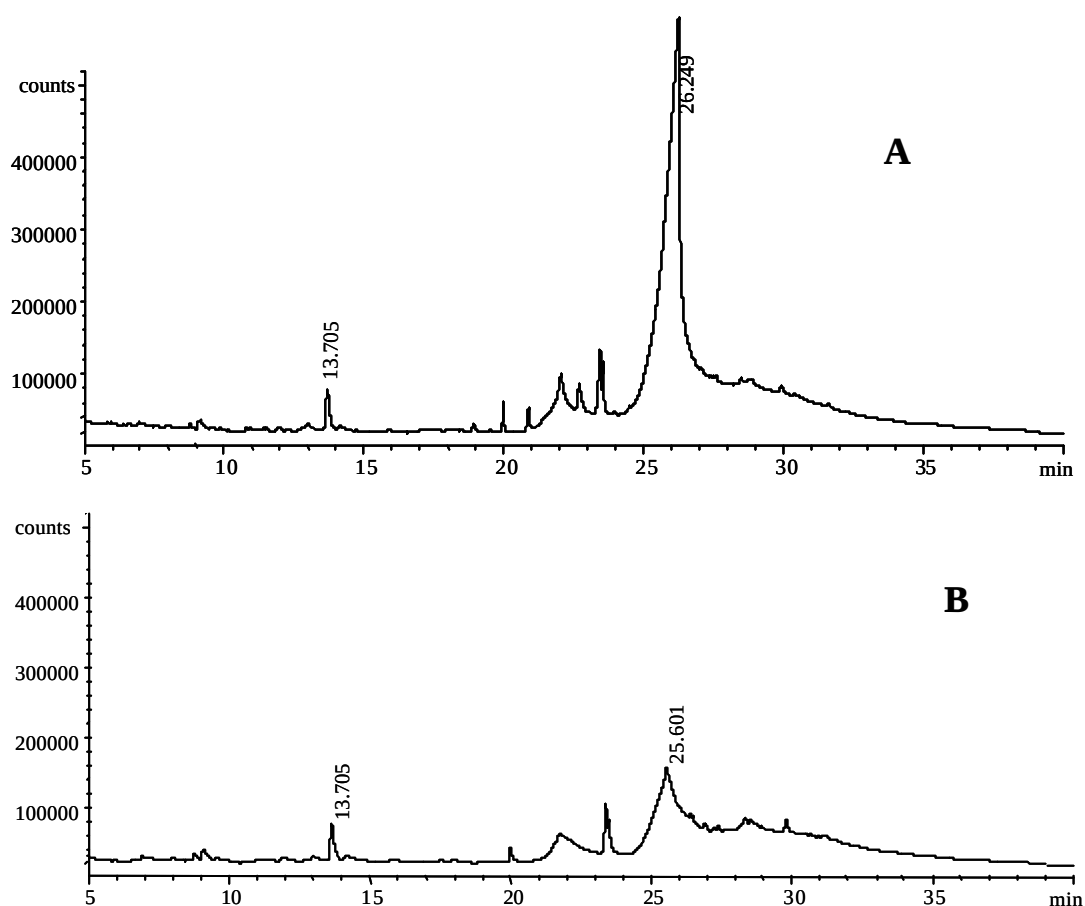


Figura 45. Cromatogramas típicos de extractos en alimento para aves. A. Alimento contaminado con semillas de *Crotalaria retusa*; B. Alimento para aves (Blanco). FID.

El pico con el tiempo de retención $t_R = 26.3$ min corresponde al alcaloide con I_k 2397, cuyo espectro de masas es idéntico al de un PA diéster macrocíclico denominado "monocrotalina". La concentración del alcaloide en muestras de alimento preparado alcanzó 20 mg/kg.

En estudios previos se han establecido cantidades mayores de monocrotalina en diversas especies de *Crotalaria*. Sin embargo, las cantidades halladas para las muestras objeto del presente estudio pueden causar la muerte en animales altamente susceptibles a dichos compuestos como lo son las aves, cuando éstas se alimentan a razón de 2 a 10 mg de semillas de *Crotalaria*/g de peso corporal [42].

CONCLUSIONES

- Se implementó el método por GC/FID/MS, para el análisis de alcaloides pirrolizidínicos, utilizando la extracción con solvente asistida por radiación de microondas durante 5 minutos, sin modificación del pH de la matriz.
- En los extractos de semillas de *Crotalaria nitidula*, se detectaron por GC/MS, ocho alcaloides pirrolizidínicos que se identificaron con base en sus índices de retención de Kováts y patrones de fragmentación característicos, correspondientes tanto a bases necina simples (tipo retronecina), como a estructuras más complejas tipo diéster macrocíclicos.
- Las extracciones asistidas por radiación de microondas y por ultrasonido, permitieron el aislamiento de un mayor número de alcaloides en semillas, en comparación con la técnica de extracción por Soxhlet, la cual presentó eficiencia baja en el aislamiento de PA's, además de consumo alto de solventes y tiempos largos para llevar a cabo el proceso de extracción.
- La producción de metabolitos secundarios tipo PA's en plantas del género *Crotalaria*, está directamente relacionada con el estrés medioambiental, cuyo efecto involucra características endógenas para cada especie, dependiendo del tipo de estrés aplicado.

- Se presentó variabilidad en la distribución de alcaloides en plantas de *Crotalaria retusa*, donde los niveles de PA's más altos se obtuvieron de plantas cultivadas en las condiciones de estrés hídrico y de herbivoría con orugas de *Utetheisa Ornatrix* (familia de las Arctiidae)

- La especie de *Crotalaria nitidula*, posee baja respuesta para la producción de alcaloides pirrolizidínicos en la condición de estrés por herbivoría, por lo que se establece, que ésta Leguminosa puede ser ampliamente utilizada como abono verde, mediante técnicas de rotación, sin el riesgo de la contaminación de los cultivos con alcaloides tóxicos, provenientes de semillas u otras partes de la planta.

- En los extractos de semillas de *Crotalaria retusa*, se identificó el alcaloide pirrolizidínico denominado monocrotalina, usando diversas técnicas de análisis tales como IR, GC/MS, RMN ¹³C, RMN ¹H y difracción de rayos X.

- En muestras de alimento para aves, se detectó la presencia del alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (compuesto tóxico), mediante el uso de equipos analíticos modernos que poseen sensibilidad alta.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios, aplicando la metodología desarrollada en el presente, trabajo, en muestras de alimento para consumo humano, con alta probabilidad de contaminación por alcaloides pirrolizidínicos (cereales, carne, lácteos, etc).

- Debido a la termoinestabilidad de los alcaloides pirrolizidínicos N-óxidos, se recomienda la utilización de otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta eficiencia y la electroforesis capilar, las cuales son alternativas aplicables en el análisis de metabolitos de plantas.

- Hacer el aislamiento y caracterización de los alcaloides pirrolizidínicos presentes en las especies de *Crotalaria* de frecuente cultivo en nuestro país, de acuerdo con la cantidad y tipo de alcaloide, teniendo en cuenta la condición de estrés, a cual se someten durante su cultivo.

- Permitir la adaptación de las orugas de *Utetheisa ornatrix* en plantas de *Crotalaria nitidula*, con el fin de comparar el efecto del estrés por herbivoría, con la misma especie de Lepidópteros, en la producción de alcaloides pirrolizidínicos.

BIBLIOGRAFIA

1. WATSON, D. Natural Toxicans in Food. Shelfield Academic Press, England, **1998**, 334p.
2. ARMSTRONG, S. and ZUCKERMAN, A. Production of Pyrroles from Pyrrolizidine Alkaloids by Human Embryo Tissue. *Science.*, **1970**, 228, 569-560.
3. DEINZER, M. and THOMSOM, P,. Pyrrolizidine Alkaloids: Their occurrence in honey from *Senecio jacobaea.*, *Science*, **1977**, 195, 497 - 499.
4. SEGALL, H. and WILLSON D. *trans*-4-hydroxy-2 hexenal: A Reactive Metabolite from the Macrocyclic Pyrrolizidine Alkaloids *Senecionine*. *Science.*, **1985**, 229, 472 - 475.
5. PILBEAM, A., and JOYCE, L., Ocurrence of the Pyrrolizidine alkaloid monocrotalina in *Crotalaria* seeds, *J.Nat.Prod.*, **1983**, 46, 601 - 605.
6. HUXTABLE, R. and COOPER, R. Pyrrolizidine alkaloids, American Chemical Society Symp. Ser., 745, **2000**, 118-128.
7. HELFERICH, W., and WINTER, C., Food Toxicology, CRC Press, Boca Raton, USA, **2001**, p.p.75 - 80.

