

Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos y compuestos orgánicos volátiles  
en *Crotalaria* spp. (Fabaceae) inducidos por herbivoría  
con *Utetheisa ornatix* (Lepidóptera)

Fausto Prada Chaparro

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar el título  
de Doctor en Química

Directores:

Prof. Dra. Elena E. Stashenko

Prof. Dr. Jairo René Martínez

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

### Agradecimientos

A mi querida familia Teresa, Alejandro y Nicolás por acompañarme en las salidas de campo, animarme y mantener la confianza en mí, siempre fueron mi fortaleza para seguir adelante. A mi madre Isabel, tía Leticia, tíos Misael y Joselín, abuelita Leonor y hermano Arley que con su cariño y ejemplo me forjaron para perseverar y lograr esta meta.

A los profesores Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez por sus enseñanzas, recomendaciones en el desarrollo del proyecto y experiencias de vida compartidas, especialmente en los encuentros de *culturizarte*.

A Julián Lozano, Yesica Bautista, Jesús Zambrano, Nathalie Ñañez, Laisha Burgos y Luis Romero por su gran apoyo en las actividades de jardinería y laboratorio.

A Annett Weichert y Ricardo Machado por su acogimiento y enseñanzas durante el desarrollo de la pasantía de investigación.

A Jesica Mejía, Lady Sierra, Yuri Córdoba, Wilman Delgado, William Salgar, Deyanira Caballero, Yurany Rivera, Luis Guillermo Montes, Ángela Sánchez, Daniel Saavedra, Edwin Navia, Mónica Navia, compañeros de CENIVAM - CROM-MASS, a todos los profesores y amigos que, de una u otra forma, hicieron sus contribuciones para la culminación de este proyecto de investigación.

A la Universidad Industrial de Santander, la Escuela de Química y al grupo de investigación CIBIMOL por aceptarme y darme la oportunidad de estudiar el complejo, pero fascinante mundo de la interacción química entre plantas e insectos.

Agradezco el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica, Fondo Francisco José de Caldas, contrato RC-FP44842-212-2018, programa Bio-Reto XXI-15:50. La co-financiación de la Universidad Industrial de Santander-VIE, proyecto 1786 y de COLCIENCIAS (actualmente Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación) en el marco del proyecto “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética farmacéutica y de productos de aseo con base

en la biodiversidad colombiana”, ejecutado por la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander, a través del Centro de Investigación de Biomoléculas CIBIMOL; contrato RC-0572-2012.

Al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS) por brindar los recursos para los consumibles y mantenimiento de equipos cromatográficos necesarios para el desarrollo del proyecto.

Finalmente, agradezco a COLCIENCIAS (actualmente Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación) por la financiación de mis estudios de doctorado (Convocatoria Doctorados Nacionales 617/2013).

### Tabla de contenido

	Pág.
Introducción .....	21
1 Estado del arte .....	30
1.1 Plantas del género <i>Crotalaria</i> .....	30
1.2 <i>Utetheisa ornatrix</i> (Lepidoptera: Erebidae) .....	32
1.3 Alkaloides pirrolizidínicos.....	33
1.3.1 Extracción y análisis de alkaloides pirrolizidínicos.....	34
1.3.2 Intercambio de hidrógeno/deuterio en alkaloides pirrolizidínicos .....	36
1.3.3 Toxicidad de los alkaloides pirrolizidínicos .....	37
1.4 Acumulación y transformación de alkaloides pirrolizidínicos en <i>U. ornatrix</i> .....	38
1.5 Defensa química de las plantas.....	40
1.6 Extracción y análisis de compuestos orgánicos volátiles inducidos por herbivoría.....	43
1.7 Los compuestos orgánicos volátiles en la agricultura .....	45
1.8 Objetivo del trabajo .....	46
2 Materiales y métodos.....	47
2.1 Reactivos .....	47
2.2 Material vegetal .....	47
2.3 Especímenes de <i>U. ornatrix</i> .....	48
2.4 Extracción, identificación GC–MS y LC–MS y distribución de alkaloides pirrolizidínicos en especies de <i>Crotalaria</i> .....	49
2.4.1 Dispersión de la matriz en fase sólida .....	50
2.4.2 Identificación de los alkaloides pirrolizidínicos por GC–MS y LC–MS .....	50
2.4.3 Contenido de alkaloides pirrolizidínicos en <i>Crotalaria</i> spp.....	51

2.4.4 Condiciones de análisis LC–MS .....	52
2.4.5 Condiciones de análisis GC–MS .....	54
2.4.6 Ensayos de intercambio hidrógeno/deuterio en retronecina, heliotrina y monocrotalina .....	55
2.4.7 Contenido de aceite en las semillas, perfil de ácidos grasos y contenido de PA en los aceites vegetales .....	56
2.5 Alcaloides pirrolizidínicos en la oruga, la polilla y los huevos de <i>U. ornatrix</i> cuando se alimenta con hojas o semillas de especies de <i>Crotalaria</i> .....	57
2.5.1 Cría de orugas y polillas <i>U. ornatrix</i> .....	57
2.5.2 Preferencia de oviposición de polillas <i>U. ornatrix</i> en plantas de <i>C. nitens</i> , <i>C. retusa</i> , <i>C. incana</i> o <i>C. pallida</i> .....	58
2.5.3 Acumulación y transformación de PA en <i>U. ornatrix</i> alimentadas con hojas o semillas de <i>C. nitens</i> , <i>C. retusa</i> , <i>C. incana</i> o <i>C. pallida</i> .....	59
2.5.4 Extracción MSPD y análisis LC–MS de los PA presentes en las especies de <i>Crotalaria</i> y especímenes <i>U. ornatrix</i> .....	62
2.6 Variación de alcaloides pirrolizidínicos y compuestos orgánicos volátiles en <i>C. nitens</i> inducidos por herbivoría con orugas <i>U. ornatrix</i> .....	63
2.6.1 Plantas de <i>C. nitens</i> cultivadas en laboratorio .....	63
2.6.2 Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en hojas de <i>C. nitens</i> antes y después del ataque de orugas <i>U. ornatrix</i> . .....	64
2.6.3 Variación en la emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de <i>Crotalaria nitens</i> atacadas con orugas <i>U. ornatrix</i> .....	66
2.6.4 Muestreo de volátiles usando HS–SPME.....	66
2.6.5 Comparación de emisión de volátiles en hojas de <i>C. nitens</i> atacadas con orugas <i>U. ornatrix</i> o con daño mecánico .....	68
2.6.6 Identificación y análisis de los compuestos volátiles inducidos por herbivoría por GC–MS.....	69
2.7 Preferencia de oviposición de polillas hembras <i>U. ornatrix</i> en plantas sanas o previamente atacadas por orugas conespecíficas. ....	71
2.8 Análisis estadísticos.....	72

3	Resultados.....	73
3.1	Extracción e identificación de alcaloides pirrolizidínicos presentes en las especies de <i>Crotalaria</i> y especímenes <i>U. ornatrix</i> .....	73
3.1.1	Condiciones de extracción y análisis por LC–MS .....	73
3.1.2	Detección e identificación de alcaloides pirrolizidínicos y sus <i>N</i> -óxidos.....	76
3.1.3	Patrones de fragmentación por impacto con electrones en GC–MS .....	87
3.1.4	Análisis de espectros de masas de alcaloides pirrolizidínicos deuterados. ....	90
3.1.5	Patrones de fragmentación e identificación de alcaloides pirrolizidínicos por ESI(+)-MS ( <i>Orbitrap</i> ).....	96
3.1.6	Repetibilidad en las áreas cromatográficas, método de extracción y reproducibilidad entre especímenes .....	102
3.1.7	Composición de alcaloides pirrolizidínicos en las especies de <i>Crotalaria</i> colectadas .....	105
3.1.8	Composición de ácidos grasos y alcaloides pirrolizidínicos en aceites vegetales de semillas de <i>Crotalaria</i> . ....	111
3.2	Acumulación y transformación de alcaloides pirrolizidínicos en <i>U. ornatrix</i> alimentadas con hojas o semillas de algunas especies de <i>Crotalaria</i> . ....	114
3.2.1	Preferencia de oviposición de adultos <i>U. ornatrix</i> en hojas de <i>C. nitens</i> , <i>C. retusa</i> , <i>C. pallida</i> y <i>C. incana</i> .....	114
3.2.2	Acumulación y transformación de PA en <i>U. ornatrix</i> alimentadas con hojas o semillas de <i>Crotalaria</i> spp.....	116
3.3	Cambios en la composición de alcaloides pirrolizidínicos y volátiles inducidos por herbivoría en hojas de <i>C. nitens</i> sometidas al ataque de orugas <i>U. ornatrix</i> . ....	124
3.3.1	Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en hojas de <i>C. nitens</i> antes y después del ataque de orugas <i>U. ornatrix</i> . ....	124
3.3.2	Volátiles inducidos por herbivoría (HIPV) en hojas de <i>C. nitens</i> antes, durante y después del ataque de orugas <i>U. ornatrix</i> .....	124
3.3.3	Volátiles emitidos en hojas de <i>C. nitens</i> con daño mecánico .....	132
3.4	Los volátiles inducidos por herbivoría con orugas <i>U. ornatrix</i> repelen las hembras conespecíficas. ....	132

4	Discusión de resultados .....	136
5	Conclusiones.....	153
	Referencias bibliográficas.....	156
	Apéndices.....	180

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Ejemplares del género <i>Crotalaria</i> que se estudiaron en el presente trabajo. Fotos del autor, parcelas experimentales CENIVAM–UIS, Bucaramanga, junio de 2016. ....	31
Figura 2. Ejemplo de oruga <i>U. ornatix</i> alimentándose de hojas de <i>C. nitens</i> y vista dorsal de una polilla hembra montada en la colección del Museo de Historia Natural, UIS. Montaje: Juliette Gualdrón, fotos del autor, noviembre 2019 (barra de escala = 1 cm). .....	32
Figura 3. Estructuras básicas de alcaloides pirrolizidínicos y sus <i>N</i> -óxidos (Hartmann, 1999; El-Shazly y Wink, 2014). .....	33
Figura 4. Ruta de transformación de los alcaloides pirrolizidínicos a compuestos tóxicos en el hígado de aves y mamíferos (Dewick, 2009). .....	38
Figura 5. El ataque de insectos herbívoros induce respuestas directas e indirectas en la planta. Síntesis, acumulación y emisión de metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, toxinas (alcaloides), emisión de volátiles (GLV–C <sub>6</sub> , terpenoides y compuestos aromáticos) (Dicke y Baldwin, 2010). .....	41
Figura 6. Biosíntesis de volátiles de hojas verdes (GLV). Enzimas: LOX: 13–Lipoxigenasa; HPL: Liasa hidroperóxido; ADH: Deshidrogenasas; AAT: Acetiltransferasas y IF: Factor isomerasa (Scala y col., 2013). .....	42
Figura 7. Interacciones estudiadas en la presente investigación entre plantas de especies del género <i>Crotalaria</i> y orugas o polillas <i>U. ornatix</i> . .....	46
Figura 8. Diagrama de flujo del trabajo realizado en la etapa de extracción, identificación y distribución de los PA en diferentes partes de <i>Crotalaria</i> spp. ....	49
Figura 9. Alcaloides pirrolizidínicos usados en el experimento de intercambio de hidrógeno/ deuterio. Todos los alcaloides contienen dos hidrógenos lábiles. Se seleccionaron, un PA no esterificado (retronecina), un monoéster (heliotrina) y un diéster cíclico (monocrotalina). .....	56
Figura 10. Fotos de <i>U. ornatix</i> y su ciclo de vida, según Signoretti y col. (2008). A. La oruga realiza un agujero en una vaina de <i>C. nitens</i> para comer de las semillas. B. Crisálidas. C. Insecto adulto sobre flores de <i>C. retusa</i> . D. Huevos de <i>U. ornatix</i> en el envés de hojas de <i>C. nitens</i> . Fotos del autor, parcelas experimentales CENIVAM–UIS, Bucaramanga, junio 2017. ....	58

Figura 11. Esquema de experimento de acumulación y transformación de los PA provenientes de varias fuentes de alimento. Los PA se determinaron en el alimento, la oruga, la polilla, los huevos y en la espuma que segrega la polilla cuando se siente atacada. A. Oruga *U. ornatix* ingresando a la vaina que contiene las semillas (*C. nitens*). B. Polilla depositando huevos en el envés de una hoja de *C. nitens*. C. Polilla segregando espuma para su defensa. Fotos del autor, parcelas experimentales de CENIVAM–UIS, junio de 2017. .... 60

Figura 12. Montaje de experimento para determinar la variación de los PA generados por el ataque de orugas *U. ornatix*. A. Plantas cubiertas con bolsas de poliéster (Toppits, Minden, Alemania) para evitar la interacción con los volátiles emitidos por la planta vecina. Se inyectó un flujo de aire filtrado para remover lo volátiles afuera de la bolsa. B. Muestreo con sacabocados en la hoja N° 5 para el análisis de los PA por LC–MS. C. Tiempo de ataque de orugas y esquema de muestreo. ( $n = 4$  para plantas atacadas y 4 de control). Fotos del autor, CENIVAM–UIS, noviembre de 2018..... 64

Figura 13. Medición de volátiles emitidos por herbivoría antes, durante y después del ataque de *U. ornatix* a las hojas de *C. nitens*. A. HS–SPME. B. El sistema de purga y trampa (P&T) consistió en frascos de vidrio de 50 cm de alto x 17 cm de ancho. C. Las trampas de volátiles: tubos de vidrio de 7 cm con adsorbente Porapak–Q para atrapar los volátiles. Fotos del autor, CENIVAM–UIS, noviembre de 2018. .... 67

Figura 14. Montaje del método de extracción MSPD. A. Efecto del agente dispersante y el solvente en la recuperación de retrorsina de hojas secas de *C. nitens* ( $n = 3$ ). Promedio  $\pm$  error estándar. B. Efecto del solvente y C. Efecto del volumen del solvente en la extracción de los PA presentes naturalmente en las hojas de *C. nitens* ( $n = 6$ ). Promedio  $\pm$  error estándar. ANOVA, las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba *post hoc* de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) ( $\alpha = 0.05$ ). N.S., no significativo. .... 74

Figura 15. Incidencia de la concentración del ácido fórmico (FA) en fase móvil y el voltaje de electronebulización ( $V_{\text{spray}}$ ) sobre la respuesta de *Orbitrap*–MS a las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  de monocrotalina (28 ng/mL) y de retrorsina (27 ng/mL). Promedio  $\pm$  error estándar;  $n = 3$ . ANOVA, las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba *post hoc* de Tukey HSD ( $\alpha = 0.05$ ). .... 75

Figura 16. Alcaloides pirrolizidínicos detectados en raíces, hojas, flores y semillas de las especies de *Crotalaria* colectadas en el presente estudio. Las moléculas resaltadas en rojo no se habían reportado previamente en literatura. .... 77

Figura 17. Ejemplos de los perfiles cromatográficos obtenidos por LC–MS (*Orbitrap*) de los extractos de alcaloides pirrolizidínicos y algunos de sus *N*–óxidos, obtenidos por

MSPD de semillas maduras y raíces de <i>C. nitens</i> y <i>C. incana</i> . Véase la identificación de los picos en la Tabla 2.....	78
Figura 18. Alcaloides pirrolizidínicos detectados en oruga, polilla o huevos de <i>U. ornatrix</i> . Las moléculas resaltadas en rojo no se habían reportado en literatura (última revisión en octubre de 2020).....	87
Figura 19. Espectro de masas (EI, 70 eV) de la sustancia de referencia retronecina y su patrón de fragmentación. Tomado con modificaciones de Neuner–Jehle y col. (1965).....	88
Figura 20. Espectro de masas (EI, 70 eV) del material de referencia monocrotalina y su patrón de fragmentación. Tomado con modificaciones de Neuner–Jehle y col. (1965). ....	89
Figura 21. Patrón de fragmentación propuesto para un alcaloide pirrolizidínico no esterificado, según los espectros de masas (ESI, HCD: 30 eV, <i>Orbitrap</i> –MS) de la retronecina–d <sub>2</sub> (azul) y retronecina (rojo).....	92
Figura 22. Patrón de fragmentación propuesto para un alcaloide pirrolizidínico 9–monoéster, según los espectros de masas (ESI, HCD: 40 eV, <i>Orbitrap</i> –MS) de la heliotrina–d <sub>2</sub> (azul) y heliotrina (rojo). ....	93
Figura 23. Patrón de fragmentación propuesto para un alcaloide pirrolizidínico diéster cíclico, según los espectros de masas (ESI, HCD: 40 eV, <i>Orbitrap</i> –MS) de la monocrotalina–d <sub>2</sub> (azul) y monocrotalina (rojo).....	94
Figura 24. Espectros de masas de la integerrimina y del <i>N</i> –óxido de integerrimina. A. Integerrimina, MS adquirido en modo <i>full scan</i> . B. Fragmentación de la integerrimina. C. <i>N</i> –Óxido de integerrimina en modo <i>full scan</i> y D. Fragmentación del <i>N</i> –óxido de integerrimina. ....	95
Figura 25. Ruta de fragmentación y el origen de los iones–fragmento característicos propuestos para los espectros de masas de la integerrimina y su <i>N</i> –óxido. La ruta de fragmentación aplica para otros PA cíclicos tipo retronecina. ....	96
Figura 26. Corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas [M+H] <sup>+</sup> para los <i>N</i> –óxidos antes (verdes) y después de ser convertidos en sus respectivos PA (naranja). Los <i>N</i> –óxidos se extrajeron de hojas de <i>C. nitens</i> usando MSPD. Análisis LC–MS ( <i>Orbitrap</i> ).....	97
Figura 27. Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) encontrados en los espectros de masas de los 9–monoésteres tipo retronecina detectados en las especies de <i>Crotalaria</i> y en <i>U. ornatrix</i> estudiados en este trabajo. ....	99

- Figura 28. Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) encontrados en los espectros de masas de los diésteres cíclicos de 12 miembros tipo retronecina, detectados en las especies de *Crotalaria* estudiadas en este trabajo. .... 100
- Figura 29. Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) encontrados en los espectros de masas de los diésteres cíclicos de 11 miembros tipo retronecina detectados en las especies de *Crotalaria* estudiado en este trabajo..... 102
- Figura 30. Promedio ( $\pm$  error estándar,  $n = 8$ ) de huevos colocados por polillas en las hojas de *Crotalaria* spp. en un experimento de selección múltiple. Los datos se transformaron con raíz cuadrada para cumplir con los supuestos del ANOVA. Las letras diferentes significan diferencias significativas, prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). ..... 115
- Figura 31. Promedio ( $\pm$  error estándar,  $n = 7$ ) del peso de las orugas en instar cinco alimentadas con hojas o semillas de las cuatro especies de *Crotalaria*. Los datos se transformaron con logaritmo natural para cumplir con los supuestos del ANOVA. Las letras diferentes significan diferencias significativas,  $**P < 0,01$ ,  $*** P < 0,001$ . Prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ )..... 116
- Figura 32. Acumulación de PA en *U. ornatix*: orugas, polillas, la espuma que segrega la polilla y sus huevos, después que las orugas se alimentaron con hojas o semillas de *C. pallida*, *C. incana*, *C. retusa* o *C. nitens*. ..... 118
- Figura 33. Contenido total de los PA acumulados por las polillas *U. ornatix* y proporción de compuestos biotransformados cuando las orugas se alimentaron con hojas o semillas de *C. pallida* o *C. incana*, que tenían menos contenido de PA en comparación con *C. retusa* o *C. nitens*. ..... 119
- Figura 34. Perfiles cromatográficos (corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas  $[M+H]^+$ ) de los PA presentes *U. ornatix*, alimentadas con semillas inmaduras de *C. nitens* o *C. pallida*. Extracción MSPD y análisis LC-MS (*Orbitrap*). Los números registrados en negro corresponden a los PA que provienen de la planta y en rojo a los transformados por el insecto. La identificación de los picos se presenta en la Tabla 2..... 120
- Figura 35. Cambios en la concentración de PA en plantas de *C. nitens*. A. Las hojas de *C. nitens* fueron atacadas durante dos horas. B. Las hojas de *C. nitens* se mantuvieron en contacto con las orugas durante 12 días, al finalizar este tiempo, se midieron los PA en hojas y raíces, y el cambio el crecimiento: área foliar y altura de las plantas. .... 125
- Figura 36. Perfiles cromatográficos de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens* antes del ataque (hora cero), durante el ataque (hora dos) y

después del ataque (horas seis y diez) con orugas *U. ornatix*. Extracción HS–SPME (PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ) y P&T (Porapak–Q). Análisis GC–MS, columna DB–WAX (60 m). Véase la identificación de los picos en la Tabla 11..... 128

Figura 37. Emisión de HIPV en hojas de *C. nitens* de 12 semanas de edad. Las orugas *U. ornatix* atacaron las hojas durante dos horas. Los HIPV se extrajeron por A. Extracción HS–SPME (fibra PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ,  $n = 7$  plantas) y B. P&T (trampa Porapak–Q,  $n = 10$  plantas). Análisis GC–MS, columna DB–WAX (60 m). Los valores son el promedio  $\pm$  error estándar. .... 131