8. "THE MERCK INDEX" 11Th Edition, Merck & Co, Rahway, New Jersey, **1989**, p 6162, p 8171.
9. LIN, G. and ROSE. P. Characterization of two structural forms of octonecine type pyrrolizidine alkaloids from *Ligularia* by NMR spectroscopy. *J.Nat.Prod.*, **2000**, 63, 857-860
10. EDGAR, J., ROEDER E, and RUSSELL J., Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: A potencial threat to health. *J.Agric.Food Chem.*, **2002**, 50, 2719 -2730.
11. TORO, G., ROJAS, E. and ARANGO, G. Seneciosis. Enfermedad veno-oclusiva del hígado (VEO) en Colombia 1964-1996. Identificación, manejo y solución. *Rev.Acad.Col.Ciencias.*, **1997**, 79, 35-56.
12. http://europa.eu.int/eur-lex/es/com/dat/1999/es_599PC0654.html/ julio 1999
13. [http://www.clades.org/r4-2.htm/In01Agricultura Alternativa.htm/](http://www.clades.org/r4-2.htm/In01AgriculturaAlternativa.htm/) noviembre 2001.
14. <http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/biosecuridad/boletin8.htm/> Julio 2001
15. http://www.agrocadenas.gov.co/indicadores/ind_sec_prodagricola.htm/ marzo 2003
16. KAUFMAN, P. and CSEKE, L. Natural products from plants. CRC Press, Boca Raton, **1999**, 220p.

17. RAMOS, G., FRUTOS, F., GITALDEZ., F. et.al. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootec.*, **1998**, 47, 597-620.
18. MANN, J. and DAVIDSON, R. Natural products: Their chemistry and biological significance. Ed. Longman Scientific & Technical, New York, **1994**, pp. 389-412.
19. WAGNER. H. and BLADT. S. Plant and Drug Analysis, TLC. 1th Edition, Springer - Verlag, Berlin, **1983**, pp 55-277.
20. KOUZNETSOV, V. and PALMA, A. Química básica de los heterociclos y su importancia práctica. Ediciones UIS, Bucaramanga, Colombia, **1997**, pp 198-203.
21. HELRICH. K. Official methods of analysis, (Contaminants and Drugs). AOAC , 15th Edition, Arlington, **1990**.
22. SHIBAMOTO. T. and BJELDANES, L. Introduction to Food Toxicology. Academic Press INC, New York, **1993**, pp. 67-93.
23. <http://mycoherbicide.net/HEALTH/MYCOTOXINS/index.htm/> marzo 2003
24. <http://farrer.riv.csu.edu.au/ASGAP/peas.html> / noviembre 2003
25. SOTELO, A. and SERRANO, B. High-Performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in 12

- comercial varieties of mexican potato. *J.Agric.Food Chem.*, **2000**, 48, 2472-2475.
26. OSECHAS. D. and VENTURA. M. Valor nutritivo y contenido de ácido cianhídrico del sorgo Yucatán (*Sorghum bicolor* L Moench) a diferentes semanas de edad. *Rev.Fac.Agron (LUZ)*, **1996**, 13, 201-209.
27. BIRECKA. H. and CATALFAMO. J., Incorporation of assimilated carbon into aminoalcohols of heliotropium spathulatum. *Phytochemistry.*, **1982**, 21, 2645-2651.
28. CASTORENA, A. and ARCINIEGAS, A. Callosine, a Alkyl-substituted pyrrolizidine alkaloids from *Senecio callosus*. *J.Nat.Prod.*, **1998**, 61, 1288 - 1291.
29. PEREZ.A. et.al. Idanthine a Pyrrolizidine Alkaloids from *Senecio iodanthus* and *Senecio bracteatus*. *J.Nat.Prod.*, **1999**, 62 (7),1039-1043.
30. COUET. C., CREWS. C. and HANLEY.B. Analysis, separation, and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from Comfrey (*Symphytum officinale*). *Natural Toxins.*, **1996**, 4, 163-167.
31. GARCIA, H., Flora medicinal de Colombia, Tercer mundo editores, Tomo I, 2ª edición, **1992**, pp 481 -483
32. GUPTA, M. Plantas medicinales Iberoamericanas. Convenio Andres Bello, Santa fé de Bogotá D.C, Colombia, **1995**, pp 140-149.

33. <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/Crops/Crotalaria.html/>
septiembre 2001
34. SMITH. L. and CULVENOR. C. Plant sources of hepatotóxic pyrrolizidine alkaloids. *J.Nat.Prod.*, **1981**, 44, 129-152.
35. CORREA & BERNAL., Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andres Bello, Tomo VII, Santafé de Bogotá, **1990**, pp. 188-200.
36. CYRANOSKI, D. Japanese legume project may help to fix nitrogen problem. *Nature*, **2001**, 409, 272.
37. DONAHUE, R., MILLER, R. y SCHICKLUNA, J. Introducción a los suelos y al crecimiento de las plantas. Prentice Hall International, Bogotá, Colombia, **1981**, 162-165.
38. YONEYAMA, T. and YAMADA. N. Variations of natural ¹⁵N abundances in Leguminous plants and nodule fractions. *Plant. Cell. Physiol.*, **1984**, 25 (8), 1561-1565.
39. HARTMANN, T., Review Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, **1999**, 207, 483-495.
40. GAILLARD. Y. and PEPIN. G. Poisoning by plant material: Review of human cases and analytical determination of main toxins by HPLC -MS. *J.Chromatogr. B.*, **1999**, 733, 181-229.

41. MATTOCKS, A. and BIRD, I. Pyrrolic and N-oxide metabolites formed from Pyrrolizidine alkaloids by hepatic microsomes in vitro: relevance to in vivo hepatotoxicity. *Chem -Biol. Interact.*, **1983**, 43(2), 209-22 .
42. COBURN, M. and RUSSELL, M. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed. Sci.*, **1987**, 35(4), 476 - 481.
43. <http://www.revistapajaros.org/articulos/patolog/hepati.html/> octubre 2001
44. CRAIG, M., LATHAN, C., BLYTHE, L., et.al. Metabolism of toxic pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobea*) in ovine ruminal fluid under anaerobic conditions. *Appl. Env. Microb.*, **1992**, 9, 2730-2736.
45. VAN DAM,. N. and WITTE, L. Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*, *Phytochem.*, **1995**, 39 (2), 287 -292.
46. CHANG, A., HARTMANT, T., Solubilization and characterization of Senecionine oxygenase from *Crotalaria scasselatti*, *Phytochem.*, 49 (7), **1998**, 1859 -1866.
47. MANN, J. Secondary Metabolism. Oxford Science Publication, London, **1996**, 482 -486.
48. <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm/> octubre 2002

49. <http://www.e-mas.co.cl/categorias/cnaturales/alelopatia.htm/> septiembre 2002

50. VAN DAM, N, WIITE, L., THE URING., et.al. The “Raison d’être” of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: Deterrent effects against generalist herbivores. *J. Chem. Ecol.*, **1995**, 21 (5), 507-523.

51. REINA, M., GONZALEZ, A., GUTIERREZ, C., et.al. Defensive chemistry of *Senecio miser*. *J.Nat.Prod.*, **2001**, 64, 6-11.

52. BEGON, M. Ecología. Omega S.A, Barcelona, **1996**, 336-349.

53. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/jairo/celular/cell2.htm/agosto> 2003

54. KHARISOV, B. y MENDEZ, U. Uso del ultrasonido en procesos químicos. *Ingenierias.*, **1999**, 2(5),12-21.

55. KINGSTON, H. Microwave -enhanced chemistry. American Chemical Society, Washington DC, **1997**, 571-587.

56. JENNINGS, W. Sample preparation for gas chromatographic analysis, Academic Press, Heilderberg ,**1987**, pp 47-63

57. YOUNG, C. Microwave -assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *J. Agric. Food. Chem.*, **1995**, 43, 2904-2910.

58. JEAN, F., COLLIN G. and LORD. D., Essential oils and microwave extracts of cultivated plants. *Perfumer & Falvorist.*, **1992**, 17, 35 -41.
59. HANDLEY, A. Extraction methods in organic analysis. Sheffield Academic Press, Boca Raton, **1999**, pp.55 -60.
60. ZIEF, M. and KISSER, R. Solid phase extraction for sample preparation. J.T.Baker Inc, s.l., **1994**, 55 p.
61. <http://www.ansci.cornell.edu/courses/as625/1997term/Sopheak/pyrol625.htm>/ Julio 2002
62. CHALMERS, A. and CULVENOR, C. Characterisation of pyrrolizidine alkaloids by gas, thin layer and paper chromatography. *J. Chromatog.*, **1965**, 20, 270-277.
63. KLASEK, A. and SEDMERA. P. Pyrrolizidine alkaloids, alkaloids from some plants of the genus *Ligularia*. *Collection Czechoslov. Chem. Commun*, **1971**, 36, 2205 - 2215.
64. MATTOCKS, A. R. Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Chem.* **1967**, 39 (4), 443-447.
65. RAMSDELL, H. and BUHLER. D. High-performance liquid chromatographic analysis of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids using a reversed-phase styrene -diviylbenzene resin column. *J. Chromatogr. A.*, **1981**, 210, 154 - 158.

66. BOBZIN, S., YANG, S. and KASTEN, TH. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic spectroscopy to the identification of natural products. *J. Chromatogr. B.*, **2000**, 748, 259 -267.

67. ROSEMAN, D., XIYING, W. and KURT, M. Enzyme -linked immunosorbent assay detection of pyrrolizidine alkaloids. *J. Chem. Soc.*, **1996**, 7, 187 -195.

68. WITTE, L., RUBIOLO, P., BICHI, C. et.al. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochem.*, **1993**, 32 (1), 187-196.

69. GROB, R., Modern practice of gas chromatography., John Wiley & Sons, New York, **1985**, pp 361 -370

70. FREEMAN, R. High resolution gas chromatography, Hewlett-Packard company, s.l., **1981**, pp. 17-28

71. DEINZER, M., ARBOGAST, B. and BUHLER, D. Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 1811-1814.

72. PFISTER, J. and MOULINEUX, R. Pyrrolizidine alkaloid content of houndstongue (*Cynoglossum officinale* L). *Journal of range management.*, **1992**, 45 (3), 254 -256.

73. WEBER, S. and EISENREICH, W. Pyrrolizidine alkaloid of the lycopsamine type: biosynthesis of trachelanthic acid. *Phytochem.*, **1999**, 50, 1005 -1014.

74. SEGALL, H. and DALLAS, J. ^1H NMR Spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochem.*, **1983**, 22 (5), 1271-1273.
75. ROEDER, E. Carbon ^{13}C NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids, *Phytochem.*, **1990**, 29 (1), 11 -29.
76. MATTOCKS. A. R. and REBEKAH. J. Improved field test for toxic pyrrolizidine alkaloids. *J.Nat.Prod.*, **1987**, 50 (2), 161 -166.
77. A SPECIALIST PERIODICAL REPORT. THE ALKALOIDS. A Review of the literature published., The Royal Chemical Society, Burlington House, Vol. II, London, **1973**, 63 -68.
78. CULVENOR, C. EDGAR, J., SMITH, W., et.al. Preparation and reactions of derivatives related to pyrrolizidine alkaloids. *Aust. J. Chem.*, **1969**, 22, 935.
79. BREDEKAMP. M. and WIECHERS. A. Deviations from the generality of the "Mass spectrometric method" for determining the mode of ester attachment in pyrrolizidine alkaloids. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28 (32), 3725-3728.
80. RAMANATHAN. R. et.al. Liquid chromatography/mass spectrometry methods for distinguishing N-oxides from hydroxylated compounds. *Anal.Chem.*, **2000**, 72, 1352-1359.
81. DREIFUSS. P., BRUMLEY. W. and SPHON. J. Negative ion chemical ionization mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids with hydroxide reactant ion. *Anal.Chem.*, **1983**, 55, 1036-1040.

82. BOX, G. Estadística para investigadores. Reverté S.A., Barcelona, **1993**, 653 p.
83. HILL. H. and McMINN. D. Detector for capillary chromatography. John Wiley & Sons, New York, **1992**.
84. RÖDER E., The chemistry of pyrrolizidine alkaloids, <http://www.ibiblio.org/herbmed/PAs/PAs-chemistry.html/> febrero 2002
85. HUBER. L. Buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. Hewlett-Packard Company, Miami, **1994**, 160 p.
86. HUONG, D. et.al. Pyrrolizidine alkaloids from *Amphorogyne spicata*. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1444 - 1446.
87. KIMURA, J. and MAKI, N. New loliolide derivatives from the Brown Alga *Undaria pinnatifida*. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 65 (1), 57 - 58.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A SPECIALIST PERIODICAL REPORT. THE ALKALOIDS. A Review of the literature published., The Royal Chemical Society, Burlington House, Vol. II, London, **1973**, 63-68.

ARMSTRONG, S. and ZUCKERMAN, A. Production of Pyrroles from Pyrrolizidine Alkaloids by Human Embryo Tissue. *Science.*, **1970**, 228, 569 - 560.

BEGON, M. Ecología. Omega S.A, Barcelona, **1996**, 336-349.

BIRECKA. H. and CATALFAMO. J., Incorporation of assimilated carbon into aminoalcohols of heliotropium spathulatum. *Phytochemistry.*, **1982**, 21, 2645 - 2651.

BOBZIN, S., YANG. S. and KASTEN. TH. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic spectroscopy to the identification of natural products. *J. Chromatogr. B.*, **2000**, 748, 259-267.

BOX, G. Estadística para investigadores. Reverté S.A., Barcelona, **1993**, 653 p.

BREDENKAMP. M. and WIECHERS. A. Deviations from the generality of the "Mass spectrometric method" for determining the mode of ester attachment in pyrrolizidine alkaloids. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28 (32), 3725-3728.

CASTORENA, A. and ARCINIEGAS, A. Callosine, a Alkyl-substituted pyrrolizidine alkaloids from *Senecio callosus*. *J.Nat.Prod.*, **1998**, 61, 1288 - 1291.

CHALMERS, A. and CULVENOR, C. Characterisation of pyrrolizidine alkaloids by gas, thin layer and paper chromatography. *J. Chromatog.*, **1965**, 20, 270 - 277.

CHANG, A., HARTMANT, T., Solubilization and characterization of Senecionine oxigenase from *Crotalaria scasselatti*, *Phytochem.*, 49 (7), **1998**, 1859 - 1866.

COBURN, M. and RUSSELL, M. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed. Sci.*, **1987**, 35(4), 476-481.

CORREA & BERNAL., Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andres Bello, Tomo VII, Santafé de Bogotá, **1990**, pp. 188-200.

COUET. C., CREWS. C. and HANLEY.B. Analysis, separation, and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from Comfrey (*Symphytum officinale*). *Natural Toxins.*, **1996**, 4, 163-167.

CRAIG, M., LATHAN, C., BLYTHE, L., et.al. Metabolism of toxic pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobea*) in ovine ruminal fluid under anaerobic conditions. *Appl. Env. Microb.*, **1992**, 9, 2730 - 2736.

CULVENOR, C. EDGAR, J., SMITH, W, et.al. Preparation and reactions of derivatives related to pyrrolizidine alkaloids. *Aust. J. Chem.*, **1969**, 22, 935.

CYRANOSKI, D. Japanese legume project may help to fix nitrogen problem. *Nature*, **2001**, 409, 272.

DEINZER, M. and THOMSOM, P.,. Pyrrolizidine Alkaloids: Their occurrence in honey from *Senecio jacobaea*., *Science*, **1977**, 195, 497 -499.