Figura 38. Emisión de HIPV por hojas de *C. nitens* de 12 semanas de edad, con herbivoría (verde) y con daño mecánico con el bisturí (naranja). Los HIPV se atraparon en el Porapak–Q del sistema de P&T. Análisis por GC–MS, columna DB–WAX (60 m). Valores son el promedio  $\pm$  error estándar ( $n = 10$ ). .... 133

Figura 39. Perfiles cromatográficos de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens*, antes (hora cero), durante (hora dos) y después (horas seis y diez) del daño mecánico (bisturí) o el ataque con orugas *U. ornatix*. Extracción por P&T (Porapak–Q). Análisis por GC–MS, columna DB–WAX (60 m). Véase la identificación de los picos en la Tabla 11..... 134

Figura 40. Preferencia en la oviposición de las polillas hembras *U. ornatix* en hoja de *C. nitens*. A. Ambas plantas sanas; B. Planta sana y planta después el ataque de las orugas durante dos horas, previo al experimento y C. Ambas plantas después del ataque de las orugas. ( $n = 7$ )..... 135

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos y muestras de alimento (hojas y semillas de <i>Crotalaria</i> spp.) y <i>U. ornatrix</i> (oruga, polilla, espuma y huevo). .....	61
Tabla 2. Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por LC–MS ( <i>Orbitrap</i> ) de alcaloides pirrolizidínicos y algunos de sus <i>N</i> –óxidos detectados en raíces, hojas, flores y semillas de especies de <i>Crotalaria</i> y especímenes de <i>U. ornatrix</i> .....	79
Tabla 3. Índices de retención lineales e información espectroscópica GC–MS (EI, 70 eV) de los alcaloides pirrolizidínicos detectados en raíces, hojas, flores y semillas de especies de <i>Crotalaria</i> colectadas en el presente trabajo.....	85
Tabla 4. Repetibilidad de las áreas corrientes iónicas extraídas de los [M+H] <sup>+</sup> de os materiales de referencia monocrotalina (28 ng/mL) y retrorsina (27 ng/mL), analizados por LC–MS ( <i>Orbitrap</i> ). .....	103
Tabla 5. Repetibilidad del método MSPD para la extracción de los PA de las hojas frescas de <i>C. nitens</i> Análisis por LC–MS ( <i>Orbitrap</i> ). .....	103
Tabla 6. Variación (reproducibilidad) del contenido de los PA en las hojas frescas de diferentes plantas de <i>C. nitens</i> , cultivadas en parcelas experimentales de CENIVAM. Extracción por MSPD y análisis por LC-MS. ....	104
Tabla 7. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos (mg/g) en equivalentes de monocrotalina, presentes en raíces, hojas, flores, y semillas de las especies de <i>Crotalaria</i> colectadas en el presente trabajo.....	107
Tabla 8. Contenido de aceite en semillas y composición de ácidos grasos y alcaloides pirrolizidínicos en los aceites vegetales de las especies de <i>Crotalaria</i> colectadas en este trabajo. ....	112
Tabla 9. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en el alimento (semillas <i>C. pallida</i> ) y en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> . .....	121
Tabla 10. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en el alimento (semillas <i>C. nitens</i> ) y en diferentes estados de <i>U. ornatrix</i> . .....	122
Tabla 11. Identificación de compuestos orgánicos volátiles emitidos por herbivoría en hojas de <i>C. nitens</i> . .....	126

Tabla 12. Comparación de los métodos SPME con fibra PDMS/DVB (65 $\mu\text{m}$ ) y Purga y Trampa (P&T) con adsorbente Porapak-Q, para la extracción de compuestos orgánicos volátiles emitidos por herbivoría en hojas de <i>C. nitens</i> . .....	130
---	-----

**Lista de apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Aval para realizar la cría, manipulación y utilización de los especímenes de <i>Utetheisa ornatrix</i> por parte del comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS). ....	180
Apéndice B. Constancia de depósito, de material biológico sobrante de los especímenes de <i>Utetheisa ornatrix</i> , en la Colección Entomológica del Museo de Historia Natural, Universidad Industrial de Santander. ....	183
Apéndice C. Sitios de colecta en el Departamento de Santander con latitud, longitud, altitud, números de <i>voucher</i> y el especialista que determinó las especies de <i>Crotalaria</i> colectadas en el presente trabajo. ....	185
Apéndice D. Informe de la determinación taxonómica de <i>Utetheisa ornatrix</i> mediante secuenciación del gen <i>COI</i> , realizado en el Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN-UIS). ....	186
Apéndice E. Espectros de masas [ESI(+)-HRMS] de los 52 PA y <i>N</i> -óxidos detectados en las raíces, hojas, flores y semillas de las especies de <i>Crotalaria</i> y especímenes <i>U. ornatrix</i> estudiadas en el presente trabajo. ....	190
Apéndice F. Reportes previos en literatura de la composición de ácidos grasos en semillas de diferentes especies de <i>Crotalaria</i> . ....	204
Apéndice G. Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en los aceites extraídos de las semillas de las especies de <i>Crotalaria</i> colectadas en el presente trabajo. ....	206

**Siglas, abreviaturas y acrónimos**

**Δppm:** Delta del error de la masa en partes por millón

**AAT:** *Alcohol acyltransferase* (aciltransferasa de alcoholes)

**ADH:** *Alcohol dehydrogenase* (deshidrogenasa de alcoholes)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**Ald.:** aldoximas

**ANOVA:** *Analysis of variance* (análisis de varianza)

**CA:** Compuestos aromáticos.

**CEINCI–UIS:** Comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander

**CENIVAM:** Centro nacional de investigaciones para la agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales

**CIBIMOL:** Centro de Investigación de Biomoléculas

**dr:** Grosor de la fase estacionaria

**d.i.:** Diámetro interno

**DBV:** *Divinylbenzene* (divinilbenceno)

**DMNT:** *trans*-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno

**EFSA:** *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

**EI:** *Electron ionization* (ionización por impacto con electrones)

**ESI:** *Electrospray ionization* (ionización por electronebulización)

**FAME:** *Fatty acid methyl ester* (metil éster de ácido graso)

**GC–MS:** *Gas–chromatography – mass spectrometry* (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)

**GLV:** *Green leaf volatiles* (volátiles de hojas verdes)

**HCD:** *Higher-energy dissociation cell* (celda de disociación de alta energía)

**HIPV:** *Herbivore-induced plant volatiles* (volátiles de plantas inducidos por herbivoría)

**HMon.:** Hidrocarburos monoterpénicos

**HPL:** *Hydroperoxide lyase* (Liasa hidroperóxido)

**HPLC:** *High-performance liquid chromatography* (cromatografía líquida de alta eficiencia)

**HRMS:** *High-resolution mass spectrometry* (espectrometría de masas de alta resolución)

**HS:** *Head-space* (espacio de cabeza)

**HSes.:** Hidrocarburos sesquiterpénicos

**HTerp.:** Homoterpeno

**IF:** *Isomerization factor* (factor de isomerización, isomerasa)

**IRL:** índice(s) de retención lineal(es)

**LC-MS:** *Liquid chromatography-mass spectrometry* (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)

**LC-qTOF-MS:** *Liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry* (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo)

**LC:** *Liquid chromatography* (cromatografía líquida)

**LOX:** *Lipoxygenases* (lipoxigenasas)

**MO:** Monoterpenos oxigenados

**MS:** *Mass spectrometry* (espectrometría de masas) / *mass spectrum* (espectro de masas)

**MSPD:** *Matrix-solid phase dispersion* (dispersión de la matriz en fase sólida)

**m/z:** Relación masa/carga

**N.D.:** No detectado

**N.I.:** No identificado

**N.S.:** No significativo

**OCO:** Otros compuestos oxigenados

**P&T:** Purga y trampa

**PA:** *Pyrrrolizidine alkaloids* (alcaloides pirrolizidínicos)

**PDMS:** Poli(dimetilsiloxano)

**PDVF:** *Polyvinylidene difluoride* [fluoruro de poli(vinilideno)]

**PEG:** Poli(etilenglicol)

**PTFE:** Poli(tetrafluoroetileno)

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**SO:** Sesquiterpenos oxigenados

**SPE:** *Solid-phase extraction* (extracción en fase sólida)

**SPME:** *Solid-phase microextraction* (microextracción en fase sólida)

**UHPLC:** *Ultra-high pressure liquid chromatography* (cromatografía líquida de ultra alta eficiencia)

**VIE:** Vicerrectoría de Investigación y Extensión

### Resumen

**Título:** Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos y compuestos orgánicos volátiles en *Crotalaria* spp. (Fabaceae) inducidos por herbivoría con *Utetheisa ornatix* (Lepidoptera)\*

**Autor:** Fausto PRADA CHAPARRO\*\*

**Palabras clave:** GC-MS, LC-*Orbitrap*-MS, SPME, P&T, alcaloides pirrolizidínicos, compuestos volátiles inducidos por herbivoría.

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios para su supervivencia en diferentes ecosistemas, reaccionar al ambiente e interactuar con los organismos circundantes. Los mecanismos que usan las plantas para defenderse de los herbívoros tienen potencial como herramientas de control de plagas en cultivos comerciales, reducir la utilización de pesticidas tóxicos y proveer una agricultura sostenible y amigable con el ambiente. No obstante, estas interacciones son muy complejas y aún se desconocen las funciones que cumplen muchos de estos compuestos.

En la presente investigación se evaluó el rol que juegan los alcaloides pirrolizidínicos (PA) y los compuestos orgánicos volátiles inducidos por herbivoría (HIPV) en la interacción entre plantas del género *Crotalaria* y las polillas *Utetheisa ornatix*. Los PA se extrajeron y analizaron por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y LC-MS (*Orbitrap*), respectivamente, mientras que los HIPV se extrajeron usando SPME o en un sistema de purga y trampa (P&T) y se analizaron por GC-MS.

Se detectaron 52 PA por LC-MS, 45 en plantas de *C. retusa*, *C. pallida*, *C. spectabilis*, *C. incana*, *C. maypurensis*, *C. nitens* y siete adicionales en *U. ornatix*. Los PA presentes en hojas o semillas de algunas especies de *Crotalaria* se acumularon en las orugas *U. ornatix*, se transformaron y transfirieron durante todas las etapas de la vida del insecto. Se identificaron nueve PA no reportados previamente en literatura, siete en plantas de *Crotalaria* y dos biosintetizados por las polillas *U. ornatix*. El insecto utilizó los PA como defensa química contra sus depredadores. Las plantas de *C. nitens* emitieron 21 volátiles en respuesta al ataque de las orugas *U. ornatix*. La mezcla de HIPV repelió las polillas *U. ornatix*, evitando su oviposición en plantas de *C. nitens* previamente atacadas. Muchos de los volátiles emitidos por *C. nitens* han mostrado funciones ecológicas que pueden aprovecharse como estrategia de control biológico de insectos herbívoros.

---

\*Tesis de doctorado.

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Programa de Doctorado en Química.

Directores: Prof. Elena E. Stashenko, Ph.D., Prof. Jairo René Martínez, Ph.D.

### Abstract

**Title:** Variation in the content of pyrrolizidine alkaloids and volatile organic compounds in *Crotalaria* spp. (Fabaceae) induced by herbivory with *Utetheisa ornatrix* (lepidoptera)\*

**Author:** Fausto PRADA CHAPARRO\*\*

**Key words:** GC-MS, LC-Orbitrap-MS, SPME, P&T, pyrrolizidine alkaloids, herbivory-induced plant volatiles.

Plants produce secondary metabolites to help them survive in different ecosystems, to react to changing environmental conditions and to interact with surrounding organisms. The mechanisms that plants use to defend themselves from herbivores have the potential as tools for controlling pests in commercial crops, thereby reducing the use of toxic pesticides and providing sustainable and environmentally friendly agriculture. However, these interactions are very complex and the functions that many of these compounds perform are still unknown.

In the research presented here, the role of pyrrolizidine alkaloids (PA) and herbivory-induced plant volatiles (HIPV) in the interaction between plants of the genus *Crotalaria* and the moth *Utetheisa ornatrix* was evaluated. The PAs were extracted and analyzed by solid-phase matrix dispersion (MSPD) and LC-MS (Orbitrap), respectively, while the HIPVs were extracted using SPME or a purge and trap system (P&T) and analyzed by GC-MS.

Fifty-two PAs were detected by LC-MS, 45 in *C. retusa*, *C. pallida*, *C. spectabilis*, *C. incana*, *C. maypurensis*, *C. nitens* plants and other seven in *U. ornatrix*. The PAs present in leaves or seeds of some *Crotalaria* species were accumulated in *U. ornatrix* caterpillars and they were transformed and transferred during all stages of the insect's life. The insects use the PAs as chemical defense against their predators. Nine novel PAs were identified, seven in *Crotalaria* plants and two biosynthesized by *U. ornatrix* moths. No previous reports were found of these compounds in the literature. The *C. nitens* plants emitted 21 volatiles in response to the attack by the *U. ornatrix* caterpillars. The HIPV mixture repelled the *U. ornatrix* moths, preventing their oviposition in previously attacked *C. nitens* plants. Many of the volatiles emitted by *C. nitens* have shown ecological functions that could be exploited as a biological control strategy for herbivorous insects.

---

\*Doctoral thesis.

\*\*Faculty of Sciences. School of Chemistry. Doctoral Program in Chemistry.

Thesis supervisors: Prof. Elena E. Stashenko, Ph.D., Prof. Jairo René Martínez, Ph.D.

## Introducción

En los últimos 50 años la población humana se ha duplicado en número, pasó de 3,7 mil millones en 1970 a 7,7 mil millones en 2019 (<https://worldpopulationreview.com>) y se estima que será casi 10 mil millones para mediados de este siglo (Crist y col., 2017). En consecuencia, existe mayor demanda de alimentos e incremento en el uso del suelo en los cultivos agrícolas (Crist y col., 2017). La necesidad de producir más con menos pérdidas económicas por el efecto negativo de las plagas se logró desde hace décadas con la introducción de los agroquímicos (Carvalho, 2006). Debido a la adaptación de los insectos al uso de plaguicidas, cada año se utilizan nuevos compuestos químicos en cantidades más altas para proteger los cultivos. Sin embargo, los pesticidas generan un impacto negativo inmenso en los ecosistemas. Muchas aves, organismos acuáticos, animales y afluentes de agua potable están bajo la amenaza por los pesticidas dañinos (Ullah y Zorriehzahra, 2015), la exposición directa o consumo de pesticidas causan daño en el ADN (Ojha y col., 2013). En general, el uso excesivo de pesticidas en los cultivos se ha convertido en preocupación para la sostenibilidad del medio ambiente y la estabilidad ecológica global (Mahmood y col., 2016). El desafío actual es alimentar a más personas con el menor daño ambiental posible (Crist y col., 2017).

Las plantas y los insectos han coexistido durante al menos 350 millones de años. Durante este período se desarrollaron interacciones, tanto benéficas para la planta (*e.g.*, polinización) o perjudiciales como los insectos herbívoros que devoran sus hojas y raíces (Mithöfer y col., 2009). Las plantas se defienden de los herbívoros sintetizando una cantidad de metabolitos secundarios especializados con los que manipulan la fisiología y el comportamiento de insectos y otros organismos (Mithöfer y col., 2009). Los alcaloides y fenilpropanoides funcionan como toxinas de defensa directa, mientras que los compuestos orgánicos volátiles inducidos por

herbivoría (HIPV), como los volátiles de hojas verdes (GLV, *e.g.*, acetato de *cis*-3-hexenilo), terpenoides (*e.g.*, *trans*- $\beta$ -cariofileno) y compuestos aromáticos (*e.g.*, indol), juegan un papel importante en la defensa indirecta de las plantas, atrayendo enemigos naturales de los mismos (Kessler y Baldwin, 2001; Mithöfer y Boland, 2012). Entender el papel que cumplen los metabolitos secundarios en la defensa química de las plantas y su interacción con otros organismos, permitirá aprovechar el legado de los 350 millones de años de evolución y generar estrategias de control de plagas de los cultivos comerciales y, con ello, disminuir o sustituir el uso de pesticidas tóxicos para el ambiente y la salud humana. Una de las estrategias que funciona de manera consistente, es el empleo de plantas con emisión de compuestos volátiles que atraen o repelen específicamente algunos insectos. El sistema se denomina repulsión-atracción. Las plantas, que repelen los insectos plaga, se siembran intercaladas en el cultivo (*repulsión*), mientras que otras plantas, a los alrededores para atraerlos (*atracción*) (Cook y col., 2007). Sin embargo, el control biológico usando volátiles, aún no es generalizado en la agricultura, a menudo por el desconocimiento de las funciones ecológicas de los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas o por la complejidad de sus interacciones con los insectos y demás organismos circundantes (Heil, 2014).

En el presente estudio se utilizó el modelo de interacción entre plantas del género *Crotalaria* (Familia Fabaceae) y la polilla *Utetheisa ornatrix* (Lepidóptera: Erebidae). El objetivo de la presente investigación fue estudiar el papel que desempeñan algunos metabolitos secundarios en la interacción planta-insecto. El género *Crotalaria* tiene alrededor de unas 600 especies que crecen en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. La mayoría se encuentran en África y Madagascar, hay 20 reportadas en Colombia (Bernal, 1986). Algunas especies de *Crotalaria* se utilizan en la agricultura para fijar nitrógeno en el suelo (Devi y col.,

2013), y otras, se usan en medicina tradicional (Roeder, 1995; Roeder, 2000; Roeder y col., 2015). No obstante, estas plantas sintetizan alcaloides pirrolizidínicos (PA) y sus *N*-óxidos, que pueden ser tóxicos para el ganado (Fletcher y col., 2009; Diaz, 2015), ovejas (Nobre y col., 2005), aves y humanos (Álvarez, 2003; Stashenko, 2011; Diaz y col., 2014). La presencia de PA en *Crotalaria* se registró por primera vez en 1935, cuando se aisló la monocrotalina de semillas de *C. spectabilis* (Neal y col., 1935). La composición química de PA en varias especies *Crotalaria* se estudió en Etiopía (Asres y col., 2004), Australia (Fletcher y col., 2009) y Brasil (Flores y col., 2009; Martins y col., 2015) por GC-MS. Por LC-MS se han reportado los PA en *C. sessiliflora* L. en China analizados por LC-qOrbitrap-MS (Zhang y col., 2017) y cuatro PA en *C. retusa* en Costa de Marfil usando LC-qTOF-MS (Sinan y col., 2020). No se encontraron reportes de la caracterización química de PA en especies de *Crotalaria* en Colombia.

La primera fase de este proyecto de investigación consistió en la prospección de especies de *Crotalaria* presentes en los alrededores de Bucaramanga, Santander (Colombia) y la caracterización de sus PA. Se encontraron seis especies de *Crotalaria* (*C. retusa* L., *C. pallida* Aiton, *C. spectabilis* Roth, *C. incana* L., *C. maypurensis* Kunth, and *C. nitens* Kunth). Se implementó el método de extracción de los PA por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). La identificación de los PA se realizó combinando la información cromatográfica y espectroscópica obtenida por GC-MS y LC-MS (*Orbitrap*). La proposición de rutas de fragmentación como resultado del análisis de los espectros de masas de alta resolución (*Orbitrap*) de materiales de referencia de retronecina, heliotrina y monocrotalina deuterados y sin deuterar y la interpretación de los patrones de fragmentación de los PA extraídos, permitió la identificación de varios PA no reportados previamente en literatura. Se identificaron en total 45

PA y algunos de sus *N*-óxidos presentes en diferentes partes de las plantas de *Crotalaria* colectadas.