DEINZER. M., ARBOGAST. B. and BUHLER. D. Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 1811 -1814.

DONAHUE, R., MILLER, R. y SCHICKLUNA, J. Introducción a los suelos y al crecimiento de las plantas. Prentice Hall International, Bogotá, Colombia, **1981**, 162 -165.

DREIFUSS. P., BRUMLEY. W. and SPHON. J. Negative ion chemical ionization mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids with hydroxide reactant ion. *Anal.Chem.*, **1983**, 55, 1036 -1040.

EDGAR, J., ROEDER E, and RUSSELL J., Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: A potencial threat to health. *J.Agric.Food Chem.*, **2002**, 50, 2719 -2730.

FREEMAN. R. High resolution gas chromatography, Hewlett-Packard company, s.l., **1981**, pp. 17-28

GAILLARD. Y. and PEPIN. G. Poisoning by plant material: Review of human cases and analytical determination of main toxins by HPLC-MS. *J.Chromatogr. B.*, **1999**, 733, 181 -229.

GARCIA, H., Flora medicinal de Colombia, Tercer mundo editores, Tomo I, 2^a edición, **1992**, pp 481-483

GROB. R., Modern practice of gas chromatography., John Wiley & Sons, New York, **1985**, pp 361 -370

GUPTA, M. Plantas medicinales Iberoamericanas. Convenio Andres Bello, Santa fé de Bogotá D.C, Colombia, **1995**, pp 140-149.

HANDLEY, A. Extraction methods in organic analysis. Sheffield Academic Press, Boca Raton, **1999**, pp.55 -60.

HARTMANN, T., Review Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, **1999**, 207, 483 -495.

HELFERICH, W., and WINTER, C., Food Toxicology, CRC Press, Boca Raton, USA, **2001**, p.p.75 -80.

HELDRICH. K. Official methods of analysis, (Contaminants and Drugs). AOAC , 15th Edition, Arlington, **1990**.

HILL. H. and McMINN. D. Detector for capillary chromatography. John Wiley & Sons, New York, **1992**.

http://europa.eu.int/eur-lex/es/com/dat/1999/es_599PC0654.html/ julio 1999

<http://farrer.riv.csu.edu.au/ASGAP/peas.html> / noviembre 2003

<http://mycoherbicide.net/HEALTH/MYCOTOXINS/index.htm/> marzo 2003

<http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/Crops/Crotalaria.html>/septiembre 2001

http://www.agrocadenas.gov.co/indicadores/ind_sec_prodagricola.htm/marzo 2003

<http://www.ansci.cornell.edu/courses/as625/1997term/Sopheak/pyrol625.htm>/ Julio 2002

<http://www.clades.org/r4-2.htm/In01AgriculturaAlternativa.htm>/ noviembre 2001.

<http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/bioseguirad/boletin8.htm>/ Julio 2001

<http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>/ octubre 2002

<http://www.e-mas.co.cl/categorias/cnaturales/alelopatia.htm>/ septiembre 2002

<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/jairo/celular/cell2.htm>/ agosto 2003

<http://www.revistapajaros.org/articulos/patolog/hepati.html>/ octubre 2001

HUBER. L. Buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. Hewlett - Packard Company, Miami, **1994**, 160 p.

HUONG, D. et.al. Pyrrolizidine alkaloids from *Amphorogyne spicata*. *J. Nat.Prod.*, **1998**, 61, 1444 - 1446.

HUXTABLE, R. and COOPER, R. Pyrrolizidine alkaloids, American Chemical Society Symp. Ser., 745, **2000**, 118-128.

JEAN, F., COLLIN G. and LORD. D., Essential oils and microwave extracts of cultivated plants. *Perfumer & Falvorist.*, **1992**, 17, 35-41.

JENNINGS, W. Sample preparation for gas chromatographic analysis, Academic Press, Heilderberg , **1987**, pp 47 -63

KAUFMAN, P. and CSEKE, L. Natural products from plants. CRC Press, Boca Raton, **1999**, 220p.

KHARISOV, B. y MENDEZ, U. Uso del ultrasonido en procesos químicos. *Ingenierias.*, **1999**, 2(5),12 - 21.

KIMURA, J. and MAKI, N. New loliolide derivatives from the Brown Alga *Undaria pinnatifida*. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 65 (1), 57 -58.

KINGSTON, H. Microwave-enhanced chemistry. American Chemical Society, Washington DC, **1997**, 571 -587.

KLASEK, A. and SEDMERA. P. Pyrrolizidine alkaloids, alkaloids from some plants of the genus *Ligularia*. *Collection Czechoslov. Chem. Commun*, **1971**, 36, 2205 -2215.

KOUZNETSOV, V. and PALMA, A. Química básica de los heterociclos y su importancia práctica. Ediciones UIS, Bucaramanga, Colombia, **1997**, pp 198 - 203.

LIN, G. and ROSE. P. Characterization of two structural forms of octonecine type pyrrolizidine alkaloids from *Ligularia* by NMR spectroscopy. *J.Nat.Prod.*, **2000**, 63, 857 -860

MANN, J. and DAVIDSON, R. Natural products: Their chemistry and biological significance. Ed. Longman Scientific & Technical, New York, **1994**, pp. 389 - 412.

_____. Secondary Metabolism. Oxford Science Publication, London, **1996**, 482-486.

MATTOCKS, A. and BIRD, I. Pyrrolic and N-oxide metabolites formed from Pyrrolizidine alkaloids by hepatic microsomes in vitro: relevance to in vivo hepatotoxicity. *Chem - Biol. Interact.*, **1983**, 43(2), 209-22 .

_____. Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Chem.* **1967**, 39 (4), 443-447.

_____ and REBEKAH. J. Improved field test for toxic pyrrolizidine alkaloids. *J.Nat.Prod.*, **1987**, 50 (2), 161-166.

OSECHAS. D. and VENTURA. M. Valor nutritivo y contenido de ácido cianhídrico del sorgo Yucatán (*Sorghum bicolor* l Moench) a diferentes semanas de edad. *Rev.Fac.Agron (LUZ)*, **1996**, 13, 201 -209.

PEREZ.A. et.al. Idanthine a Pyrrolizidine Alkaloids from *Senecio iodanthus* and *Senecio bracteatus*. *J.Nat.Prod.*, **1999**, 62 (7),1039 -1043.

PFISTER. J. and MOULINEUX. R. Pyrrolizidine alkaloid content of houndstongue (*Cynoglossum officinale* l.). *Journal of range management.*, **1992**, 45 (3), 254-256.

PILBEAM, A., and JOYCE, L., Occurrence of the Pyrrolizidine alkaloid monocrotalina in *Crotalaria* seeds, *J.Nat.Prod.*, **1983**, 46, 601-605.

RAMANATHAN. R. et.al. Liquid chromatography/mass spectrometry methods for distinguishing N-oxides from hydroxylated compounds. *Anal.Chem.*, **2000**, 72, 1352 - 1359.

RAMOS, G., FRUTOS, F., GITALDEZ., F. et.al. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootec.*, **1998**, 47, 597 - 620.

RAMSDELL, H. and BUHLER. D. High-performance liquid chromatographic analysis of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids using a reversed-phase styrene - divinylbenzene resin column. *J. Chromatogr. A.*, **1981**, 210, 154-158.

REINA, M., GONZALEZ, A., GUTIERREZ, C., et.al. Defensive chemistry of *Senecio miser*. *J.Nat.Prod.*, **2001**, 64, 6-11.

ROEDER, E. Carbon ^{13}NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids, *Phytochem.*, **1990**, 29 (1), 11-29.

RÖDER E., The chemistry of pyrrolizidine alkaloids
<http://www.ibiblio.org/herbmed/PAs/PAs-chemistry.html/> febrero 2002

ROSEMAN, D., XIYING, W. and KURT, M. Enzyme-linked immunosorbent assay detection of pyrrolizidine alkaloids. *J. Chem. Soc.*, **1996**, 7, 187-195.

SEGALL, H. and DALLAS, J. ^1H NMR Spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochem.*, **1983**, 22 (5), 1271-1273.

SEGALL, H. and WILLSON D. *trans*-4-hydroxy-2 hexenal: A Reactive Metabolite from the Macrocyclic Pyrrolizidine Alkaloids *Senecionine*. *Science.*, **1985**, 229, 472 -475.

SHIBAMOTO. T. and BJELDANES, L. Introduction to Food Toxicology. Academic Press INC, New York, **1993**, pp. 67 -93.

SMITH. L. and CULVENOR. C. Plant sources of hepatotóxic pyrrolizidine alkaloids. *J.Nat.Prod.*, **1981**, 44, 129 -152.

SOTELO, A. and SERRANO, B. High-Performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in 12 comercial varieties of mexican potato. *J.Agric.Food Chem.*, **2000**, 48, 2472 - 2475.

"THE MERCK INDEX" 11th Edition, Merck & Co, Rahway, New Jersey, **1989**, p 6162, p 8171.

TORO, G., ROJAS, E. and ARANGO, G. Seneciosis. Enfermedad veno-oclusiva del hígado (VEO) en Colombia 1964 -1996. Identificación, manejo y solución. *Rev.Acad.Col.Ciencias.*, **1997**, 79, 35 -56.

VAN DAM, N., WIITE, L., THEURING., et.al. The "Raison d'être" of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: Deterrent effects against generalist herbivores. *J. Chem. Ecol.*, **1995**, 21 (5), 507 -523.

VAN DAM, N. and WITTE, L. Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*, *Phytochem.*, **1995**, 39 (2), 287-292.

WAGNER, H. and BLADT, S. Plant and Drug Analysis, TLC. 1th Edition, Springer -Verlag, Berlin, **1983**, pp 55 -277.

WATSON, D. Natural Toxicans in Food. Shelfield Academic Press, Boca Raton, **1998**, 334p.

WEBER, S. and EISENREICH, W. Pyrrolizidine alkaloid of the lycopsamine type: biosynthesis of trachelanthic acid. *Phytochem.*, **1999**, 50, 1005 -1014.

WITTE, L., RUBIOLO, P., BICHI, C. et.al. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochem.*, **1993**, 32 (1), 187-196.

YONEYAMA, T. and YAMADA. N Variations of natural ¹⁵N abundances in Leguminous plants and nodule fractions. *Plant. Cell. Physiol.*, **1984**, 25 (8),1561-1565.

YOUNG, C. Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *J. Agric. Food. Chem.*, **1995**, 43, 2904-2910.

ZIEF, M. and KISSER, R. Solid phase extraction for sample preparation. J.T.Baker Inc, s.l., **1994**, 55 p.

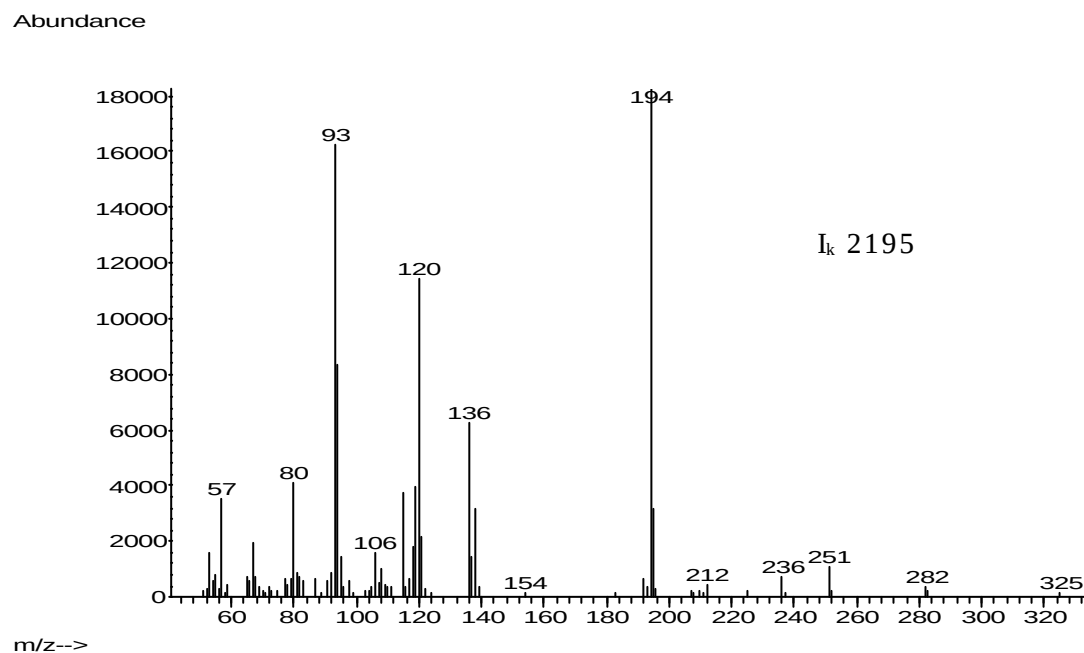
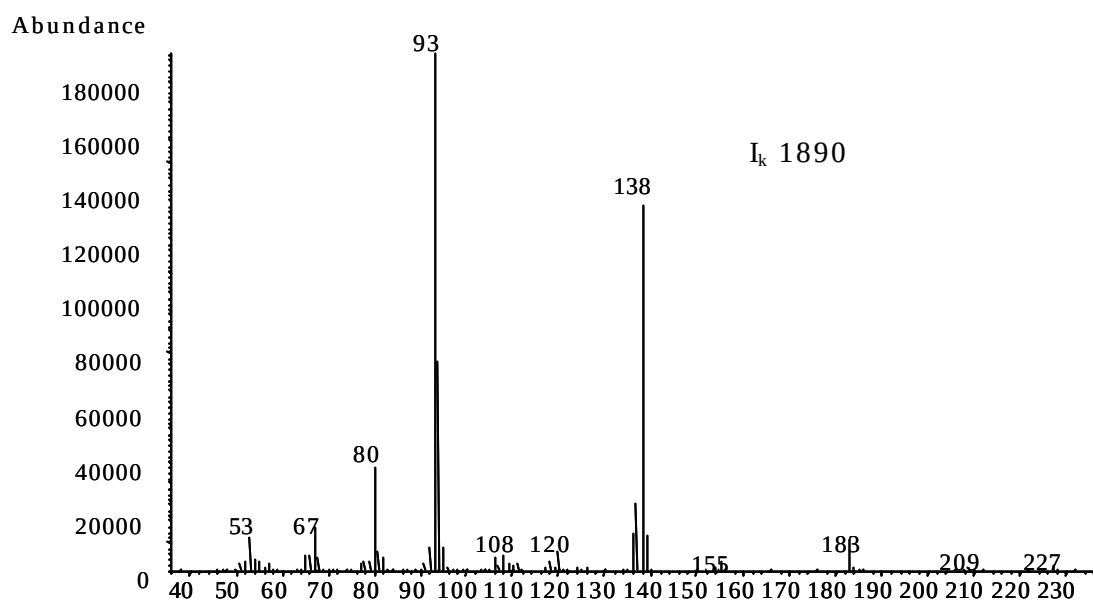
ANEXO 1

Alcaloides pirrolizidínicos en follaje de *Crotalaria retusa* según sus I_k y espectros de masas.

Anexo 1.1 Alkaloides pirrolizidínicos presentes en follaje de *Crotalaria retusa* según sus I_k .