La biosíntesis de PA en plantas del género *Crotalaria* y otros géneros de las familias Boraginaceae y Asteraceae, se ha asociado con mecanismos de defensa contra herbívoros y otros organismos (Trigo, 2011; Martins y col., 2015; Cogni y Trigo, 2016). Sin embargo, algunas polillas, incluida *U. ornatrix* (Martins y col., 2015), superaron esta defensa química y acumulan los PA en sus tejidos, los mantienen, transforman durante la metamorfosis del insecto y los usan para su propia defensa contra el ataque de hormigas, arañas, lagartos y aves (van Dam y col., 1995). Eisner (1982) reportó por primera vez que los PA provenientes de plantas de *C. pallida* estaban relacionados con la defensa química de *U. ornatrix*. Estudios posteriores de Hoina y col. (2013) demostraron que las orugas prefieren plantas con altas concentraciones de PA. Martins y col. (2015) determinaron que la defensa de *U. ornatrix* era dependiente de la especie de *Crotalaria* y de la concentración de PA en el alimento. Sin embargo, no se conoce si la diversidad química de los PA en el alimento modifica el comportamiento de oviposición y la acumulación o transformación de PA en *U. ornatrix*. Los estudios de la presente investigación y de trabajos previos (Asres y col., 2004; Fletcher y col., 2009; Flores y col., 2009) revelaron una composición diversa de PA en las especies de *Crotalaria*. En la segunda fase del proyecto, se determinó si la diversidad y el contenido de alcaloides en las hojas/semillas de la especie de *Crotalaria*, tenían efecto en la preferencia en oviposición, para que su descendencia pueda acumular más alcaloides y los adultos se protejan mejor de posibles depredadores (Lefèvre y col., 2012). También se evaluó si la variación en la estructura química de los PA de la fuente de alimento, afecta la acumulación y composición química de los PA transformados por el insecto. La preferencia en la oviposición de las polillas *U. ornatrix* se estudió en cuatro especies de

*Crotalaria*. *C. retusa* y *C. nitens* con más contenido de PA en hojas y semillas en comparación con *C. pallida* y *C. incana*. Estas especies también se diferenciaban en la composición de PA. Las orugas, provenientes del experimento de oviposición, se alimentaron con las hojas o semillas de las cuatro especies de *Crotalaria* para determinar la acumulación y transformación de los PA en diferentes estados de *U. ornatix*. La composición de PA en el alimento y en las orugas, polillas y sus huevos se realizó por extracción MSPD y análisis LC-MS (*Orbitrap*). Los resultados mostraron que, al contrario de lo esperado, las polillas prefirieron poner sus huevos en especies de *Crotalaria* con bajo contenido de PA en hojas o semillas. Existieron otros factores que afectaron el comportamiento de oviposición de la polilla y no fue necesariamente la concentración de PA en la planta hospedero. Además, las orugas *U. ornatix* acumularon y biotransformaron los alcaloides según el contenido y composición química de los PA de la fuente de alimento.

Los resultados de los experimentos de la presente investigación mostraron que *U. ornatix* se beneficia de los PA y su consumo no generó efectos negativos en el insecto (Cogni y col., 2012). Entonces, ¿qué hacen las plantas de *Crotalaria* para defenderse? Las plantas poseen diversos mecanismos físicos, morfológicos, enzimáticos y químicos para hacer frente al ataque de herbívoros. Los metabolitos secundarios pueden intervenir de manera directa (*e.g.*, alcaloides) afectando las etapas de desarrollo o actuando como factores anti-alimentarios en los organismos agresores, o de manera indirecta, para atraer hormigas con una solución azucarada de los nectarios extraflorales y disuadir los agresores, o emitir volátiles para atraer los enemigos naturales de los herbívoros (Kessler y Baldwin, 2001; Mithöfer y Boland, 2012). La acción de los HIPV se ha demostrado en experimentos controlados en plantas de interés comercial como el tomate (*Lycopersicon hirsutum*), el maíz (*Zea mays*), romero (*Rosmarinus officinalis*), yuca

(*Yucca filamentosa*), algodón (*Gossypium hirsutum*) y en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y plantas silvestres de tabaco (*Nicotiana attenuata*) (Das y col., 2013), pero no hay reportes en plantas de *Crotalaria*.

En la tercera y última fase, se estudiaron los cambios en la composición de alcaloides y de HIPV emitidos por hojas de *C. nitens* atacadas con orugas *U. ornatrix*. Los HIPV se extrajeron con una fibra de 65  $\mu\text{m}$  recubierta con PDMS/DBV [poli(dimetilsiloxano)/poli(divinilbenceno)] soportada en un sistema de micro-extracción en fase sólida (SPME) o con un sorbente Porapak-Q, en un sistema de purga y trampa (P&T). El análisis se realizó por GC-MS en una columna DB-WAX (60 m). Al inicio del ataque de las orugas *U. ornatrix*, las plantas de *C. nitens* liberaron GLV (e.g., acetato de *cis*-3-hexenilo) y, posteriormente, emitieron terpenoides (e.g., *trans*- $\beta$ -cariofileno), aldoximas (e.g., 2-metil-propilaldoxima) y compuestos aromáticos (e.g., indol), los cuales, se detectaron en muy bajas concentraciones cuando *C. nitens* sufrió daño mecánico. En el último ensayo, se determinó que los HIPV emitidos por las hojas de *C. nitens* repelieron y disminuyeron la oviposición de polillas hembras *U. ornatrix* en las plantas atacadas.

El presente estudio, demostró que los PA y los volátiles hacen parte importante en la interacción entre las plantas de *Crotalaria* y la polilla *U. ornatrix*. Las orugas acumulan los PA de la planta, los transforman y transfieren durante todas las etapas del ciclo de vida. El ataque de las orugas *U. ornatrix* indujeron la emisión de una mezcla de volátiles en hojas de *C. nitens*. Los volátiles repelieron las polillas *U. ornatrix* y redujeron la proporción de huevos en las plantas de *C. nitens* con daño. Estos resultados confirmaron la capacidad que tienen los volátiles en alterar el comportamiento de los insectos y su potencial para desarrollar herramientas en el control de plagas con aplicaciones sustentables y amigables con el ambiente en cultivos comerciales.

Esta investigación fue co-financiada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, contrato **RC-FP44842-212-2018**, programa Bio-Reto XXI-15:50. También contó con la co-financiación de la Universidad Industrial de Santander–VIE, **proyecto 1786-2015**, así como la co-financiación de COLCIENCIAS (actualmente Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación) en el marco del proyecto “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana”, ejecutado por la Unión Temporal Bio–Red–CO–CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander, a través del Centro de Investigación de Biomoléculas CIBIMOL; contrato **RC-0572-2012**, además, tuvo el apoyo de COLCIENCIAS (actualmente Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación), en la financiación de mis estudios de doctorado (Convocatoria Doctorados Nacionales 617/2013).

El estudio de las especies de *Crotalaria* estuvo avalada por el *Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica N° 101*, entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio–Red–CO–CENIVAM. La recolección de los especímenes de *U. ornatix* (Lepidóptera: Erebidae) se realizó bajo el convenio marco UIS, resolución 1412 de 2012 del ANLA. La cría y utilización de los especímenes de *U. ornatix* estuvo avalado por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI–UIS), según acta N° 6 del 13 de abril de 2018 (**Apéndice A**). Los especímenes adultos e inmaduros remanentes del proyecto se registraron y depositaron en la Colección Entomológica del Museo de Historia Natural de la UIS, según constancia del 8 de octubre de 2019 (**Apéndice B**).

Los resultados parciales de la investigación se publicaron en una revista indexada y se presentaron en eventos científicos:

Prada F., Stashenko E. E., Martínez J. R. (2020). LC/MS study of the diversity and distribution of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species growing in Colombia. *J. Sep. Sci.*, <https://doi.org/10.1002/jssc.202000776>.

Prada F., Ñañez N., Zambrano J., Martínez J. R., Stashenko E. (febrero 2018). Plant volatiles and pyrrolizidine alkaloids related with the interaction between *Crotalaria nitens* leafs and *Utetheisa ornatrix* larvae. Gordon Research Conference, GRC Plant Volatiles: The role of plant volatiles in communication (Barga, Italia).

Prada F., Martínez J.R., Stashenko E. (septiembre 2017). Fatty acid composition and pyrrolizidine alkaloids in oils from six *Crotalaria* species (fabaceae) growing in the wild in Colombia. International Conference in Renewable Plant Resources: Chemistry, Technology, Medicine, (San Petersburgo, Rusia).

Zambrano J. A., Prada F., Martínez J. R., Stashenko E. E. (agosto 2016). Acumulación de alcaloides pirrolizidínicos en orugas (*Utetheisa ornatrix*) alimentadas con hojas y semillas de *Crotalaria nitens*. IV Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales – COLAPLAMED, (Barranquilla, Colombia).

Prada F., Bautista Y., Martínez J. R., Stashenko E. (febrero 2016). Solid-phase microextraction of volatile organic compounds from *Crotalaria nitens* Kunth under herbivory and mechanical wound stresses. Gordon Research Conference, GRC Plant Volatiles: Diversity of targets, effects and applications of plant volatiles, (Ventura, CA, EE. UU.).

Prada F.; Martínez J. R.; Stashenko E. (mayo 2015). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in five *Crotalaria* accessions collected in Colombia, 39<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC) (Fort Worth, TX, EE. UU.).

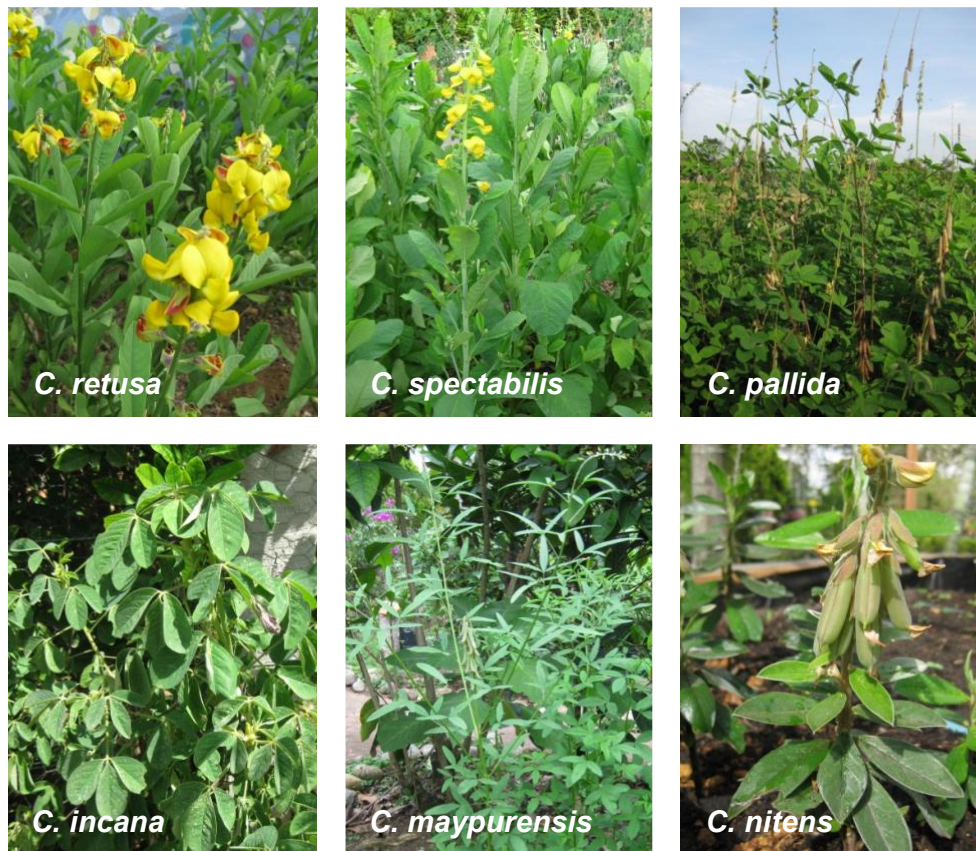
## 1 Estado del arte

### 1.1 Plantas del género *Crotalaria*

El género *Crotalaria* (Familia Fabaceae) tiene alrededor de unas 600 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. África y Madagascar cuentan con 543 especies, mientras que en América hay 89 especies registradas. Colombia cuenta con 20 especies (<http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>), que se encuentran entre los 0–3400 m sobre el nivel del mar. En el presente estudio se encontraron seis de estas 20 (**Figura 1**), de las cuales, *C. pallida* y *C. retusa* son originarias de África y Asia, *C. spectabilis* es de la India, *C. incana* se ha reportado en África, Asia y América, y *C. nitens* y *C. maypurensis* son de Centro y Norte de Sur América (Bernal, 1986).

El nombre común de la *Crotalaria* en Colombia es “cascabel”, “sonaja”, “campanita” o “hierba de sapo”. Son plantas anuales o perennes, pueden ser erectas o arbustos de entre 0,5 m y 2,5 m de altura. Unas especies tienen hojas unifoliadas y otras trifoliadas, en todas, sus flores son amarillas (Bernal, 1986). Algunas especies del género *Crotalaria* se usan en la agricultura para controlar poblaciones de nemátodos y fijar nitrógeno en el suelo, hasta 83 kg/ha (Samba y col., 2002). En Colombia, las especies *C. incana* y *C. pilosa* se utilizan en forma de baños para desinfectar heridas (García-Barriga, 1992) y la *C. verrucosa* se usa para tratar la sarna. Las especies *C. agatiflora*, *C. micans*, *C. paulina* y *C. spectabilis* tienen uso ornamental (García-Barriga, 1992). Los flavonoides aislados de tallos y semillas de *C. pallida* y *C. assamica* poseen actividad antiinflamatoria (Ko y col., 2004).

**Figura 1.** Ejemplares del género *Crotalaria* que se estudiaron en el presente trabajo. Fotos del autor, parcelas experimentales CENIVAM–UIS, Bucaramanga, junio de 2016.

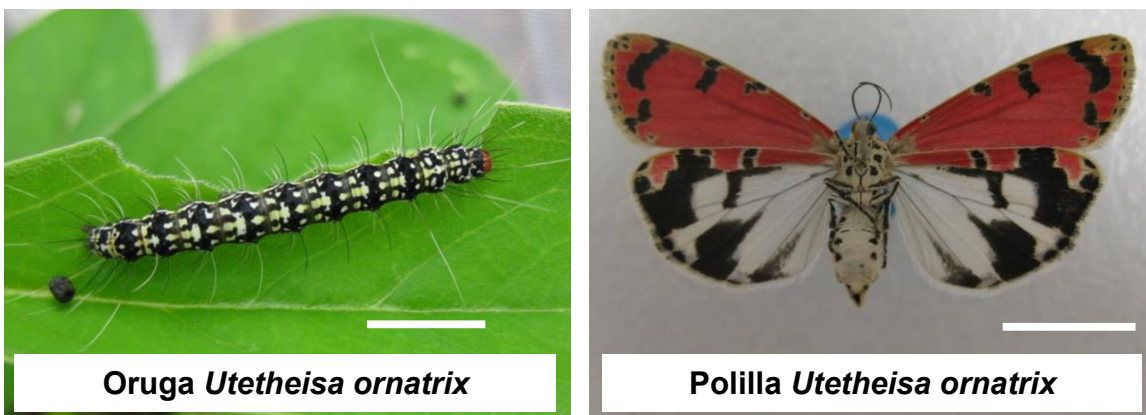


Las semillas de *Crotalaria* son buenas fuentes de fibra cruda (0.9–6.3%), proteínas (19.4–35.9%) y aceite vegetal (0.8–5.3%) (Noor y Said, 2011). Sin embargo, las plantas del género *Crotalaria* sintetizan PA y sus *N*-óxidos, que son tóxicos para la vida silvestre, los animales domésticos, el ganado, gallinas ponedoras y humanos (Roulet y col., 1988; Chen y col., 2010; EFSA, 2017; Ma y col., 2018). En el 2003, se reportó un caso de intoxicación y muerte de una gran cantidad de pollos y gallinas por contaminación con semillas de *C. retusa*, lo que causó pérdidas económicas considerables al sector avícola en la zona de Lebrija, Santander (Colombia) (Stashenko, 2011).

## 1.2 *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Erebidae)

La polilla *U. ornatrix* pertenece al reino Animalia, filo Arthropoda, clase Insecta, orden Lepidoptera, familia Erebidae y género *Utetheisa*. La polilla fue descrita por primera vez por Carlos Linneo en 1758 y clasificada en el género *Utetheisa* por Hübner (Weller y col., 2009). Se ha descrito que solamente se alimenta de plantas del género *Crotalaria*, por lo tanto, *U. ornatrix* se distribuye en los mismos sitios donde se encuentren estas plantas, es decir, desde el sur de Estados Unidos, hasta el norte de Sur América. Las orugas pueden medir entre 30 mm y 35 mm de longitud y las polillas pueden medir entre 29 mm y 42 mm en su envergadura. Son de color naranja, rosado y marrón con bandas negras irregulares en cada segmento (**Figura 2**). Su ciclo biológico desde huevo hasta el paso a adulto tarda alrededor de 42 días (Signoretti y col., 2008).

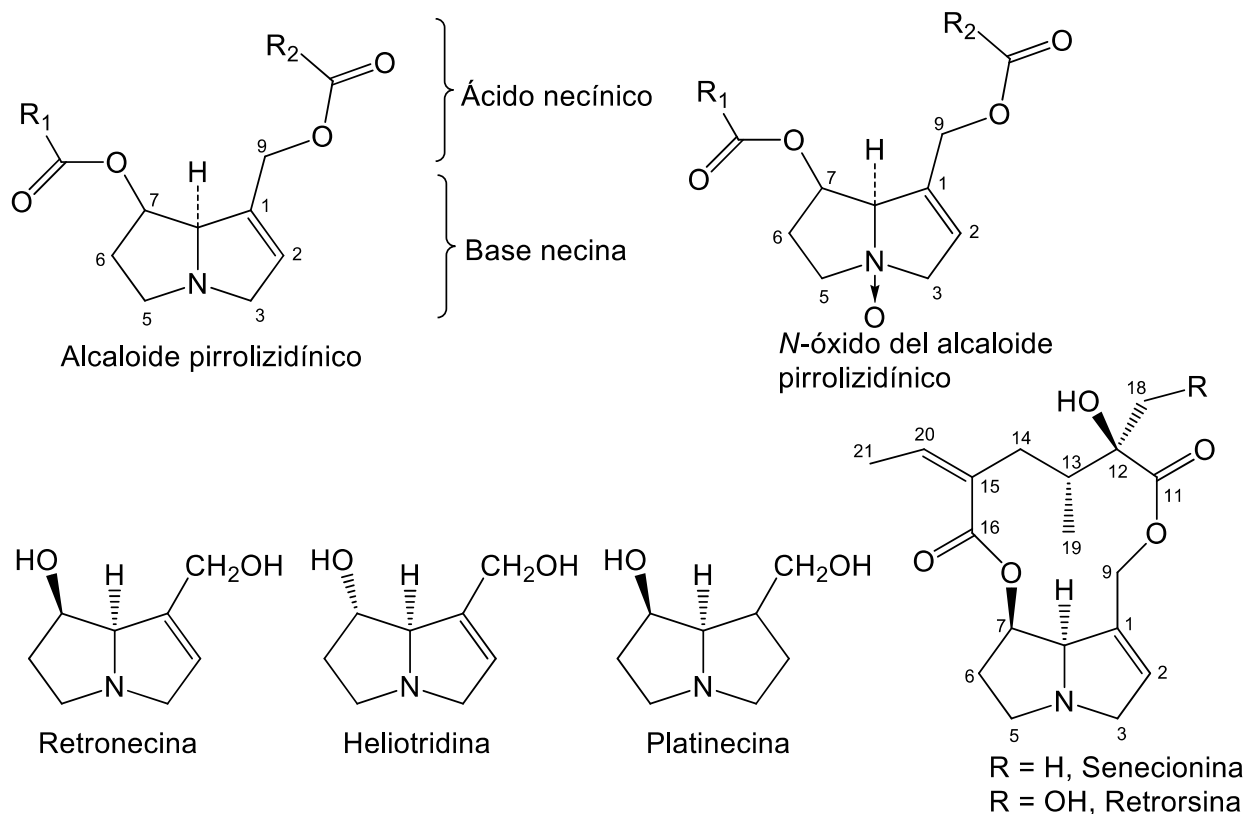
**Figura 2.** Ejemplo de oruga *U. ornatrix* alimentándose de hojas de *C. nitens* y vista dorsal de una polilla hembra montada en la colección del Museo de Historia Natural, UIS. Montaje: Juliette Gualdrón, fotos del autor, noviembre 2019 (barra de escala = 1 cm).



### 1.3 Alcaloides pirrolizidínicos

Los PA se sintetizan a partir de la L–ornitina o la L–arginina a través de la putresina (Ober y Kaltenecker, 2009). Cuando se encuentra hidroxilados, se conocen como necinas, que puede ser 1,2–insaturadas (retronecina) o saturadas (platinecina). Las estructuras derivadas de necina se pueden esterificar con diferentes ramificaciones dando forma a la variedad de estructuras presentes en la naturaleza (**Figura 3**). Los PA se pueden oxidar en el nitrógeno para producir *N*–óxidos. Los *N*–óxidos tienen naturaleza más polar que las bases nitrogenadas, lo que aumenta su solubilidad en agua o en solventes orgánicos polares (El-Shazly y Wink, 2014).

**Figura 3.** Estructuras básicas de alcaloides pirrolizidínicos y sus *N*–óxidos (Hartmann, 1999; El-Shazly y Wink, 2014).