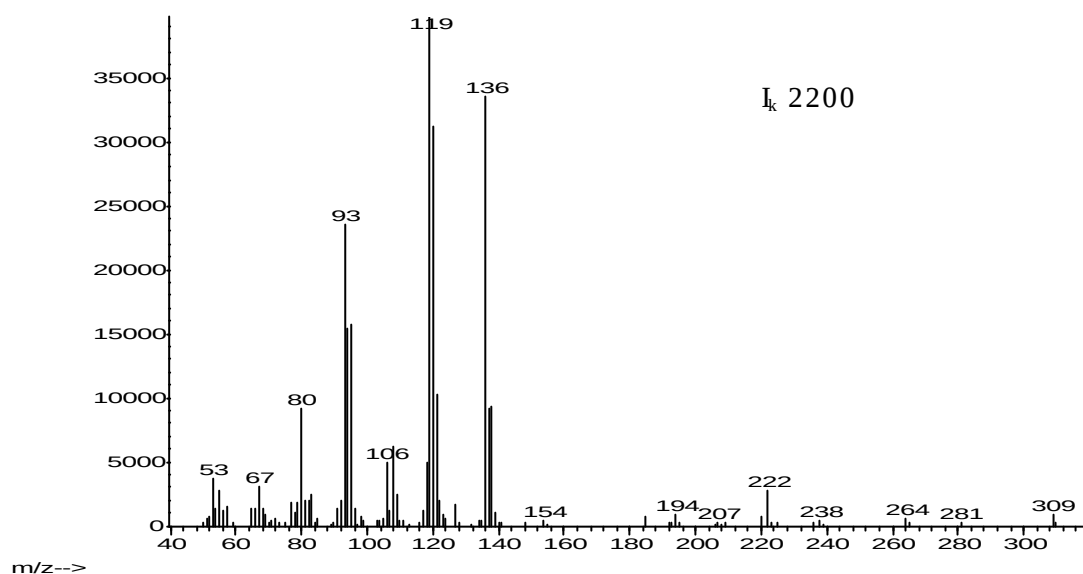
Compuesto según base de datos	I_k experimental	Compuesto "identificado" según literatura/ I_k [68]
3`Acetillicopsamina	1890	9 - Tiogloilretronecina /1888 7 - Senecioilplatinecina/1886 7 - Tiogloylplatinecina/1900
-	2195	Indicina /2185 Intermedina/2188 Licopsamina/2197
Senecionina	2200	Rinderina/2205
Retusina	2299	7 - 9Disenecioyl platinecina/2285 7 - 9Ditiogloilplatinecina/2300
Jacoline	2395	Espartioidina/2400
Jacozine	2397	Interregimina/2402
Senecionina	2399	
9-0-(2 - metilpropionil) retronecina	2499	Jacobina/2495

Anexo 1.2 Espectros de masas de los compuestos con I_k 1890 y 2195, aislados del follaje de *Crotalaria retusa*.

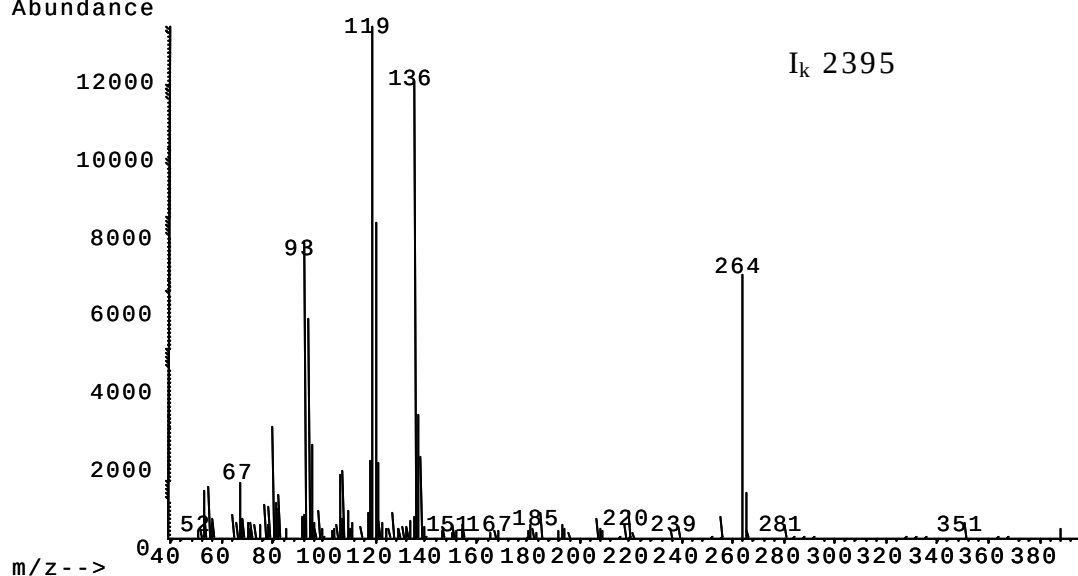


**Anexo 1.3 Espectros de masas de los compuestos con I_k 2200 y 2395,
aislados del follaje de *Crotalaria retusa*.**

Abundance

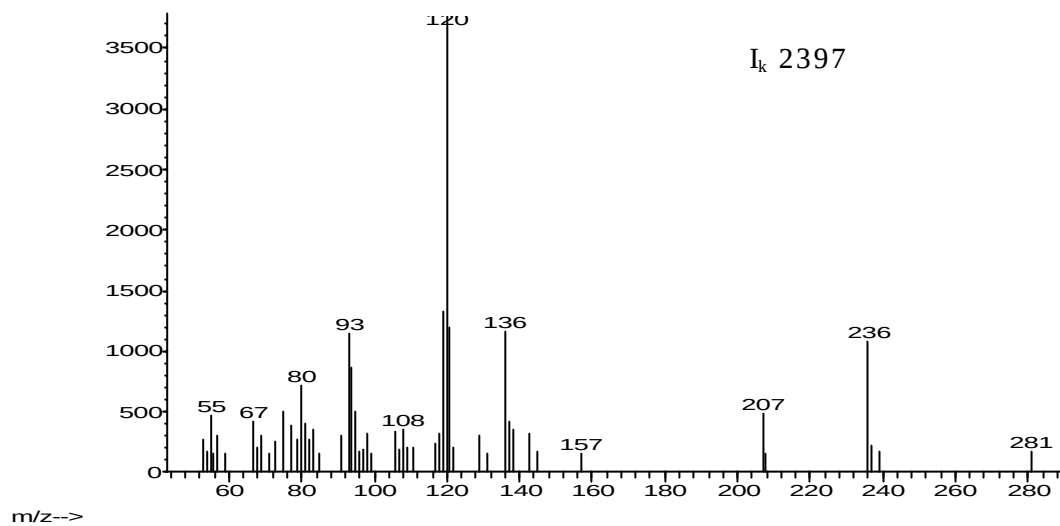


Abundance

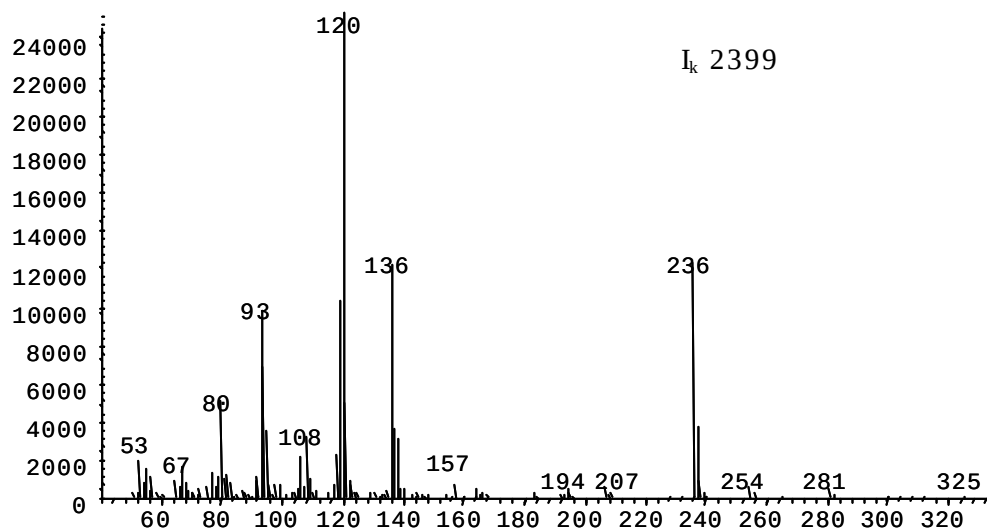


Anexo 1.4 Espectros de masas de los compuestos con I_k 2397 y 2399, aislados del follaje de *Crotalaria retusa*.

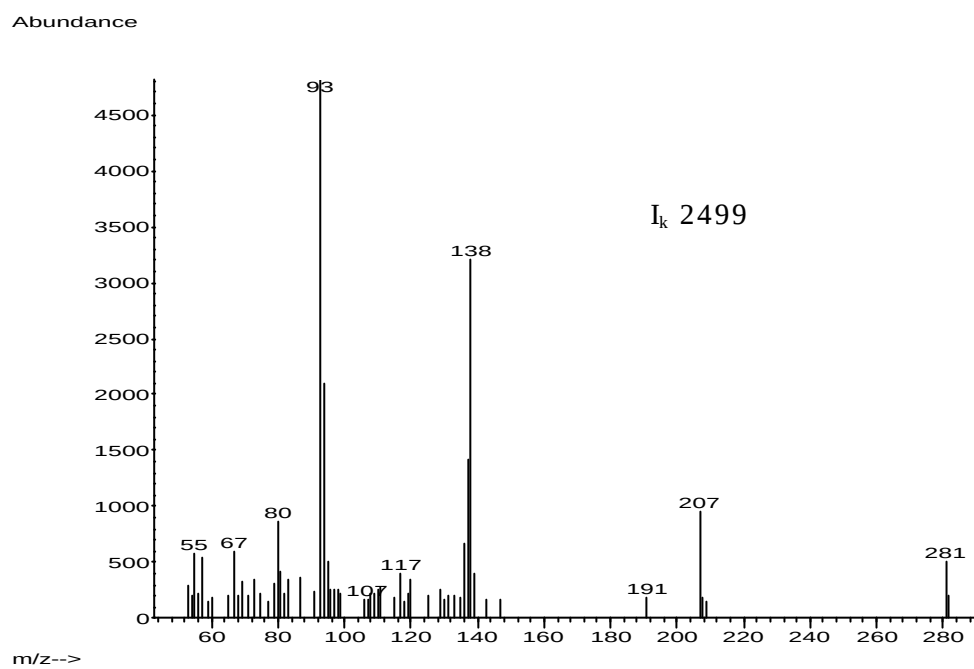
Abundance



Abundance



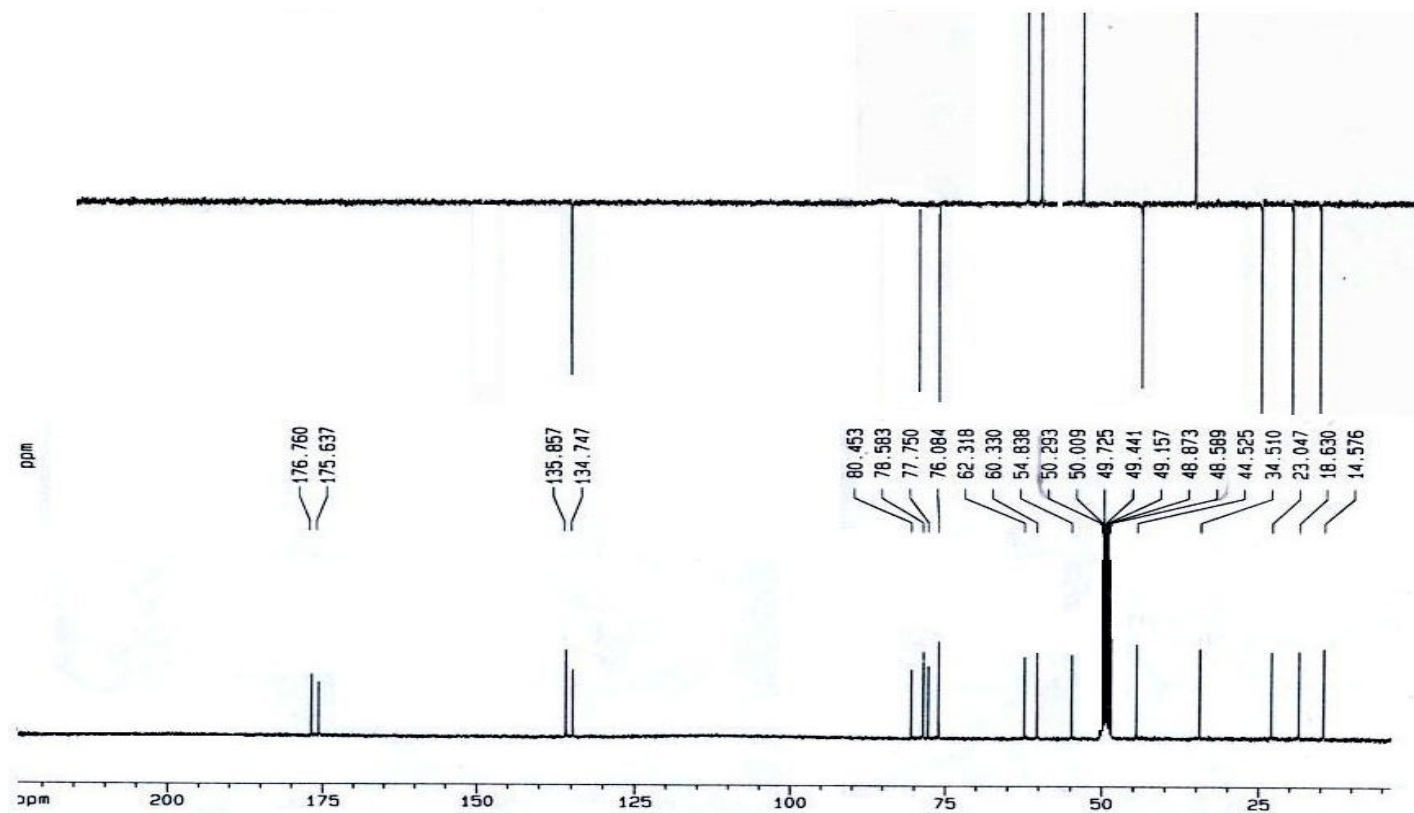
Anexo 1.5 Espectro de masas del compuesto con I_k 2499, aislado del follaje de *Crotalaria retusa*.