La presencia de PA en *Crotalaria* ha sido objeto de investigación desde 1935, cuando se aisló por primera vez el principio tóxico (monocrotalina) en semillas de *C. spectabilis* (Neal y col., 1935). Desde entonces, se han reportado más de 600 PA provenientes de plantas de las familias Boraginaceae (género: *Heliotropium*, *Trichodesma*, *Symphytum*), Compositae (género: *Senecio* y *Eupatorium*), Scrophulariaceae (género *Castilleja*) y Fabaceae (género *Crotalaria*) (Hartmann y Witte, 1995). Risk (1990) y Witte y col. (1993) hicieron una revisión de las diferentes estructuras de PA descritas hasta entonces. En 2004, se caracterizaron, por primera vez, los PA en varias especies de *Crotalaria* (Etiopía) (Asres y col., 2004). En 2009, se publicaron dos trabajos sobre la composición de PA en semillas de 24 especies de *Crotalaria* presentes en Australia (Fletcher y col., 2009) y 28 especies recolectadas en Brasil (Flores y col., 2009; Martins y col., 2015). En los tres estudios se usaron criterios de identificación basados en índices de retención lineales (IRL) y en el análisis y comparación de espectros de masas, obtenidos por el impacto con electrones (EI, 70 eV). Se detectaron 37 PA en diferentes partes de plantas de *Crotalaria* de Etiopía, 33 PA en semillas de *Crotalaria* de Australia y 38 en Brasil. La cantidad de PA en semillas de *Crotalaria* variaron entre 0,04 mg/g y 71 mg/g en semilla (Fletcher y col., 2009). Hay muy pocos trabajos determinando los PA en *Crotalaria* por LC-MS. Se detectaron cinco PA *C. sessiliflora* L. en China analizados por LC-qOrbitrap-MS (Zhang y col., 2017). y cuatro PA en *C. retusa* de Costa de Marfil detectados por LC-qTOF-MS (Sinan y col., 2020). En la revisión bibliográfica, no se encontró información sobre la composición de PA en las especies de *Crotalaria* que crecen en Colombia.

### 1.3.1 Extracción y análisis de alcaloides pirrolizidínicos

La gran variedad de estructuras de PA y la presencia de *N*-óxidos requiere extracciones eficientes, mientras que la complejidad de las matrices demanda procesos de limpieza posteriores

a la extracción. Los PA y sus *N*-óxidos son compuestos polares y su extracción se realiza normalmente con metanol, metanol acidulado, ácido clorhídrico o sulfúrico acuosos diluidos (Crews y col., 2010). La limpieza de los extractos se realiza generalmente por extracción en fase sólida (SPE) de intercambio catiónico. Este procedimiento se ha reportado para la obtención de extractos de PA de flores y raíces de plantas (Smyrska-Wieleba y col., 2017), leche, huevos, productos cárnicos y suplementos alimenticios a base de plantas (Mulder y col., 2018), miel (Carpinelli de Jesus y col., 2019) e hierbas medicinales (Suparmi y col., 2020), entre otros. Aunque el uso de SPE de intercambio catiónico permite superar varios problemas de contaminación en las matrices, el procedimiento requiere muchos pasos analíticos para llegar al extracto que se analiza en el cromatógrafo. En la presente investigación, se propuso el método MSPD (Barker y col., 1989) para la extracción de PA en tejido vegetal. En la MSPD, la muestra se macera para destruir la matriz que contiene los analitos con ayuda de un agente dispersante, *e.g.*, arena, flourisil, sílice, sílice-C<sub>8</sub> o sílice-C<sub>18</sub>. El agente dispersante funciona como abrasivo y al mismo tiempo interacciona físicamente con la matriz favoreciendo la extracción de los analitos o reteniendo las impurezas. El macerado resultante se coloca en una columna y los analitos se eluyen con el solvente apropiado. La MSPD es una técnica que ha mostrado ser eficaz, rápida y disminuye el uso de grandes cantidades de solvente (Barker, 2007). Las muestras se inyectan directamente por LC-MS. En el caso de requerir el análisis por GC-MS, los *N*-óxidos se reducen a sus respectivas bases libres antes de su análisis.

La GC-MS se ha usado ampliamente para el análisis de los PA. Ofrece las ventajas de identificarlos por comparación de los IRL con los reportados en literatura, así como con los espectros de masas presentes en bases de datos (Ma y col., 2018). Sin embargo, los *N*-óxidos son muy polares, térmicamente inestables y no es posible analizarlos por GC-MS. Mientras tanto, la

LC-MS, con ionización por electronebulización (ESI), ofrece la ventaja de la detección simultánea de PA y sus *N*-óxidos, estos instrumentos reducen los pasos en la preparación de muestras debido a que evitan la reducción de *N*-óxidos a las bases libres necesarias para el análisis de GC-MS y, por lo tanto, reduce el riesgo de degradación de los analitos (Crews y col., 2010). Además, las celdas de fragmentación en los instrumentos MS/MS permiten obtener información estructural adicional de los PA, *e.g.* los iones característicos en *m/z* 138, 136, 120, 118 y 94 son importantes para identificar los PA y los *N*-óxidos de alcaloides 1,2-insaturados tipo retronecina (Ruan y col., 2012; Avula y col., 2015). La baja disponibilidad de materiales de referencia es un problema para identificar y cuantificar los PA, especialmente, en muestras provenientes de plantas silvestres con pocos estudios reportados en literatura. Sin embargo, el acoplamiento LC-MS (*Orbitrap*) proporciona alta sensibilidad, información sobre masas exactas, fórmulas moleculares y la fragmentación característica para identificar la base necina de los PA desconocidos. Actualmente, se prefiere el análisis de los PA y sus *N*-óxidos por LC-MS (Ruan y col., 2012; Avula y col., 2015; Zhang y col., 2017; Ma y col., 2018). Se pueden encontrar muchos reportes de su análisis en suplementos dietéticos (Avula y col., 2015), plantas de los géneros *Senecio*, *Gynura* y *Parasenecio* (Asteraceae) (Zhu y col., 2016), *Symphytum officinale* (Boraginaceae) (Liu y col., 2009) o *Heliotropium amplexicaule* (Boraginaceae) (Carpinelli de Jesus y col., 2019). No obstante, hay muy poca información disponible sobre el análisis e información por espectrometría de masas de alta resolución en PA provenientes de especies de *Crotalaria*.

### 1.3.2 Intercambio de hidrógeno/deuterio en alcaloides pirrolizidínicos

El intercambio de hidrógeno/deuterio (H/D) es una técnica para reemplazar los H lábiles con átomos de D en algunos enlaces con carbono (C-H), grupos amino (N-H), carbonilo (COO-

H), sulfuro (S–H) o hidroxilo (O–H) (Kostyukevich y col., 2018). Se ha utilizado para estudiar la estructura espacial e interacciones moleculares de proteínas (O'Brien y col., 2020) y elucidar las rutas de fragmentación en moléculas de bajo peso molecular (Kamel y col., 2002; Niu y col., 2017). Existen pocos reportes sobre la elucidación de las rutas de fragmentación en PA por LC–ESI–MS (Ruan y col., 2012; Avula y col., 2015), pero ninguno que aplique el intercambio H/D. Aprovechando las ventajas de la espectrometría de masas de alta resolución (*Orbitrap*) y la disponibilidad de hidrógenos lábiles en algunas moléculas de PA, se realizó el intercambio H/D para estudiar sus rutas de fragmentación y para elucidar algunas estructuras de compuestos desconocidos extraídos de las plantas de *Crotalaria*.

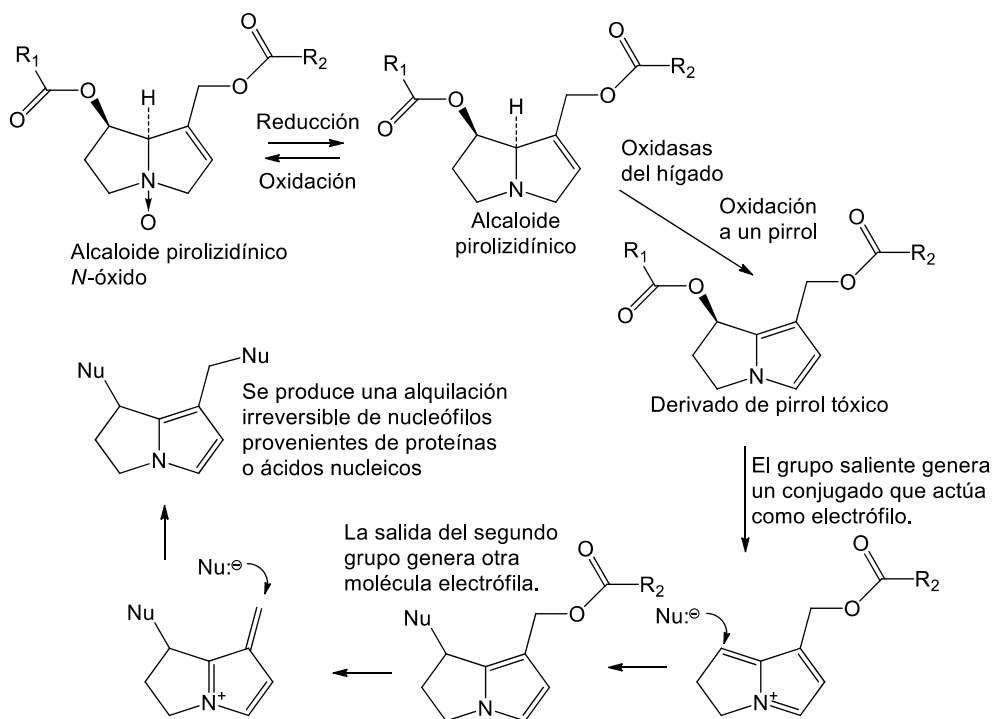
### 1.3.3 Toxicidad de los alcaloides pirrolizidínicos

Cuando las aves o los mamíferos ingieren accidentalmente los PA, la mayoría de ellos se excretan, pero una parte se metaboliza en el hígado. La toxicidad se debe a la conversión de los PA a los correspondientes derivados de pirrol (**Figura 4**), que son altamente reactivos y pueden alquilar proteínas y el ADN, a largo plazo, causan daño al hígado, pulmones y poseen actividad carcinogénica (Ma y col., 2018; He y col., 2019). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (2017) clasifica los PA como altamente tóxicos.

La síntesis de PA en las plantas está relacionado con la defensa química contra insectos herbívoros no especializados (Trigo, 2011; Macel, 2011). Los saltamontes, áfidos, pulgones, algunas mariposas, moscas, caracoles y nematodos se vieron afectados negativamente por los PA. En algunos casos, no pudieron completar su ciclo de vida, disminuyeron su peso o evitaron comer las hojas que contenían los PA (Trigo, 2011). Sin embargo, algunos herbívoros como las polillas *Estigmene acrea* (Krasnoff y Roelofs, 1989; Hartmann y col., 2005b), *Grammia geneura*

(Hartmann y col., 2005a), *Tyria jacobaeae* (Ehmke y col., 1990), *Callimorpha dominula* (Edgar y col., 1980; Clarke y col., 1996), *Gnophaela latipennis* (L'Empereur y col., 1989), *Hyalurga syma* (Trigo y col., 1993), *Cretonos transiens* (Hartmann y col., 1990) y *U. ornatix* (Trigo, 2011) no sufren efecto negativo por el consumo de plantas que contiene PA y, por el contrario, acumulan los alcaloides en sus tejidos y los usan para su propio beneficio, como defenderse de depredadores o sintetizar feromonas de cortejo (Trigo, 2011).

**Figura 4.** Ruta de transformación de los alcaloides pirrolizidínicos a compuestos tóxicos en el hígado de aves y mamíferos (Dewick, 2009).



#### 1.4 Acumulación y transformación de alcaloides pirrolizidínicos en *U. ornatix*

Thomas Eisner (1982) fue el primero en reportar que los PA provenientes de plantas del género *Crotalaria* estaban relacionados con la defensa química de *U. ornatix*. Luego, su grupo encontró que los adultos transforman los PA en precursores de feromonas sexuales (Eisner y

Meinwald, 1995). Durante el cortejo, el macho transfiere los PA a la hembra, y ésta los pasa a los huevos para su protección de depredadores (González y col., 1999). Estudios posteriores de Hoina y col. (2013) demostraron que las orugas prefirieron alimentos ricos en PA y Ferro y col. (2006) determinaron que las polillas, cuyas orugas acumularon mayor concentración de PA, se protegieron mejor del ataque de la araña *Nephila clavipes*. Las polillas provenientes de orugas alimentadas con semillas estaban 100% protegidos contra el ataque de *N. clavipes* mientras que en aquellos adultos cuyas larvas se alimentaron de hojas, la protección disminuyó un 40% (Martins y col., 2015). Aunque la oruga prefiere alimentos con mayor contenido de PA, no se conoce si la polilla tiene las mismas preferencias cuando decide en qué planta pondrá sus huevos. La hipótesis es que la polilla prefiere plantas con mayor contenido de PA para que su descendencia tenga más disponibilidad y acumulación de PA y mejor defensa química contra sus depredadores.

Los insectos que acumulan PA, tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces ésteres de los PA que adquiere de la planta y sintetizar sus propios PA. Los nuevos PA en el insecto se forman esterificando la base necina con sus propios ácidos necínicos. La callimorfina se describió por primera vez en 1968 como un PA sintetizado por las orugas de *T. jacobaeae* (Aplin y col., 1968) y luego se identificó como el 9-monoéster de la retronecina esterificada con el ácido 2-hidroxi-2-metilbutírico (Edgar y col., 1980). Otro grupo de compuestos biosintetizados por los insectos son las creatonotinas. Las más frecuentes son la creatonotina A, un derivado de la retronecina con ácido 2-hidroxi-3-metilbutanoico y la creatonotina B que es la retronecina derivada con el ácido 2-hidroxi-3-metilpentanoico. Se identificaron por primera vez en *C. transiens* en 1990 (Hartmann y col., 1990). Los resultados del trabajo de Martins y col. (2015) mostraron que *U. ornatix* biosintetiza estructuras tipo creatonotina. En el mismo trabajo, las orugas *U. ornatix* se

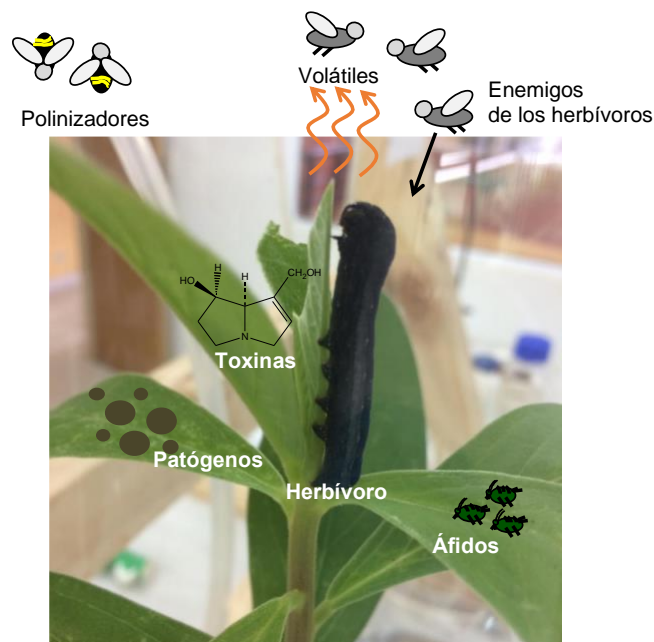
alimentaron con *C. micans*, *C. paulina*, *C. vitellina*, *C. juncea*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, *C. incana* y *C. pallida*. Los autores concluyeron que la transformación de los PA en el insecto, depende de la especie de *Crotalaria* con que se alimenten las orugas y que diferentes tipos de estructuras químicas de PA mostraron el mismo grado de defensa de las polillas *U. ornatix*. Sin embargo, un aspecto importante que no se ha estudiado es la relación entre la estructura química de los PA de la planta usada como alimento y la estructura química de los PA transformados por parte de *U. ornatix*. Para abordar este aspecto, en el presente estudio las orugas *U. ornatix* se alimentaron con hojas o semillas de cuatro especies de *Crotalaria* con diferente contenido y estructuras químicas de PA. La acumulación y transformación se monitoreó realizando extracción MSPD y análisis de los extractos por MSPD/LC-MS (*Orbitrap*).

### 1.5 Defensa química de las plantas

Las interacciones entre plantas y herbívoros son fundamentales en todos los ecosistemas. A pesar de que las plantas tienen diferentes formas de interactuar con su entorno, los mecanismos de reconocimiento, transducción de la señal y la expresión génica, son similares en muchas especies (Mithöfer y col., 2009). Se ha descrito que las plantas activan los mecanismos de defensa al daño de los herbívoros con inductores presentes en la saliva del insecto (Mithöfer y col., 2009). Las primeras respuestas de la planta son la despolarización de membrana y la producción de especies reactivas de oxígeno. En algunos casos, se activan inhibidores de proteínasa que reducen el valor nutritivo de los tejidos o interfieren con la digestión del herbívoro (Mithöfer y Boland, 2012). Se activan proteínas y fitohormonas (jasmonatos y etileno) que inducen la síntesis y liberación de metabolitos secundarios tóxicos cruciales para la defensa. Los compuestos tóxicos (*e.g.*, alcaloides) funcionan como defensa directa, mientras que los HIPV (*e.g.*, volátiles de hojas verdes y terpenoides) funcionan de

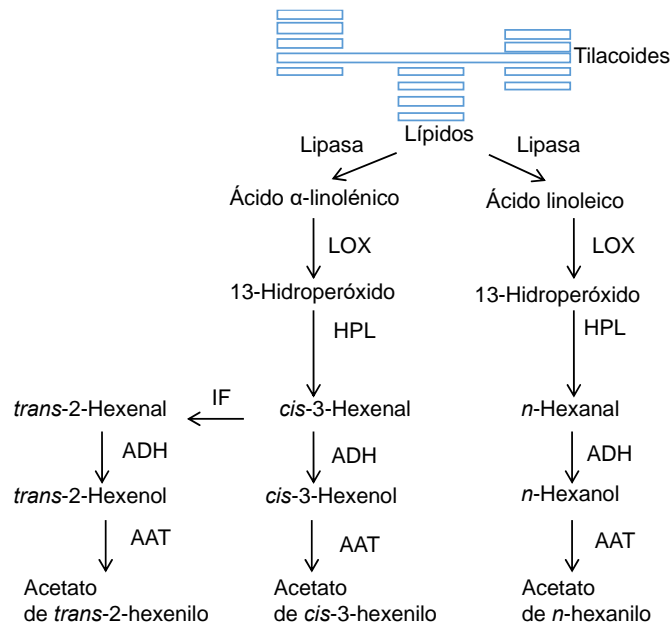
manera indirecta atrayendo depredadores o parasitoides de los herbívoros (**Figura 5**) (Mithöfer y col., 2009; Mithöfer y Boland, 2012).

**Figura 5.** El ataque de insectos herbívoros induce respuestas directas e indirectas en la planta. Síntesis, acumulación y emisión de metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, toxinas (alcaloides), emisión de volátiles (GLV–C<sub>6</sub>, terpenoides y compuestos aromáticos) (Dicke y Baldwin, 2010).



La mayoría de los volátiles emitidos por las plantas como respuesta al ataque de herbívoros se agrupan en volátiles–C<sub>6</sub> derivados de ácidos grasos conocidos como GLV (*e.g.*, *cis*–3–hexenal y acetato de *cis*–3–hexenilo), terpenos (mono–, di– y sesquiterpenos), compuestos aromáticos (*e.g.*, salicilato de metilo e indol), alcanos, alquenos y algunos alcoholes de bajo peso molecular (Maffei y col., 2007; Dicke y Baldwin, 2010). Los GLV se forman por la descomposición de los lípidos de la membrana (ácidos grasos insaturados, *e.g.* linolénico y linoleico), por la acción de las enzimas lipoxigenasa (LOX) y lipasa hidroperóxido (HPL) (Scala y col., 2013) (**Figura 6**).

**Figura 6.** Biosíntesis de volátiles de hojas verdes (GLV). Enzimas: LOX: 13-Lipoxigenasa; HPL: Liasa hidroperóxido; ADH: Deshidrogenasas; AAT: Acetiltransferasas y IF: Factor isomerasa (Scala y col., 2013).



Por otro lado, los terpenos que se forman por unidades de isopreno C<sub>5</sub>, pueden encontrarse como, monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) y tetraterpenos (C<sub>40</sub>) (Gershenzon y Dudareva, 2007). Estos metabolitos secundarios, representan el grupo más grande de moléculas pequeñas sintetizados por las plantas. Estos compuestos desempeñan funciones vitales en la fisiología de la planta y la membrana celular. Algunos terpenos son toxinas o tienen funciones ecológicas en interacciones antagónicas o mutualistas entre organismos (Baldwin y col., 2001; Gershenzon y Dudareva, 2007). Se ha reportado que, el monoterpeno linalool y el sesquiterpeno *trans*-β-farneseno, repelen herbívoros y áfidos, respectivamente. Los homoterpenos C<sub>11</sub>, *trans*-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) y el C<sub>16</sub>, 4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno han mostrado atracción de enemigos naturales de los herbívoros artrópodos, pero, al mismo tiempo, son atrayentes de polinizadores (Tholl y

col., 2011). El  $\alpha$ -pineno, el limoneno y el eugenol inhiben la acetilcolina estearasa afectando el desarrollo de los herbívoros (Maffei y col., 2011). En algunos casos, los volátiles atraen insectos fitófagos (Scala y col., 2013) y, en otros, se emiten como respuesta de la oviposición de polillas en algunas partes de la planta (Fatouros y col., 2012). Algunos insectos herbívoros de las raíces del frijol (*Vicia faba*) causaron cambios en la producción de compuestos volátiles en las hojas, lo que generó atracción de parasitoides enemigos de los áfidos chupadores de sabia (Babikova y col., 2013). La emisión de sustancias volátiles inducidas por herbivoría se ha estudiado en varias especies, *e.g.*, tomate (*Lycopersicon hirsutum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), yuca (*Yucca filamentosa*), algodón (*Gossypium hirsutum*), *Arabidopsis thaliana*, tabaco (*Nicotiana attenuata*) y maíz (*Zea mays*) (Das y col., 2013), pero no en especies de *Crotalaria*.

### **1.6 Extracción y análisis de compuestos orgánicos volátiles inducidos por herbivoría**

Existen varias opciones de sistemas para el muestreo y análisis de volátiles en ensayos de herbivoría, cuyo objetivo es atrapar la mezcla completa de volátiles emitidos por la planta. En condiciones de campo, se requieren sistemas portátiles y robustos, mientras que en laboratorio se pueden tener condiciones controladas, *e.g.*, temperatura, intensidad de la luz y humedad relativa, que permiten hacer el seguimiento preciso de las emisiones de volátiles solamente a la respuesta del daño generado por los herbívoros (Tholl y col., 2006).

Un avance importante en el análisis de estos volátiles fue la introducción de la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME). Es un método sencillo y muy sensible (Stashenko y Martínez, 2004). Los HIPV se ad/absorben sobre una fibra, recubierta con diferentes tipos de ad/absorbentes. Después del alcanzar el equilibrio entre la fibra y los compuestos del espacio de cabeza, los volátiles se desorben de la fibra en el puerto de inyección

caliente de un GC–MS. La gran ventaja de esta técnica es que elimina el uso de solventes y minimiza la manipulación de la muestra. La desventaja es que se debe inyectar toda la muestra en la misma corrida. No es posible hacer réplicas de la misma muestra o inyectarla en dos columnas de diferente polaridad. Se puede encontrar información de revisión sobre las ventajas o desventajas de usar la SPME en medición de volátiles en experimentos de ecología química (Tholl y col., 2006; McCormick y col., 2014) y estudios en los que se usa la técnica para la extracción de volátiles en plantas (Stashenko y col., 2013; Huber y col., 2016).

Otra opción de muestreo es el sistema de purga y trampa (P&T), en la cual se hace pasar una corriente de aire puro a través del recipiente hermético (vidrio o poliéster) que contiene una rama del árbol o una planta completa. Los analitos se atrapan de manera continua en materiales adsorbentes por el tiempo que sea necesario hasta alcanzar las concentraciones necesarias para la detección por GC–MS. Este método permite enriquecer los volátiles presentes en bajas concentraciones para detectarlos o elucidar sus estructuras (Materić y col., 2015). La desorción puede hacerse por calentamiento directamente en el GC o por elución con un solvente apropiado y posterior análisis por GC–MS. Para la cuantificación se adiciona un estándar interno. Una desventaja de este método es la posible acumulación de impurezas provenientes de los recipientes o de la baja calidad del aire que se introduzca al sistema. Sin embargo, es un método muy usado en el muestreo de volátiles inducidos por herbivoría (Iijima, 2014). En estudios recientes, Erb y col. (2015) utilizaron esta técnica para determinar los volátiles emitidos por las hojas de maíz por la acción del regurgitante de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). En otro ejemplo, el sistema de P&T, permitió determinar que los hongos *Lecanicillium lecanii* estimularon su crecimiento con la presencia de compuestos volátiles emitidos por el ataque del insecto *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Lin y col., 2016) o

que el ataque de las orugas de *Spodoptera frugiperda* modificó la emisión de volátiles en maíz (De Lange y col., 2020).

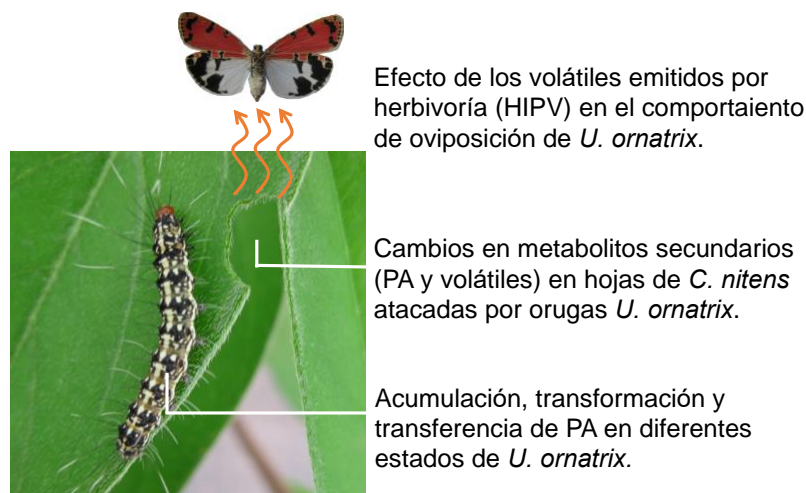
### 1.7 Los compuestos orgánicos volátiles en la agricultura

Existe un creciente interés por parte de la comunidad científica para comprender aspectos relacionados con las interacciones planta–insecto asociados a la defensa en las plantas, debido al beneficio potencial en el control biológico de plagas en cultivos comerciales. Pero la complejidad de estas interacciones también hace que la aplicación sea un desafío (Bouwmeester y col., 2019). Un ejemplo interesante de la integración de los HIPV en la agricultura fue el control de los barrenadores en maíz usando la estrategia de "atracción–repulsión" (Cook y col., 2007). La polilla barrenadora *Busseola fusca* se controló sembrando *Desmodium* sp. (Fabaceae) intercalado en el cultivo. El *Desmodium* proporcionó la "repulsión" a través de la producción de volátiles que disuadía la polilla. “La atracción” se generó fuera del cultivo por el *trans*– $\beta$ –cariofileno emitido por el pasto *Pennisetum purpureum* que atrajo a la polilla y además produjo una sustancia viscosa que mata las larvas (Cook y col., 2007). Estudios posteriores, demostraron que el *Desmodium* sp. en el cultivo mejoró la fertilidad del suelo mediante la fijación de nitrógeno, adicionó materia orgánica al suelo y mitigó la erosión (Khan y col., 2016). Recientemente, se encontró que el *Desmodium* sp. intercalado en el cultivo, modificó la emisión de volátiles en el maíz. El nuevo perfil de volátiles emitido por el maíz afectó negativamente el crecimiento de las larvas de la polilla barrenadora, permitiendo un mayor control de la plaga. Esta ventaja complementó las ya descritas y demostró que los volátiles tienen un futuro promisorio en el control de insectos plaga en cultivos comerciales (Mutyambai y col., 2019).

## 1.8 Objetivo del trabajo

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el papel de algunos metabolitos secundarios (PA y HIPV) en las interacciones planta–insecto usando el modelo de interacción *Crotalaria–U. ornatrix*. (**Figura 7**). En la investigación se implementó un método para la extracción y análisis de los PA. Se estudió la composición de los PA en seis especies de *Crotalaria*, se evaluó su acumulación en diferentes estados de *U. ornatrix* (oruga, polilla y huevos) alimentada con cuatro especies de *Crotalaria* con diferente contenido y perfil de PA para determinar si la acumulación y transformación de los PA en *U. ornatrix* estaban asociadas con la fuente de los PA ingeridos. Se implementaron los métodos por HS–SPME y P&T para extraer los HIPV emitidos en hojas de *C. nitens*. Se determinó si las plantas de *C. nitens* respondían al ataque de *U. ornatrix* variando la composición de PA y los volátiles y, si estos compuestos volátiles afectaban el comportamiento de oviposición de la polilla *U. ornatrix*.

**Figura 7.** Interacciones estudiadas en la presente investigación entre plantas de especies del género *Crotalaria* y orugas o polillas *U. ornatrix*.



## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Reactivos

El *cis*-3-hexenal (>50%), *trans*- $\beta$ -ocimeno (mezcla de isómeros >98%), acetato de *cis*-3-hexenilo (>98%), 2-metil-propil-aldoxima (>80%), *cis*-3-hexen-1-ol (>98%), 1-octen-3-ol (>98%), linalool (>95%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (>98%),  $\alpha$ -humuleno (>96%), *trans*-nerolidol (>90%), indol (>99%), monocrotalina (>98%), retrorsina (>95%), retronecina (>99%), zinc en polvo (<10  $\mu$ m, >95%), metanol deuterado (CH<sub>3</sub>OD, >99%), óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O, >99%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU. y Steinheim, Alemania). La heliotrina (>91%) se compró a PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Alemania). El metanol, *n*-hexano, 2-propanol, hidróxido de potasio grado reactivo, BF<sub>3</sub>/MeOH (20%), acetonitrilo grado LC-MS y ácido fórmico (AF) grado *Suprapur* fueron de Merck (Darmstadt, Alemania). El gel de sílice-C<sub>18</sub> fue de *Silicycle* (Québec, Canadá). La mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES; mezcla FAME de 37 componentes, 10 mg/ml) se adquirió de *Supelco* (Bellefonte, PA, EE. UU.). Las mezclas de *n*-alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub> y C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> se adquirieron de *AccuStandard, Inc.* (New Haven, CT, EE. UU.). El agua grado HPLC se obtuvo usando un sistema de purificación *Millipore UV Synergy* (Molsheim, Francia). Los gases helio, aire, hidrógeno y nitrógeno (99.995%) para GC se obtuvieron de Linde (Bucaramanga, Colombia).

### 2.2 Material vegetal

Se recolectaron plantas de seis especies de *Crotalaria* spp. en estado de floración y con semillas maduras en 24 sitios del Departamento de Santander, Colombia. Las especies se identificaron en el Herbario Nacional de la Universidad Nacional de Colombia. Una copia de cada *voucher* se depositó en este herbario. La información de los sitios de colecta y números de

*voucher* se proporcionan en el **Apéndice C**. Algunas semillas de cada una de las seis especies recolectadas (*C. retusa* L., *C. pallida* Aiton, *C. spectabilis* Roth, *C. incana* L., *C. maypurensis* Kunth, and *C. nitens* Kunth) se sembraron en parcelas experimentales (**Figura 1**) del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) en el campus central de la Universidad Industrial de Santander. Las raíces, hojas y flores de las plantas recolectadas en campo y en las parcelas experimentales, se secaron a la sombra y se procesaron en un molino SM100 (Retsch, Haan, Alemania). Las semillas se trituraron en un molino Retsch SK100 con tamiz de acero de 1 mm<sup>2</sup> de diámetro.

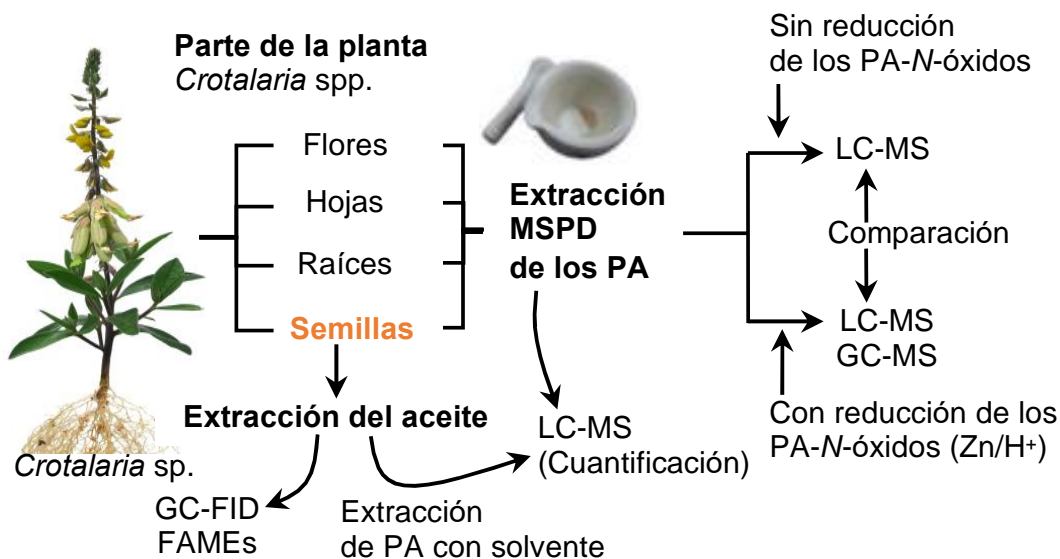
### 2.3 Especímenes de *U. ornatrix*

Treinta orugas de *U. ornatrix* se colectaron en el borde la carretera vía Bucaramanga – San Vicente, cerca de la planta hidroeléctrica Hidrosogamoso, Santander. Las coordenadas de colecta fueron 6°59'49.1"N, 73°22'11.4"W. Las orugas se usaron para generar una cría en condiciones controladas. La determinación taxonómica de las polillas se realizó por marcadores moleculares mediante secuenciación del gen *COI*, en el Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN–UIS). El resultado mostró un 99.9% de identidad con *U. ornatrix* (Véase **Apéndice D**). Los especímenes sobrantes del proyecto se registraron y depositaron en la colección del Museo de Historia Natural, Universidad Industrial de Santander, registrada ante el Instituto Alexander von Humboldt (Véase **Apéndice B**). La información sobre los especímenes se realizó en la plantilla para la documentación de registros biológicos de artrópodos basada en el estándar *Darwin Core*.

## 2.4 Extracción, identificación GC-MS y LC-MS y distribución de alcaloides pirrolizidínicos en especies de *Crotalaria*.

La composición de los PA y algunos de sus *N*-óxidos se determinó en raíces, hojas, flores, semillas en las especies de *Crotalaria* colectadas (*C. retusa*, *C. spectabilis*, *C. pallida*, *C. incana*, *C. maypurensis* y *C. nitens*), usando información complementaria obtenida de los análisis GC-MS y LC-MS. La extracción de los PA se realizó por MSPD. Se extrajo el aceite vegetal de las semillas de las seis especies, se determinó la composición de ácidos grasos y el contenido de PA en el aceite. El diagrama de flujo de los procedimientos empleados en esta sección se presenta en la **Figura 8**.

**Figura 8.** Diagrama de flujo del trabajo realizado en la etapa de extracción, identificación y distribución de los PA en diferentes partes de *Crotalaria* spp.



### 2.4.1 Dispersión de la matriz en fase sólida

Los PA se extrajeron por MSPD (Barker y col., 1989). Se ensayaron la arena, el florisil y el gel de sílice-C<sub>18</sub> (400 mg) como agentes dispersantes para determinar la eficiencia de recuperación de retrorsina adicionada (200 µL, 99,5 µg/mL) y homogeneizada en las muestras (100 mg) de hojas secas y molidas de *C. nitens*. El agente dispersante y la muestra se colocaron en un mortero y se mezclaron hasta obtener una mezcla homogénea que se colocó en una jeringa de 5 mL que contenía algodón absorbente comprimido en el fondo como filtro. La extracción se realizó con metanol o con metanol al 2% de FA (5 mL). Una alícuota (50 µL) se evaporó a sequedad bajo un flujo de N<sub>2</sub>, se disolvió con la **solución A** (1 mL; agua:acetonitrilo, 9:1 v/v, con 0.2% de FA). Las mezclas se filtraron a través de un filtro desechable (0,22 µm-PTFE). Para determinar la recuperación de retrorsina en el proceso de extracción, se preparó una solución patrón de concentración final igual a la esperada en la muestra (199 ng/mL), así: se tomó una alícuota (200 µL, 99,5 µg/mL), se diluyó en metanol acidulado al 2% con FA (5 mL), se tomó una alícuota (50 µL) y se aforó a 1 mL con la **solución A**, se filtró (PDVF, 0,22 µm) y se analizó por LC-MS, bajo las mismas condiciones que las muestras. La solución patrón se inyectó por triplicado. Las áreas cromatográficas obtenidas de la molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> de retrorsina en *m/z* 352.17546 se usaron para calcular la eficiencia de recuperación de la retrorsina.

### 2.4.2 Identificación de los alcaloides pirrolizidínicos por GC-MS y LC-MS

Los PA se identificaron tentativamente con la información complementaria obtenida de los espectros de masas GC-MS y LC-MS. Para la identificación, los PA de muestras (3-4 g) de raíces, hojas, flores o semillas de cada especie de *Crotalaria*, se extrajeron usando MSPD con gel de sílice-C<sub>18</sub> (2 g) y 2-propanol (1 mL) en un mortero. La elución de los PA se realizó con

metanol al 2% de FA (40 mL) en porciones de 10 mL. Una alícuota (200  $\mu$ L) se evaporó hasta sequedad ( $N_2$ ), se disolvió con la **solución A**, se filtró y se analizó por LC–MS. Para el análisis por GC–MS, la solución restante se evaporó en el rotoevaporador (*Heidolph*, Schwabach, Alemania). El residuo se suspendió en ácido clorhídrico al 2,5% (10 mL) y se limpió con hexano (3 x 10 mL). Los *N*-óxidos de PA se redujeron a sus respectivas bases libres con zinc en polvo (200 mg, agitación 3 h) (Fletcher y col., 2009). Se adicionó una solución acuosa de  $NH_4OH$  (ca. 1 mL, 28%, hasta pH 10) y los PA se extrajeron con diclorometano (3 x 15 mL). Se tomó una alícuota (200  $\mu$ L), se evaporó a sequedad, se disolvió con la **solución A** (1 mL), se filtró y se analizó por LC–MS; esta porción proporcionó los PA libres. El disolvente restante se evaporó hasta sequedad, se disolvió en metanol y se filtró para el análisis GC–MS.

### 2.4.3 Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en *Crotalaria* spp.

La cuantificación de los PA en cada una de las partes de la planta se realizó usando MSPD mezclando el material molido (100 mg) con gel de sílice– $C_{18}$  (400 mg). La mezcla se colocó en una jeringa de 5 mL y se eluyó con metanol al 2% de FA (5 mL). Una alícuota (100  $\mu$ L para raíces, hojas y flores, o 50  $\mu$ L para semillas) se evaporó a sequedad y se disolvió con la **solución A** (1 mL), se filtró y analizó por LC–MS. Para la cuantificación de los PA y sus *N*-óxidos se aplicó el factor de respuesta de la monocrotalina, uno de los alcaloides más comunes en las especies de *Crotalaria*, a la cuantificación de otros PA y *N*-óxidos. Se pesaron 5,5 mg de monocrotalina y se aforaron a 10 mL con metanol. Se tomó una alícuota (50  $\mu$ L) y se dosolvió en metanol (10 mL) para obtener la solución de 2,8 mg/L. Se tomaron alícuotas de 4, 20, 40, 80 y 200  $\mu$ L y se aforaron (1 mL) con la **solución A** para obtener cinco concentraciones de 11, 55, 110, 220 y 550  $\mu$ g/L. Las soluciones de diferentes concentraciones se inyectaron en el LC–MS

bajo las mismas condiciones que las muestras. El contenido total de alcaloides PA libres o sus *N*-óxidos se expresó como equivalentes de monocrotalina basados en la siguiente fórmula:

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

Donde:

- $A_x$ : Área del alcaloide (PA o *N*-óxido) en el extracto.
- $b$ : Intercepción en la curva de calibración de la monocrotalina.
- $m$ : Pendiente de la curva de calibración de la monocrotalina.
- $V_{\text{final}}$ : Volumen (L) de aforo de la solución final (generalmente 1 mL).
- $V_{\text{extracción}}$ : Volumen final (mL) de la extracción MSPD (generalmente 5 mL).
- $V_{\text{alícuota}}$ : Volumen de alícuota (mL) tomada del extracto MSPD para análisis LC-MS, se varió dependiendo del tipo de muestra.
- $P_{\text{muestra}}$ : Peso de la muestra (mg).
- $F$ : Factor de recuperación de la extracción MSPD (85%).

#### 2.4.4 Condiciones de análisis LC-MS

El análisis de los PA y sus *N*-óxidos se realizó usando un cromatógrafo líquido UHPLC *Dionex UltiMate 3000* (*Thermo Scientific*, Germering, Alemania), equipado con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un inyector automático con bandejas de 120 viales y un compartimento de columna con control termostático. El automuestreador se mantuvo a 10 °C y el compartimento de la columna se mantuvo a 40 °C. La separación cromatográfica se realizó en una columna *Hypersil GOLD aQ* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE. UU., 100 mm x 2,1 mm de d.i., 1,9 µm de tamaño de partícula) y precolumna UHPLC *Accucore aQ Defender* (*Thermo Scientific*, CA, EE. UU., 10 x 2.1 mm d.i., 2.6 µm de tamaño de partícula).