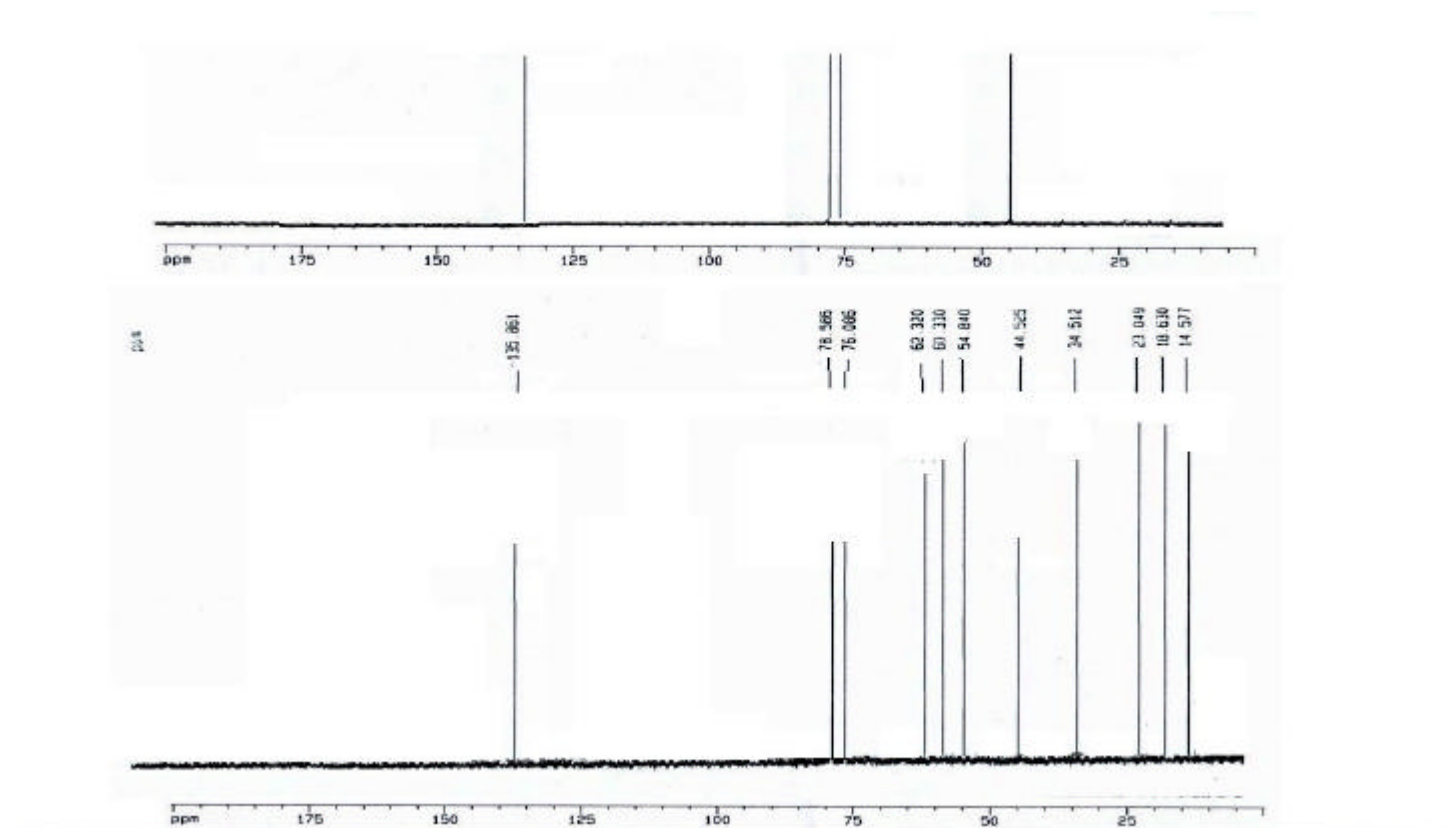
ANEXO 2

Espectros RMN- ^1H y ^{13}C del alcaloide aislado en *Crotalaria retusa*

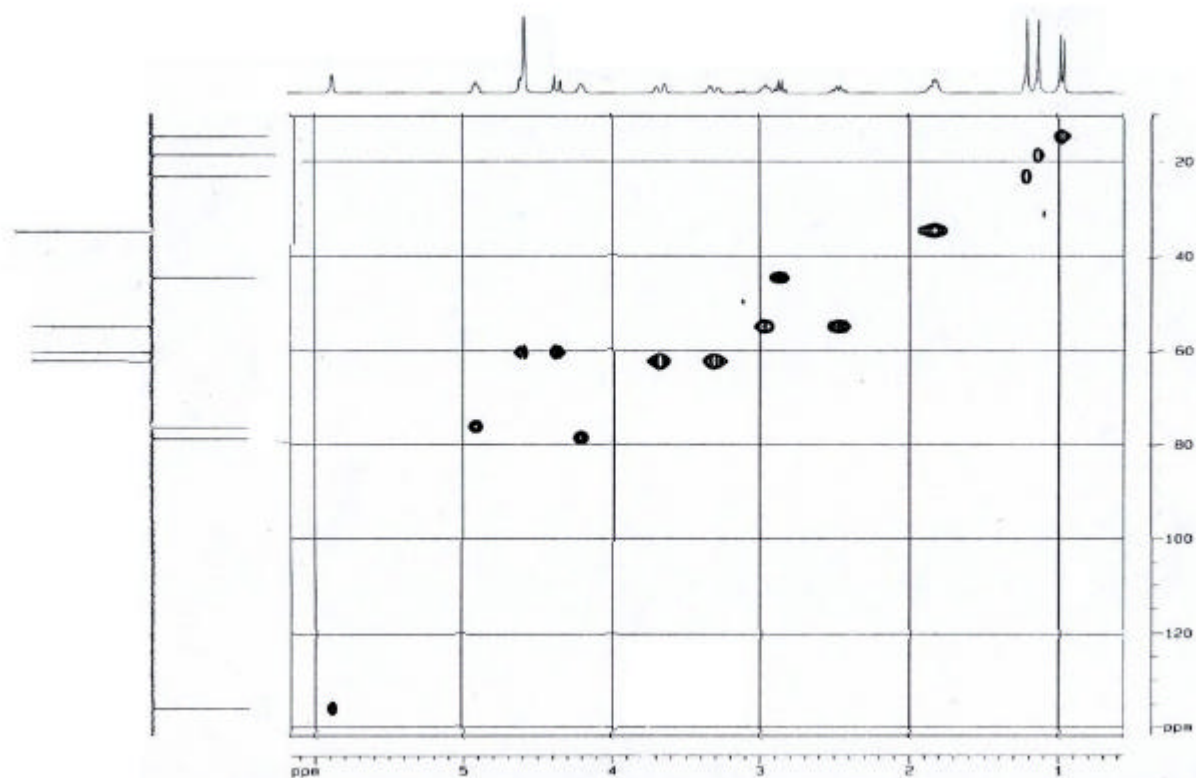
Anexo 2.1. Espectro de RMN- ^{13}C y DEPT 135 del alcaloide aislado de semillas de *Crotalaria retusa*.



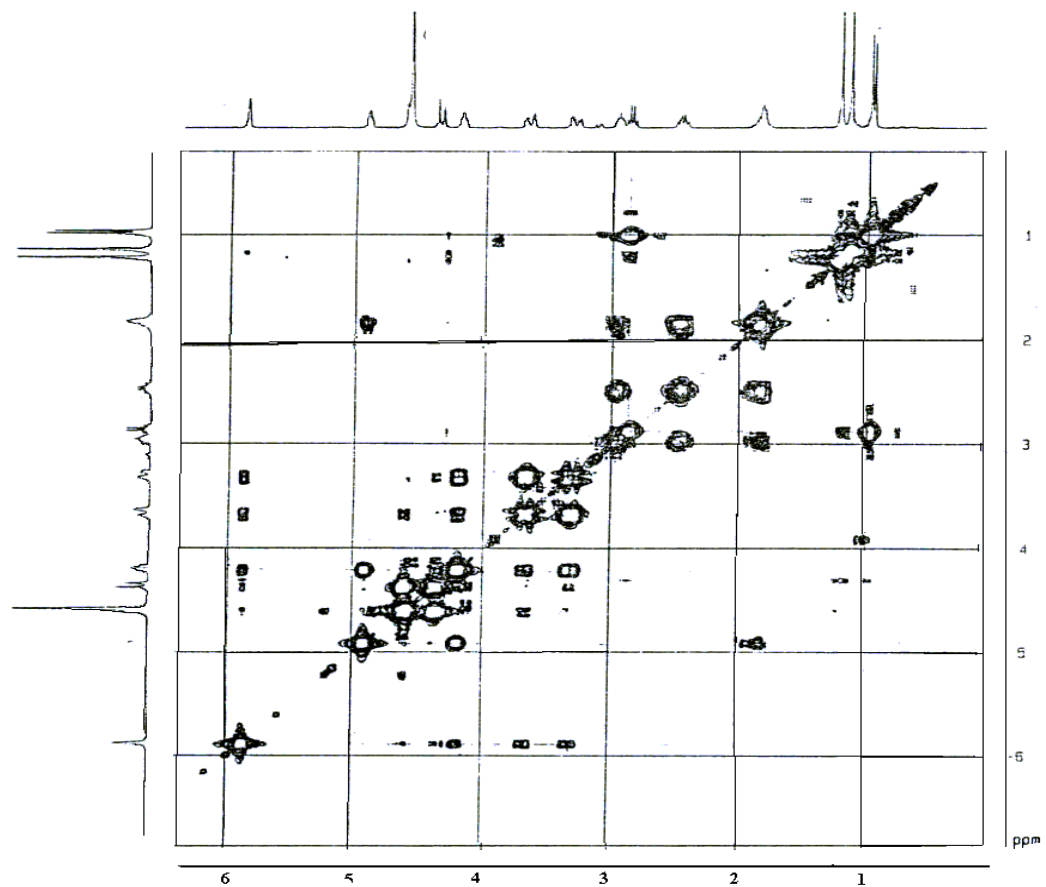
Anexo 2.2. Espectro DEPT 90 y DEPT 45 del alcaloide aislado de semillas de *Crotalaria retusa*.



Anexo 2.3. Espectro HMQC del alcaloide aislado de semillas de *Crotalaria retusa*.



Anexo 2.4. Espectro COSY del alcaloide aislado de semillas de *Crotalaria retusa*.



Anexo 2.5 Espectro de RMN-¹H del alcaloide aislado de semillas de *Crotalaria retusa*.