Se evaluó la incidencia que tienen la concentración de FA en la fase móvil y el voltaje del *electrospray* (*Vspray*) sobre la respuesta del analizador *Orbitrap-MS* a las moléculas protonadas de monocrotalina y retrorsina. Se usaron soluciones estándar de estos compuestos a 28 ng/mL y 27 ng/mL, respectivamente. La fase móvil que contenía FA/agua (A) y FA/acetonitrilo (B) se trabajó a un flujo de 300  $\mu$ L/min. El FA se ensayó a 0.05%, 0.2% y 0.35% v/v en la fase móvil. La condición de gradiente inicial fue 100% de A, cambió linealmente a 100% de B en 8 min y se mantuvo durante 4 min, luego regresó a 100% de A en 1 min y se mantuvo durante 3 min. El volumen de inyección fue de 1  $\mu$ L.

El LC se conectó a un espectrómetro de masas *Orbitrap Exactive Plus* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización termostataada (HESI-II) operada en modo positivo. El *Vspray* se evaluó a diferentes voltajes de 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 kV. La temperatura del nebulizador se ajustó a 350 °C; la temperatura del capilar a 320 °C; el gas envolvente y el gas auxiliar ( $N_2$ ) se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno (> 99%) se obtuvo de un generador NM32LA (*Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). En el modo *Full Scan*, la resolución del *Orbitrap-MS* se estableció en 70000 (*full-width-at-half-maximum*, en  $m/z$  200,  $R_{FWHM}$ ); el control automático de ganancia (AGC) fue de  $3 \times 10^6$ ; el tiempo máximo de inyección a la *C-trap* fue de 200 ms y el rango de masas fue de  $m/z$  100–1000. Las moléculas protonadas se fragmentaron en la celda HCD con energías de colisión de 20, 30, 40 y 50 eV. Los espectros de masas se registraron en el modo AIF (*all-ion fragmentation*) para cada energía de colisión, a una  $R_{FWHM}$  de 35000, AGC de  $3 \times 10^6$ ; tiempo de inyección en la *C-trap* de 50 ms y un rango de masas de  $m/z$  80–1000. La calibración del instrumento se realizó cada semana utilizando una solución de calibración de iones positivos *Pierce LTQ Velos ESI* (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EE. UU.). Los datos obtenidos se

analizaron utilizando un *software Thermo Xcalibur 3.1* (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE. UU.).

#### 2.4.5 Condiciones de análisis GC–MS

Los extractos con los PA obtenidos por la reducción de los *N*-óxidos se analizaron mediante un cromatógrafo de gases (GC 6890 Plus, *Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un espectrómetro de masas AT 5973N (EI, 70 eV) e inyector *split/splitless*, operado en modo *splitless*. Se usó una columna capilar de sílice fundida DB–5MS (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.), 60 m × 0,25 mm de d.i., recubierta con 5%–fenil–PDMS (0,25 μm df). La temperatura del horno del GC se programó de 45 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) @ 4 °C/min, luego hasta 250 °C (5 min) @ 5 °C/min y, finalmente, hasta 300 °C (45 min) @ 10 °C/min. Las temperaturas del puerto de inyección, la cámara de ionización y la línea de transferencia se ajustaron a 250 °C, 230 °C y 285 °C, respectivamente. Se usó helio (99,995%) como gas de arrastre a una velocidad lineal de 26 cm/s (1 mL/min, a flujo constante). Los espectros de masas se obtuvieron en el rango de masas *m/z* 45–450 a 4 *scan/s*. Una mezcla de *n*-alcanos C<sub>8</sub>–C<sub>40</sub> se usó para determinar los índices de retención lineales (IRL), siguiendo la ecuación propuesta por van Den Dool y Kratz (1963):

$$IRL_x = 100n + 100 \left[ \frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(N)} - t_{R(n)}} \right]$$

Donde:

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

n: Número carbonos del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés (x).

$t_{R(x)}$ : Tiempo de retención del compuesto de interés (x).

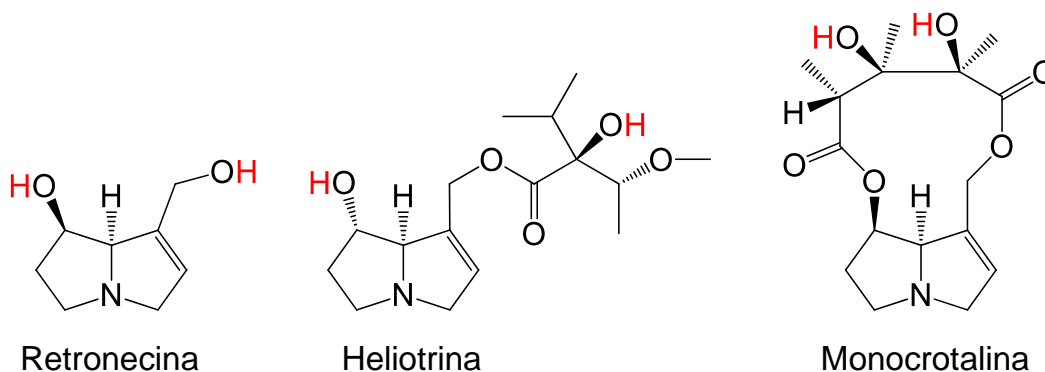
$t_{R(n)}$ : Tiempo de retención del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés (x).

$t_{R(N)}$ : Tiempo de retención del *n*-alcano que eluye después del compuesto de interés (x).

#### **2.4.6 Ensayos de intercambio hidrógeno/deuterio en retronecina, heliotrina y monocrotalina**

El intercambio de hidrógeno/deuterio (H/D) en moléculas de alcaloides pirrolizidínicos con hidrógenos lábiles permitió el estudio de sus fragmentaciones. La retronecina, la heliotrina y la monocrotalina (**Figura 9**) se usaron para realizar el intercambio de los hidrógenos lábiles por deuterio. En recipientes independientes, se tomó cada alcaloide (~0,5 mg) y se disolvieron con una mezcla CH<sub>3</sub>OD:D<sub>2</sub>O 7:3 v/v (2 mL). La solución se agitó y se tomó una alícuota (2 µL), se aforó con CH<sub>3</sub>OD (1 mL) para obtener una concentración final de ~500 ng/mL. Se preparó una solución para cada material de referencia sin deuterar (retronecina, heliotrina y monocrotalina), de la misma forma, pero usando CH<sub>3</sub>OH y H<sub>2</sub>O. Las dos soluciones se analizaron independientemente en el espectrómetro de masas *Orbitrap*-MS, usando inyección directa a un flujo de 5 µL/min. En este experimento, la  $R_{FWHM}$  se ajustó en 140000. Los espectros de masas se registraron en el modo *Full Scan* y AIF usando la celda HCD a 30 o 40 eV. Las demás condiciones operacionales del *Orbitrap*-MS fueron las mismas descritas anteriormente (véase Sección 2.4.4).

**Figura 9.** Alcaloides pirrolizidínicos usados en el experimento de intercambio de hidrógeno/deuterio. Todos los alcaloides contienen dos hidrógenos lábiles. Se seleccionaron, un PA no esterificado (retronecina), un monoéster (heliotrina) y un diéster cíclico (monocrotalina).



#### 2.4.7 Contenido de aceite en las semillas, perfil de ácidos grasos y contenido de PA en los aceites vegetales

Las semillas molidas de *C. retusa* (Voucher N° COL 582808), *C. spectabilis* (COL 582809), *C. pallida* (COL 585761), *C. incana*, (COL 585775), *C. maypurensis* (COL 582805) y *C. nitens* (COL 579431), se pesaron (20 g) en dedales de celulosa (33 x 80 mm) y se colocaron en un horno durante la noche (105 °C, Binder, Tuttlingen, Alemania). El contenido de humedad se determinó gravimétricamente. La extracción de aceite se realizó con una unidad de extracción Soxtec 2045 (FOSS, Höganäs, Suecia). El procedimiento fue similar al descrito para aceitunas (Brkić y col., 2006) usando *n*-hexano para la extracción. Los ácidos grasos se convirtieron en sus ésteres metílicos (FAME) como se describe en el Método Oficial AOCS Ce 2-66 (1994) y se analizaron de acuerdo con el Método oficial AOCS Ce 1-62 (1994), usando GC-FID. La composición se expresó como porcentaje del área cromatográfica, sin ninguna corrección. Se realizaron análisis adicionales para determinar la presencia de PA en los aceites vegetales. Los PA se obtuvieron por extracción líquido-líquido (Wretensjö y Karlberg, 2003; Vacillotto y col.,

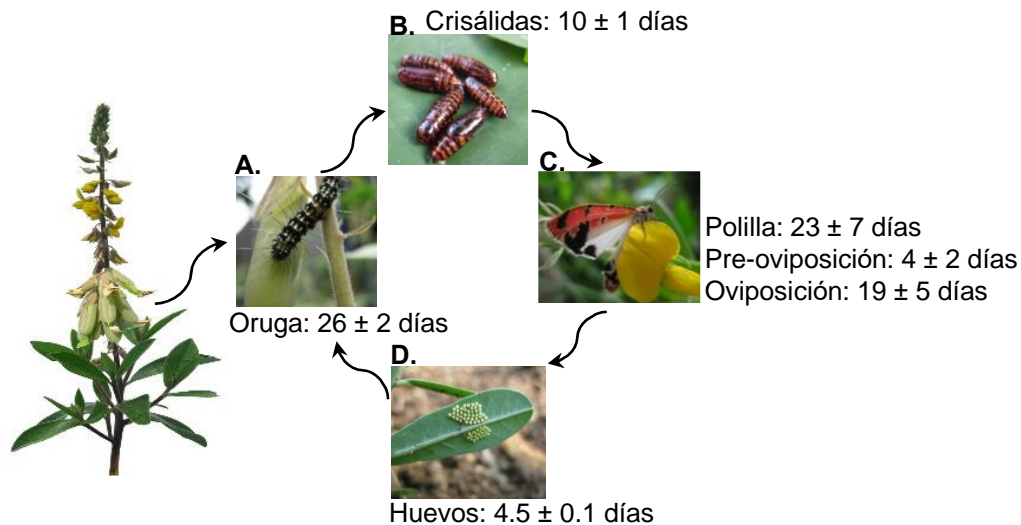
2013). La muestra de aceite (50 mg) se diluyó en *n*-hexano (200 µL) en un tubo cónico de microcentrífuga de poli(propileno) de 2 mL con tapa. La solución se agitó durante 10 s. Los PA se extrajeron usando agua con FA (1 mL, 2% de FA). La mezcla se sometió a agitación durante 1 min y se centrifugó (10 min., 10000 rpm), usando una centrífuga Mikro 120 (*Hettich*, Tuttlingen, Alemania). Se tomó una alícuota (100 µL) del extracto acuoso y se completó a 1 mL con la **solución A**. Se requirió una dilución adicional de 50 veces para obtener áreas en el rango de la curva de calibración. Todos los extractos se filtraron y analizaron por LC-MS, usando las condiciones mencionadas anteriormente (véase Sección 2.4.4).

## **2.5 Alcaloides pirrolizidínicos en la oruga, la polilla y los huevos de *U. ornatrix* cuando se alimenta con hojas o semillas de especies de *Crotalaria***

### **2.5.1 Cría de orugas y polillas *U. ornatrix***

La cría de polillas se realizó a partir de 30 orugas colectadas en su entorno natural. Las orugas se dispusieron en un recipiente de plástico (32 cm x 28 cm, 16 cm de alto), se alimentaron con hojas y semillas de *C. nitens* sembradas previamente en lotes experimentales en CENIVAM. El alimento se cambió diariamente y el recipiente se limpió cada dos días. Las crisálidas se colocaron en mariposarios contruidos con cajas de cartón (41 cm x 41 cm, 60 cm de alto) cubiertas con tela tul. Las polillas se alimentaban dos veces al día con una solución acuosa de miel (5%), según la metodología de Martins y col. (2015). En el mariposario, se colocaron plantas de *C. nitens* de un mes de edad para que las polillas colocaran los huevos debajo de sus hojas. Los huevos se recolectaban a diario y se emplearon para producir más orugas o para los experimentos. El ciclo de vida de *U. ornatrix* fue similar al descrito por Signoretti y col. (2008) y se representa en la **Figura 10**.

**Figura 10.** Fotos de *U. ornatrix* y su ciclo de vida, según Signoretti y col. (2008). **A.** La oruga realiza un agujero en una vaina de *C. nitens* para comer de las semillas. **B.** Crisálidas. **C.** Insecto adulto sobre flores de *C. retusa*. **D.** Huevos de *U. ornatrix* en el envés de hojas de *C. nitens*. Fotos del autor, parcelas experimentales CENIVAM–UIS, Bucaramanga, junio 2017.



Se realizaron los siguientes experimentos para evaluar si la diversidad química y diferente composición de los PA en hojas/semillas de *Crotalaria* afectaron (i) la preferencia de oviposición de adultos *U. ornatrix* en hojas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* o *C. pallida* y (ii) el desarrollo, acumulación y transformación de PA en la descendencia resultante.

### 2.5.2 Preferencia de oviposición de polillas *U. ornatrix* en plantas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* o *C. pallida*

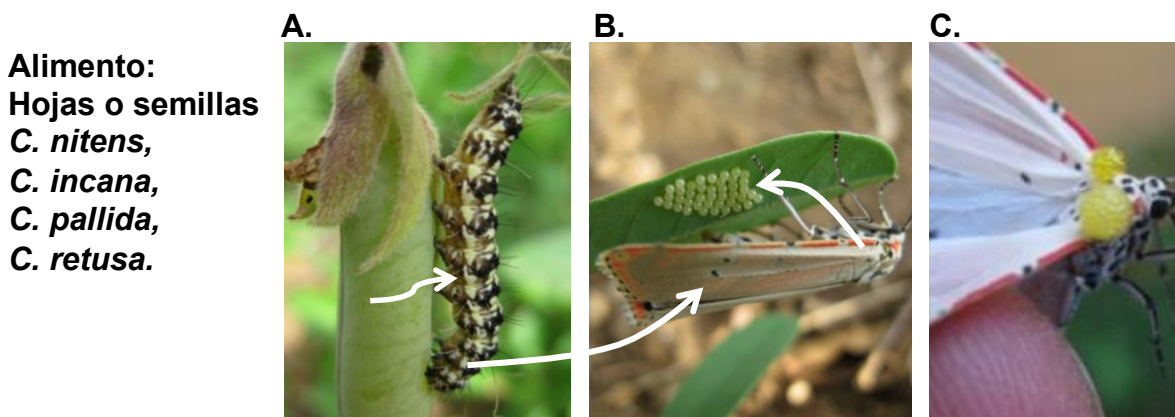
La preferencia de adultos hembras *U. ornatrix* en ovipositar huevos sobre las plantas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* o *C. pallida* se evaluó en un experimento de selección múltiple. Una planta de cada una de las cuatro especies, con la misma edad de siembra (cuatro meses), se

colocó en cajas (90 cm x 90 cm, 120 cm de alto) con malla de tela tul en la parte superior. Las cajas se colocaron en espacios protegidos de la lluvia, pero abiertos y con circulación de aire y en condiciones similares a los ambientes naturales de la polilla. En cada una de las cajas, se liberaron ocho polillas hembra y ocho machos con cinco días de edad. Se liberaron ambos sexos para asegurar copulación y la fertilidad de los huevos resultantes del experimento. Las plantas se regaron diariamente y las polillas se alimentaron dos veces al día con una solución acuosa de miel (5%). Se dejaron en las cajas durante cuatro días. Cumplido el tiempo, se removieron las polillas, se recolectaron y contaron los huevos puestos en cada una de las plantas. Los huevos se usaron para el siguiente experimento. Las hojas de cada planta se escanearon y se determinó su área foliar con Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe Systems Inc., CA, EE. UU.) convirtiendo los pixeles en cm<sup>2</sup>. El experimento se repitió ocho veces en días diferentes, según la disponibilidad de polillas.

### **2.5.3 Acumulación y transformación de PA en *U. ornatix* alimentadas con hojas o semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* o *C. pallida***

El desarrollo, la acumulación y la transformación de los PA se evaluaron en la descendencia resultante de los huevos del ensayo anterior. El peso del insecto se evaluó en el estado de oruga y los PA se evaluaron en orugas, polillas y sus huevos, cuando la oruga se alimentó de diferentes especies de *Crotalaria* (**Figura 11**). También se evaluaron los PA en la espuma que la polilla segrega del tórax cuando se siente amenazada y que le sirve como mecanismo de defensa (Eisner y Meinwald, 1995).

**Figura 11.** Esquema de experimento de acumulación y transformación de los PA provenientes de varias fuentes de alimento. Los PA se determinaron en el alimento, la oruga, la polilla, los huevos y en la espuma que segrega la polilla cuando se siente atacada. **A.** Oruga *U. ornatatrix* ingresando a la vaina que contiene las semillas (*C. nitens*). **B.** Polilla depositando huevos en el envés de una hoja de *C. nitens*. **C.** Polilla segregando espuma para su defensa. Fotos del autor, parcelas experimentales de CENIVAM–UIS, junio de 2017.



Se colocaron entre 30–60 huevos recolectados del experimento anterior en cada uno de los ocho tratamientos, más el control, descritos en la **Tabla 1**. Los huevos se colocaron en recipientes de plástico de forma cilíndrica (22 cm diámetro, 10 cm alto) y en la parte superior cubierta con la malla de tela tul. Las hojas o semillas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. incana* o *C. pallida* se obtuvieron de parcelas experimentales de CENIVAM. En las orugas alimentadas con hojas, el alimento se suministraba diariamente *ad libitum*, colocando hojas frescas debajo de las hojas del día anterior. En los experimentos con semillas verdes, las orugas recién eclosionadas no podían comer directamente de la semilla, por su tamaño pequeño. Entonces, durante la primera semana, se les suministró una dieta que consistió en macerar las semillas frescas (1 g) con gelatina sin sabor (0,8 g), se adicionó agua caliente (5 mL) y se dejó enfriar. La pasta formada se suministró diariamente. A partir de la segunda semana, las orugas se alimentaron directamente

de las semillas verdes con la vaina abierta y después de la tercera semana, las orugas se alimentaron con vainas verdes sin destapar. Las orugas hacían un agujero para buscar las semillas, tal como sucede en condiciones naturales. Las crisálidas de cada tratamiento, se colocaron en los mariposarios (41 cm de ancho, 41 cm de largo, 60 cm de alto) cubiertos con tela tul. Las polillas se alimentaron diariamente con una solución acuosa de miel (5%) y se mantuvieron en el mariposario para que las hembras pusieran sus huevos, normalmente, debajo de la malla de tela tul. Para el control del experimento se alimentaron las orugas con semillas verdes de habichuela, las orugas crecieron hasta formar crisálidas, pero no se formaron polillas.

**Tabla 1.** Tratamientos y muestras de alimento (hojas y semillas de *Crotalaria* spp.) y *U. ornatix* (oruga, polilla, espuma y huevo).

Especie	Parte de la planta	N° de muestras para el análisis de PA				
		Alimento <sup>a</sup>	Oruga	Polilla	Espuma	Huevos
<i>C. nitens</i>	Hoja	9	3	3	3	2
	Semilla	9	3	3	3	2
<i>C. retusa</i>	Hoja	9	3	3	3	2
	Semilla	9	3	3	3	2
<i>C. incana</i>	Hoja	9	3	3	3	2
	Semilla	9	3	3	3	2
<i>C. pallida</i>	Hoja	9	3	3	3	2
	Semilla	9	3	3	3	2
<i>Phaseolus vulgaris</i> (habichuela)	Semilla	3	3	–	–	–
Total		75	27	24	24	16

<sup>a</sup> Durante el desarrollo de la oruga se realizaron tres muestreos por triplicado: al comienzo, en el intermedio y al final del ciclo de la oruga.

El experimento se repitió en dos tiempos diferentes para un  $n = 7$ . El peso de las orugas y polillas se registró en todas las réplicas. Sin embargo, los análisis del contenido de PA por LC–MS se realizaron solamente en tres de las réplicas. Durante el estado de oruga, el contenido de PA en la fuente de alimento se midió en tres tiempos: al inicio, a la mitad de la vida de la oruga y antes que se convirtiera en crisálida. Se tomaron muestras de orugas, polillas, sus huevos y la espuma que segrega para defenderse, como se muestra en la **Tabla 1**.

#### **2.5.4 Extracción MSPD y análisis LC–MS de los PA presentes en las especies de *Crotalaria* y especímenes *U. ornatrix***

La extracción de los PA en hojas y semillas se realizó por MSPD como se describe en la sección 2.4.3. Se tomaron entre 5–6 orugas, 3–4 polillas y 50–200 huevos para cada réplica. Las orugas y polillas se sumergieron en nitrógeno líquido (Linde, Bucaramanga, Colombia) y se maceraron hasta convertirlas en polvo. Los PA de las muestras maceradas de orugas (100 mg) y polillas (100 mg) se extrajeron usando gel de sílice–C<sub>18</sub> en proporción 1:6 (600 mg), mientras que para los huevos (10–30 mg), el gel de sílice–C<sub>18</sub> se usó en relación 1:10 (100–300 mg). La extracción de la columna MSPD se hizo con metanol acidificado con 2% de FA (5 mL). Se tomó una alícuota (50 µL para orugas y polillas y 200 µL para huevos), se llevó a 1 mL con una **solución A**. Las muestras de espuma de las polillas (0,5–3,3 mg) se recolectaron con la ayuda de una pipeta *Pasteur* directamente en tubos de centrifuga de 2 mL, se adicionó **solución A** (1 mL) y se agitó en vórtice (3000 rpm, 5 min). Todas las muestras se filtraron (0,22 µm) y se analizaron por LC–MS (*Orbitrap*) como se describe en la Sección 2.4.4. La identificación de los alcaloides transformados por el insecto se realizó basada en el análisis de los espectros de masas ESI(+)-MS de alta resolución (*Orbitrap*).

## **2.6 Variación de alcaloides pirrolizidínicos y compuestos orgánicos volátiles en *C. nitens* inducidos por herbivoría con orugas *U. ornatrix***

Se ha reportado que la oruga se beneficia de los PA que toma de la *Crotalaria* spp. (Cogni y Trigo, 2016). Sin embargo, se sabe poco sobre los cambios que ocurren en algunos metabolitos secundarios de defensa química en las hojas de especies de *Crotalaria* cuando la oruga *U. ornatrix* se alimenta de sus hojas. En esta sección, se realizaron experimentos para estudiar la variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos (defensa directa) y volátiles inducidos por herbivoría (HIPV, defensa indirecta), que ocurren en las hojas de *C. nitens* antes, durante y después del ataque de las orugas *U. ornatrix*.

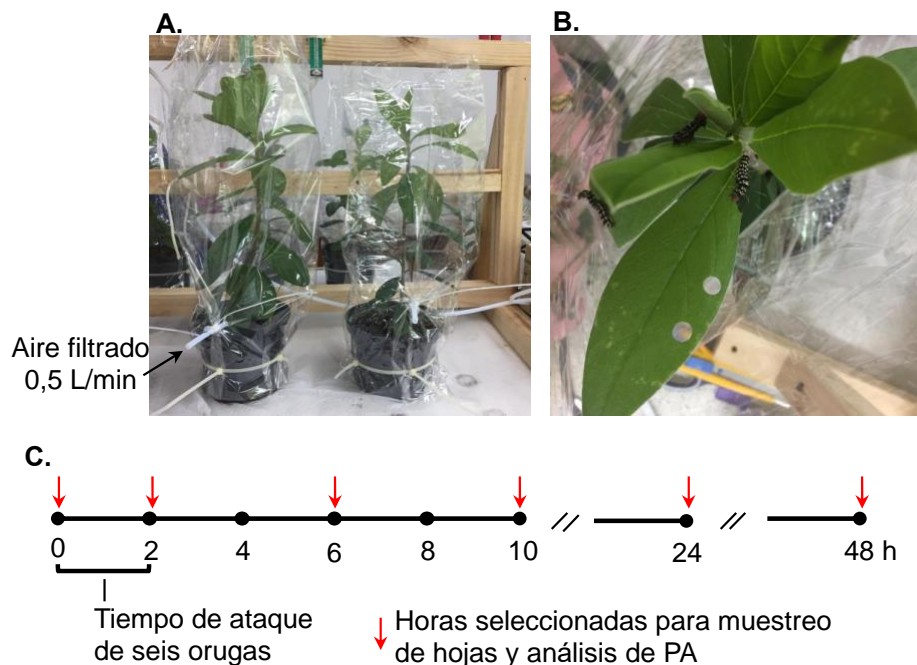
### **2.6.1 Plantas de *C. nitens* cultivadas en laboratorio**

Las plantas de *C. nitens* se propagaron en un laboratorio aislado del entorno para prevenir el contacto con insectos, volátiles de otras plantas y reducir el efecto del cambio de los PA o volátiles a causa de otros factores diferentes del ataque de la oruga. Las semillas de *C. nitens* se colocaron en materos (1 L) que contenían suelo y tamo de arroz en relación 7:3, respectivamente. Las plántulas contaron con iluminación artificial (12 h de fotoperiodo), proporcionado por ocho lámparas fluorescentes compactas de 32 W y luz blanca (6400 K). Se fertilizaron semanalmente con una solución (ca. 50 mL) de fertilizante hidrosoluble (1g/L) N-P-K-MgO:11-27-12-2. La humedad relativa fue de  $60 \pm 10\%$  y la temperatura de  $24 \pm 3$  °C.

### 2.6.2 Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en hojas de *C. nitens* antes y después del ataque de orugas *U. ornatrix*.

Se realizaron dos experimentos, en el primero, se usaron plantas *C. nitens* de 12 semanas de siembra. Durante el ensayo, se aislaron de la emisión de volátiles de las plantas vecinas, colocándolas en bolsas plásticas de poliéster (“*Bratenschlauch*” Toppits, Minden, Alemania). Este material no emite cantidades detectables de volátiles (Ballhorn y col., 2008) (**Figura 12**).

**Figura 12.** Montaje de experimento para determinar la variación de los PA generados por el ataque de orugas *U. ornatrix*. **A.** Plantas cubiertas con bolsas de poliéster (Toppits, Minden, Alemania) para evitar la interacción con los volátiles emitidos por la planta vecina. Se inyectó un flujo de aire filtrado para remover lo volátiles afuera de la bolsa. **B.** Muestreo con sacabocados en la hoja N° 5 para el análisis de los PA por LC-MS. **C.** Tiempo de ataque de orugas y esquema de muestreo. ( $n = 4$  para plantas atacadas y 4 de control). Fotos del autor, CENIVAM-UIS, noviembre de 2018.



En la parte inferior de la bolsa, se abrió un hueco (6 mm diámetro) para introducir aire (0,5 L/min) previamente filtrado en trampas de carbón activado, la función del aire era limpiar el espacio de cabeza de la planta y evitar el ingreso de volátiles provenientes de otras plantas (Hu y col., 2019). Cuatro plantas se sometieron al ataque de seis orugas *U. ornatix* durante dos horas y otras cuatro plantas se dejaron como control. El contenido de PA se midió antes de colocar las orugas y a las 2, 6, 12, 24 y 48 h del inicio del experimento. Se tomaron dos círculos con un sacabocados en la hoja N° 5 de cada planta. Los dos círculos pesaron entre 8 mg y 12 mg. Las muestras se colocaron en un tubo de centrífuga de 1,5 mL con tapa e inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido.

En el segundo experimento, se evaluó el efecto del ataque de orugas *U. ornatix* en un periodo continuo de 12 días sobre la concentración de los PA en hojas y raíces. Diez plantas de *C. nitens*, cultivadas en laboratorio, se sometieron al ataque de orugas *U. ornatix* (tres orugas en cada planta) y otras diez plantas se dejaron como control. Todas las plantas se cubrieron con tela tul y se regaron diariamente. Después del ataque, las orugas se retiraron y se analizaron todas las plantas de ambos tratamientos: rápidamente, se escanearon las hojas para determinar el área foliar usando Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe Systems Inc., CA, EE. UU.). Las hojas se colocaron en bandejas de aluminio, se maceraron y homogeneizaron con nitrógeno líquido. Las raíces se lavaron con abundante agua y se cortaron en trozos pequeños. Una muestra de hojas otra de raíces (20 mg) se colocó en un tubo de centrífuga de 1,5 mL y se sumergió de inmediato en nitrógeno líquido.

Las muestras de hojas de ambos experimentos preservadas en los tubos de centrífuga se maceraron con pistilo en nitrógeno líquido, se les adicionó metanol al 2% de FA (1 mL), se colocaron en vórtice (3000 rpm, 30 s) y se centrifugaron (12000 rpm, 2 min). Se tomó una

alícuota del sobrenadante (100  $\mu\text{L}$ ) y se completó a 1 mL con la **solución A**. Las muestras se filtraron (0,22  $\mu\text{m}$ ) y se analizaron por LC–MS bajo las condiciones de operación descritas en la Sección 2.4.4. La cuantificación se hizo con curva de calibración de monocrotalina a 11, 55, 110, 220 y 550  $\mu\text{g/L}$ .

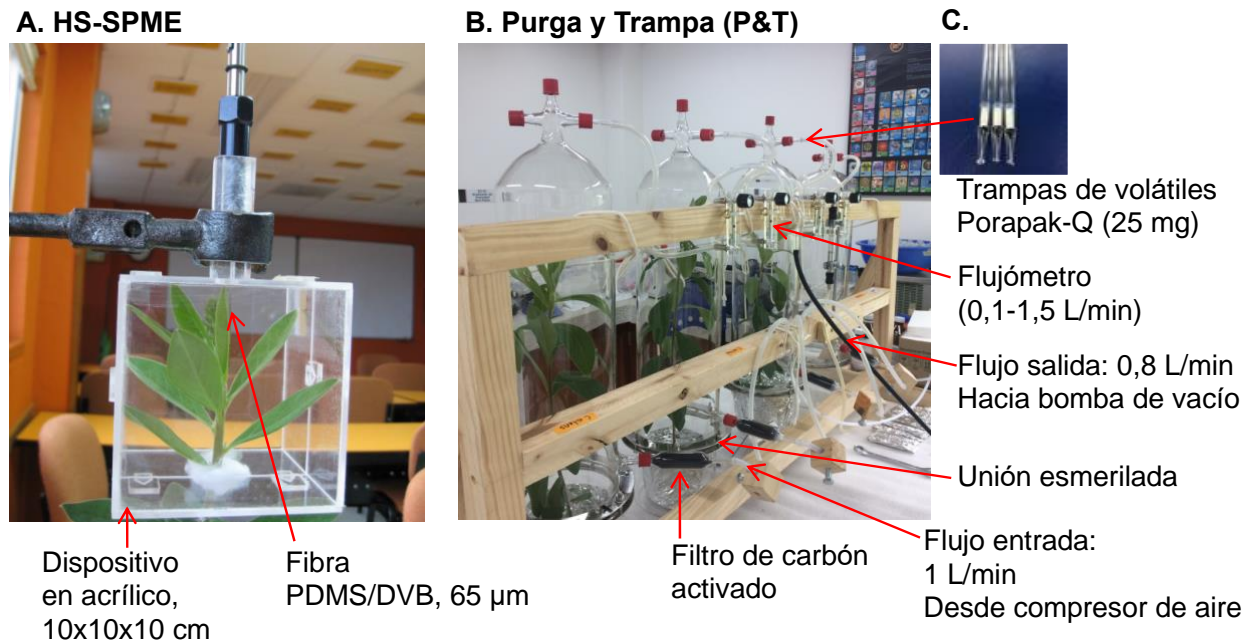
### **2.6.3 Variación en la emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de *Crotalaria nitens* atacadas con orugas *U. ornatrix***

Para la determinación de los HIPV en hojas de *C. nitens* se la extracción con HS–SPME y con un sistema de P&T (**Figura 13**). Para evaluar el cambio en la emisión de HIPV antes, durante y después del ataque, se usaron plantas de *C. nitens* de 12 semanas de siembra, cultivadas en laboratorio como se describe en la Sección 2.6.1. En todos los experimentos, seis orugas *U. ornatrix* atacaron las hojas de *C. nitens* durante dos horas (Turlings y col., 1990). Las orugas se dejaron sin alimento durante un día para asegurar que se alimentaran apenas se colocaran sobre las hojas la planta. Los HIPV se midieron antes, durante y después del ataque de las orugas *U. ornatrix*.

### **2.6.4 Muestreo de volátiles usando HS–SPME**

La extracción de los HIPV por HS–SPME se realizó siguiendo la metodología descrita por Stashenko y col. (2013) para flores de café, con modificaciones. Una rama de cada planta de *C. nitens* ( $n = 7$ ) de 12 semanas de siembra, con al menos diez hojas sanas se colocó adentro de un recipiente cúbico (10 cm de lado) hecho de acrílico. El tallo de la rama se rodeó con algodón para no lastimar la planta al cerrar el sistema. El recipiente tenía un aditamento con un orificio para insertar el soporte de la fibra de SPME (revestida con PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ , Supleco, Bellefonte, EE. UU., **Figura 13**).

**Figura 13.** Medición de volátiles emitidos por herbivoría antes, durante y después del ataque de *U. ornatix* a las hojas de *C. nitens*. **A.** HS-SPME. **B.** El sistema de purga y trampa (P&T) consistió en frascos de vidrio de 50 cm de alto x 17 cm de ancho. **C.** Las trampas de volátiles: tubos de vidrio de 7 cm con adsorbente Porapak-Q para atrapar los volátiles. Fotos del autor, CENIVAM-UIS, noviembre de 2018.



La fibra se seleccionó siguiendo las instrucciones del fabricante (recomendada para volátiles, aminas y nitroaromáticos, según: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html>). La fibra se expuso previamente (5 s, 24 °C), al espacio de cabeza de un frasco de vidrio (2 mL) que contenía undecanoato de metilo (30 mg), como estándar interno, y luego se colocó durante 60 min al espacio de cabeza del recipiente de acrílico. Los HIPV se midieron antes del ataque (hora cero) y durante las horas 1 y 2 del ataque de la oruga *U. ornatix*. Se retiraron las orugas y los HIPV se midieron en las horas 4, 6, 8 y 10 h del inicio del experimento. Los volátiles adsorbidos se desorbieron durante 10 min

en el puerto de inyección del GC-MS operado en modo *splitless* (columna DB-WAX, 60 m). Al inicio de cada experimento se realizaron los blancos de la fibra, del recipiente de acrílico vacío y de las hojas antes del ataque.

### **2.6.5 Comparación de emisión de volátiles en hojas de *C. nitens* atacadas con orugas *U. ornatrix* o con daño mecánico**

Se determinó, si los volátiles emitidos por hojas de *C. nitens* atacadas por la oruga *U. ornatrix* eran similares o diferentes a los generados con daño mecánico provocado por el raspado de la hoja con el bisturí (Turlings y col., 1990; De Moraes y col., 2001). Los HIPV emitidos por las hojas de *C. nitens* se midieron en un sistema de P&T, según lo describen Erb y col. (2015). El sistema consistió en frascos de vidrio de borosilicato de 50 cm de alto x 17 cm de ancho (**Figura 13**). Los materos con las plantas de *C. nitens* se envolvieron en papel aluminio. Las orugas (6/planta) se colocaron sobre las hojas de la planta para el tratamiento con herbivoría ( $n = 10$ ) y las hojas N° 4 y N° 5 en otra planta ( $n = 10$ ) se rasparon sobre la superficie con un bisturí (daño mecánico) similar en tamaño al generado por las orugas. Las plantas se colocaron individualmente en frascos de vidrio y se sellaron herméticamente con una unión esmerilada que se ajustó en el exterior con aros de acero y tornillos. El aire purificado en filtros de carbón activado ingresó a los recipientes a una velocidad de 1 L/min y arrastró los compuestos volátiles hacia la trampa Porapak-Q [80/100 mesh, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU. Según el fabricante, el Porapak-Q es un polímero poroso compuesto de poli(etilvinilbenceno) y poli(divinilbenceno)], a una velocidad de 0,8 L/min. Las trampas de volátiles consistieron en tubos de vidrio de 7 cm con 25 mg de adsorbente Porapak-Q, que se mantuvo en su lugar mediante una malla metálica fina de un lado y un poco de fibra de vidrio sostenida por un pedazo

de teflón (2 mm de longitud) en el otro. La trampa se ubicó de manera horizontal en una de las salidas de la parte superior de cada recipiente. Una manguera (6 mm d.i.) se conectó a la trampa de volátiles, luego al flujómetro y, de allí, hacía una bomba de vacío. Las otras entradas se sellaron con tapas rosca de teflón. Los HIPV se muestrearon cada hora durante las primeras dos horas de ataque de la oruga y en intervalos de dos horas para 4, 6, 8 y 10 h después del inicio del experimento. Antes de cada ensayo, el Porapak-Q de cada trampa se purgó con diclorometano (3 mL) y se realizaron blancos del recipiente y de la planta antes del ataque o del daño mecánico. Inmediatamente después de retirar la trampa del sistema, los volátiles atrapados en el Porapak-Q se eluyeron con diclorometano (150  $\mu$ L) que contenía undecanoato de metilo como estándar interno (9,8 ng/ $\mu$ L). El undecanoato de metilo se preparó pesando 4,96 mg en diclorometano (5 mL), una alícuota (500  $\mu$ L) se llevó a 50 mL con diclorometano. El extracto de diclorometano con los volátiles se recogió en insertos de vidrio (0,2 mL, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.) dentro de un vial de cromatografía y 2  $\mu$ L se inyectaron al GC-MS (columna DB-WAX, 60 m) en modo *splitless*.

#### **2.6.6 Identificación y análisis de los compuestos volátiles inducidos por herbivoría por GC-MS.**

La identificación de los compuestos volátiles se basó en los criterios cromatográficos (tiempos de retención e IRL) y espectroscópicos (comparación con bases de datos y materiales de referencia). Se usó una mezcla de *n*-alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub> para la determinación de los IRL, que siguieron la ecuación propuesta por van Den Dool y Kratz (1963).

Los datos cromatográficos y espectroscópicos se obtuvieron con un cromatógrafo de gases GC 7890 (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masa

5975C (AT, EI, 70 eV), inyector *split/splitless* operado en modo *splitless* y un sistema de datos *MS-ChemStation* G1701-DA. Se usaron columnas capilares de sílice fundida DB-5MS [(*J&W Scientific*) de 60 m × 0,25 mm d.i., recubiertos con 5%-fenil-PDMS (0,25 μm d<sub>f</sub>)] y DB-WAX [(*J&W Scientific*) de 60 m x 0,25 mm d.i., recubiertos con PEG (0,25 μm d<sub>f</sub>)]. La temperatura del horno en el GC se programó desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) @ 5 °C/min, luego a 230 °C (10 min) @ 5 °C/min. Cuando se usó la columna DB-5MS, se añadió un calentamiento final hasta 275 °C (15 min) @ 10 °C/min. Las temperaturas del puerto de inyección, la cámara de ionización y la línea de transferencia se ajustaron a 250 °C, 230 °C y 285 °C, respectivamente. Para la columna polar DB-WAX, la temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 230 °C. Se usó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga) como gas de arrastre, con una presión de entrada en la cabeza de columna de 155 kPa y una velocidad lineal de 27 cm/s (1 mL/min, a flujo constante). Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas (cromatogramas), se obtuvieron en el intervalo de masa  $m/z$  30-400 a 4 *scans/s*.

En todos los experimentos, las áreas cromatográficas de los HIPV detectados se usaron para calcular las abundancias relativas (Área GC relativa, %). Además, los HIPV en el sistema HS-SPME se reportaron como el área relativa con respecto a la del undecanoato de metilo ( $A_i/A_{istd}$ ) y en el sistema de P&T, se reportó la cantidad de compuesto emitido/hora de emisión (ng/h) (Erb y col., 2015), así:

$$C_x = \frac{C_{istd}}{A_{istd}} * \frac{A_x}{Int., h}$$

Donde:

$C_x$ , concentración del compuesto de interés en ng/h.

$C_{istd}$ , Concentración del undecanoato de metilo (9,8 ng/μL).

$A_{istd}$ , Área cromatográfica del undecanoato de metilo.

$A_x$ , Área cromatográfica del compuesto de interés.

Int., Intervalo de muestreo en horas.

## **2.7 Preferencia de oviposición de polillas hembras *U. ornatrix* en plantas sanas o previamente atacadas por orugas conespecíficas.**

Las hojas de *C. nitens* emitieron volátiles durante y después del ataque de las orugas *U. ornatrix*. Los HIPV liberados por la planta proporcionan información a insectos circundantes que influyen su comportamiento (De Moraes y col., 2001; El-Sayed y col., 2016). En este experimento, se evaluó la preferencia de la polilla *U. ornatrix* para ovipositar huevos en plantas *C. nitens* sanas o atacadas que emiten HIPV generados por la mordida con orugas conespecíficas.

Se colocaron dos plantas *C. nitens* de 15 semanas de siembra, cultivadas en el laboratorio (Sección 2.6.1) en una caja cúbica de cartón (60 cm de lado) cubierta con tela de tul. En un lado, se colocó una planta sin daño y en el otro lado, una planta que había sido atacada durante 2 h por orugas *U. ornatrix* (seis orugas, instar tres criadas como se describió en la Sección 2.5.1). Las larvas se retiraron de la planta antes de colocarlas en la caja. Se liberaron cinco polillas hembras *U. ornatrix* (11:30 a.m.) de seis días de edad, previamente apareadas. Se realizó el mismo procedimiento de preferencia de oviposición de la polilla usando dos plantas sanas en una segunda caja y dos plantas atacadas en la tercera. Los tres tratamientos se realizaron simultáneamente, pero separando las cajas más de 5 m para evitar el efecto de los volátiles provenientes de la caja vecina. La posición de las cajas se aleatorizó para tener en cuenta una posible preferencia de la polilla sobre la incidencia lumínica en la caja en el sitio del experimento. Las polillas se retiraron de las cajas a las 11:30 a.m. de la mañana siguiente y se

contaron los huevos en cada planta. El experimento se realizó en dos días diferentes y se usaron siete cajas en total por tratamiento.

## 2.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos (ANOVA) se realizaron con el *software* estadístico R, versión 3.6.1 (R *Foundation for Statistical Computing*, Viena, Austria, <https://www.r-project.org>). Las pruebas de comparación múltiples *post hoc* se realizaron con pruebas de Tukey HSD (diferencias honestamente significativas). Los conjuntos de datos de los experimentos que no cumplieron los supuestos para el ANOVA, se transformaron antes del análisis. La preferencia de oviposición de las polillas por las plantas sanas o atacadas se realizó con pruebas *t* de *Student* para varianzas no homogéneas con un intervalo de confianza del 95%.

### 3 Resultados

La recolección de los especímenes de *Crotalaria* se realizó en bordes de las carreteras y en pastizales en los alrededores de Bucaramanga. Se tuvieron en cuenta solamente aquellos sitios donde había plantas con flores y semillas maduras. Las plantas de los 24 sitios colectados pertenecieron a seis especies (*C. retusa* L., *C. pallida* Aiton, *C. spectabilis* Roth, *C. incana* L., *C. maypurensis* Kunth, and *C. nitens* Kunth, véase Apéndice C).

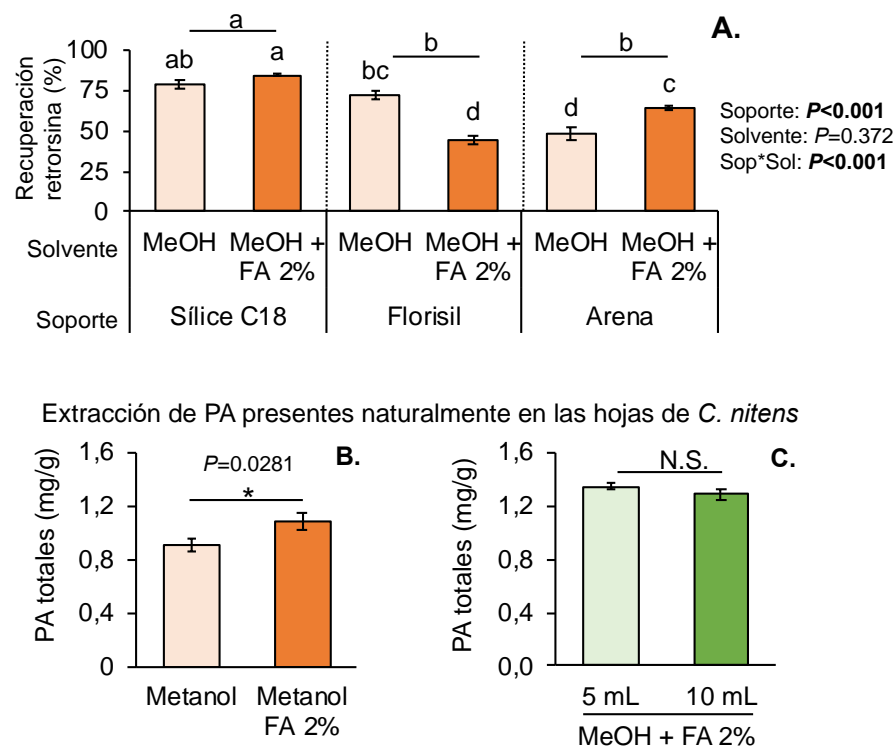
#### 3.1 Extracción e identificación de alcaloides pirrolizidínicos presentes en las especies de *Crotalaria* y especímenes *U. ornatrix*

##### 3.1.1 Condiciones de extracción y análisis por LC-MS

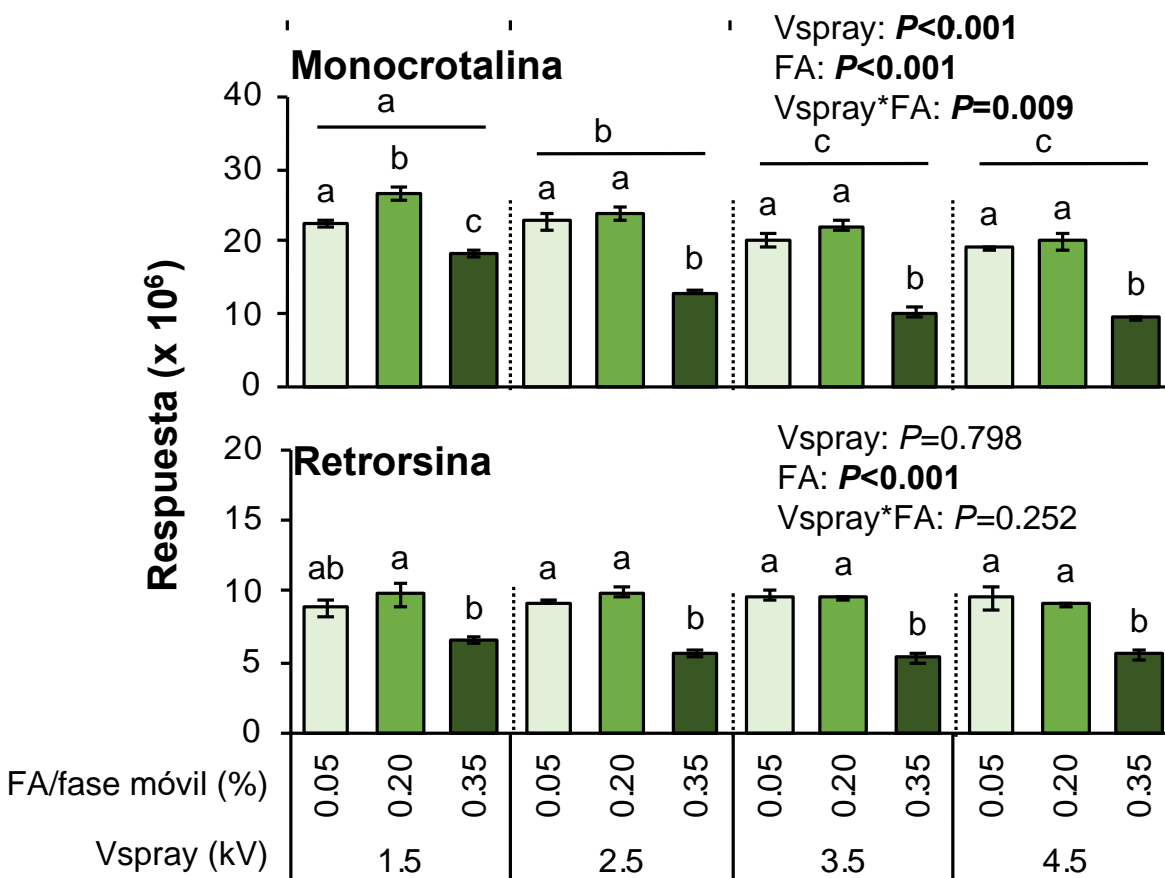
La extracción de los alcaloides se realizó por MSPD y el análisis simultáneo de los PA y sus *N*-óxidos en *Crotalaria* spp. por LC-MS. La MSPD es una técnica que se caracteriza por su simplicidad y flexibilidad, particularmente, para la extracción selectiva de muestras biológicas sólidas y semisólidas (Barker y col., 1989). La extracción de MSPD se realizó mediante la mezcla en un mortero de la muestra con uno de tres agentes dispersantes, *e.g.* gel de sílice-C<sub>18</sub>, arena o florisil. Se determinó el porcentaje de recuperación de la retrorsina, que no se encuentra naturalmente en las hojas de *C. nitens*, con metanol o metanol con FA al 2%. La adición de FA al metanol no tuvo efecto en la recuperación de la retrorsina ( $F_{1,12} = 0,86$ ;  $P = 0,372$ ) (**Figura 14A**). Sin embargo, el metanol modificado con FA al 2% extrajo más cantidad de los PA presentes naturalmente en las hojas de *C. nitens* (monocrotalina, crotaleschenina, integerrimina y sus respectivos *N*-óxidos) ( $F_{1,12} = 5.3$ ;  $P = 0.0281$ , **Figura 14B**), con cinco mL de metanol, que fueron suficientes para extraer los alcaloides (**Figura 14C**). La recuperación de retrorsina fue mayor cuando se usó gel de sílice-C<sub>18</sub> como agente dispersante, en comparación con arena o

florisil ( $F_{2,12} = 63.2$ ;  $P < 0.001$ ). La monocrotalina y la retrorsina se usaron para determinar si la adición de FA al 0.5%, 0.2% o 0.35% a la fase móvil (FA/agua o FA/acetonitrilo) o la variación del Vspray entre 1.5 kV y 4.5 kV, tenían un efecto en el analizador *Orbitrap*-MS. Mientras que el Vspray no tuvo ningún efecto sobre la respuesta del *Orbitrap*-MS en la retrorsina ( $F_{3,24} = 0.34$ ;  $P = 0.798$ ) (**Figura 15**), con el Vspray de 1.5 kV se obtuvo una respuesta más alta para la monocrotalina en comparación con la de 3.5 kV y 4.5 kV ( $F_{3,24} = 39.8$ ;  $P < 0.001$ ).

**Figura 14.** Montaje del método de extracción MSPD. **A.** Efecto del agente dispersante y el solvente en la recuperación de retrorsina de hojas secas de *C. nitens* ( $n = 3$ ). Promedio  $\pm$  error estándar. **B.** Efecto del solvente y **C.** Efecto del volumen del solvente en la extracción de los PA presentes naturalmente en las hojas de *C. nitens* ( $n = 6$ ). Promedio  $\pm$  error estándar. ANOVA, las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba *post hoc* de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) ( $\alpha = 0.05$ ). N.S., no significativo.



**Figura 15.** Incidencia de la concentración del ácido fórmico (FA) en fase móvil y el voltaje de electronebulización ( $V_{\text{spray}}$ ) sobre la respuesta de *Orbitrap*-MS a las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  de monocrotalina (28 ng/mL) y de retrorsina (27 ng/mL). Promedio  $\pm$  error estándar;  $n = 3$ . ANOVA, las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba *post hoc* de Tukey HSD ( $\alpha = 0.05$ ).



En general, la concentración de FA en la fase móvil de 0.05% y 0.2% produjo una respuesta más alta del *Orbitrap*-MS a la monocrotalina ( $F_{2,24} = 214.5$ ;  $P < 0.001$ ) y la retrorsina ( $F_{2,24} = 99.1$ ;  $P < 0.001$ ) en comparación la obtenida con 0.35% de FA. Los resultados (**Figura 15**) mostraron que la respuesta más alta del *Orbitrap*-MS a la monocrotalina fue cuando se ajustó el  $V_{\text{spray}}$  a 1.5 kV y la fase móvil contenía 0.2% de FA. La recuperación más alta de PA

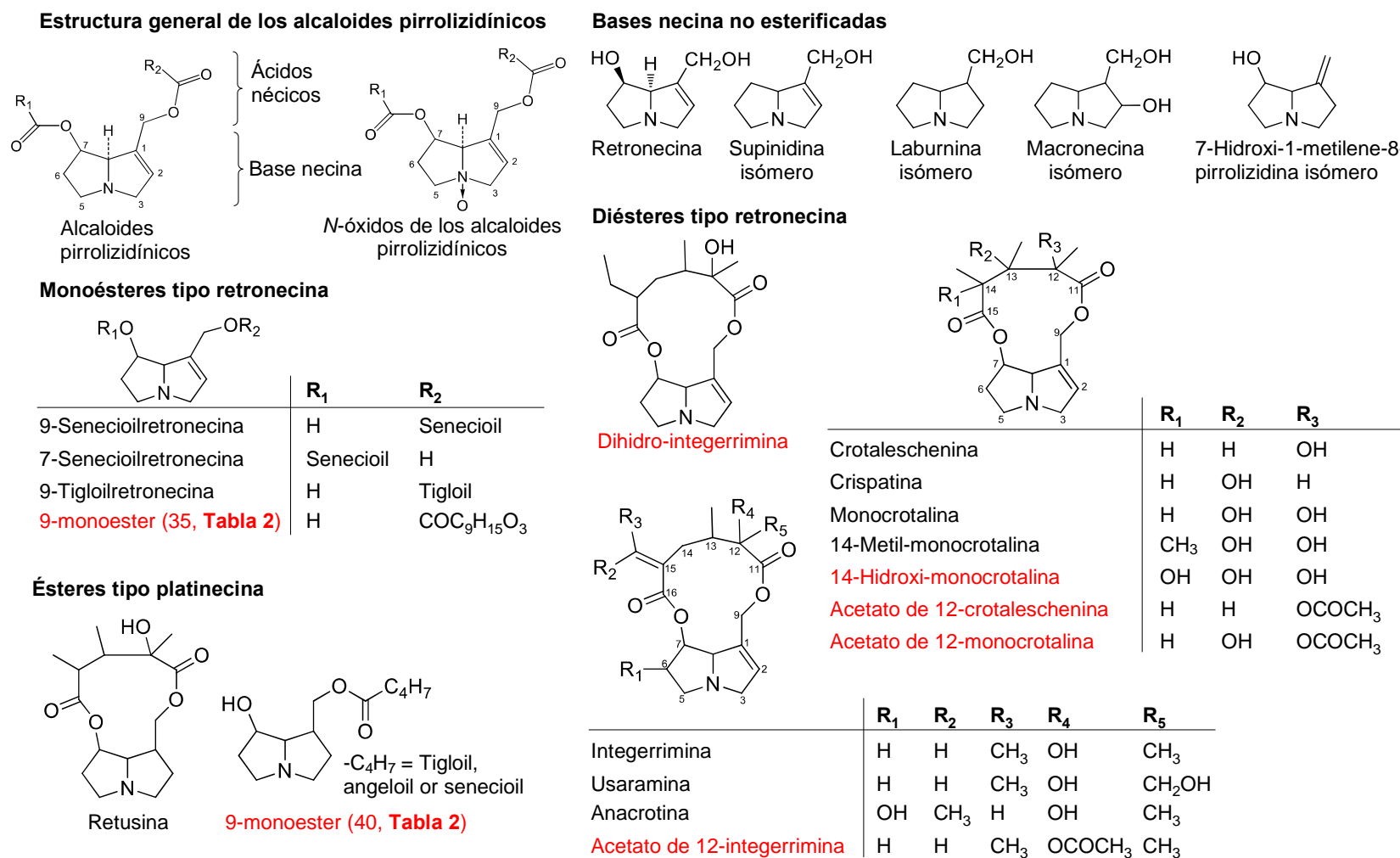
en el material vegetal se logró utilizando gel de sílice-C<sub>18</sub> como agente dispersante y metanol con 2% de FA para la elución.

### 3.1.2 Detección e identificación de alcaloides pirrolizidínicos y sus *N*-óxidos

El análisis por LC-MS permitió detectar 45 alcaloides en las diferentes partes de las seis especies de *Crotalaria* estudiados y, adicionalmente, siete PA exclusivamente de *U. ornatrix* para un total de 52 diferentes compuestos (**Tabla 2**), 27 de ellos, eran PA libres y 25 *N*-óxidos, mientras que por GC-MS se detectaron 16 de los PA libres (**Tabla 3**). Los PA se clasificaron según sus características estructurales así: bases de necina no esterificadas, monoésteres de tipo retronecina, diésteres de tipo retronecina (cíclicos de 11 y 12 miembros) y ésteres de tipo platinecina (**Figura 16**).

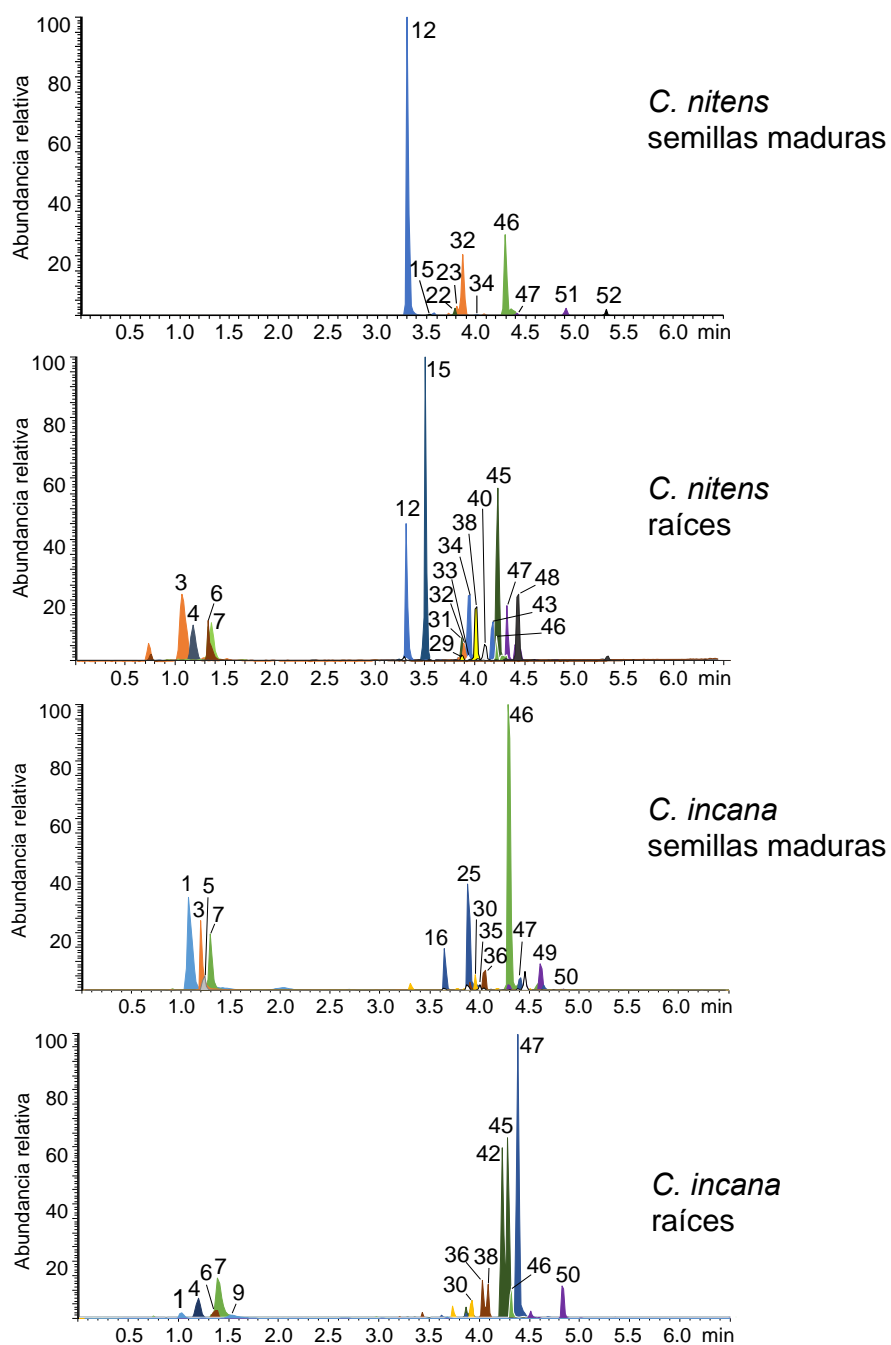
La **Figura 17** presenta los perfiles cromatográficos de los PA detectados en raíces y semillas de *C. nitens* y *C. incana*. Las dos especies contienen una muestra representativa de los PA encontrados en el presente trabajo y la **Figura 18** muestra la estructura química de los PA y PA-*N*-óxidos transformados por *U. ornatrix*.

**Figura 16.** Alcaloides pirrolizidínicos detectados en raíces, hojas, flores y semillas de las especies de *Crotalaria* colectadas en el presente estudio. Las moléculas resaltadas en rojo no se habían reportado previamente en literatura.



**Figura 17.** Ejemplos de los perfiles cromatográficos obtenidos por LC-MS (*Orbitrap*) de los extractos de alcaloides pirrolizidínicos y algunos de sus *N*-óxidos, obtenidos por MSPD de semillas maduras y raíces de *C. nitens* y *C. incana*. Véase la identificación de los picos en la

**Tabla 2.**



**Tabla 2.** Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por LC–MS (*Orbitrap*) de alcaloides pirrolizidínicos y algunos de sus *N*–óxidos detectados en raíces, hojas, flores y semillas de especies de *Crotalaria* y especímenes de *U. ornatrix*.

N° Fig. 17	Alcaloide pirrolizidínico	Fórmula	HCD, eV	[M+H] <sup>+</sup> (I, %) Experimental	Error, Δppm	Fragmentos característicos <i>m/z</i> (I, %)	Crit. ident.	Ref.
1	Retronecina	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	30	156.10198 (62)	0.45	138.09183 (9), 112.07589 (29), 108.08082 (45), <b>94.06578</b> (54), <b>82.06577</b> (63), <b>80.04982</b> (100)	a	
2	Dihidropirrolizina, N.I.	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	30	138.05497 (33)	0.07	110.06016 (95), <b>96.04499</b> (47), <b>94.06544</b> (100), 85.02953 (33), <b>80.04920</b> (8)	b, c	Flores y col., 2009
3	Macronecina isómero	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	50	158.11763 (100)	0.44	140.09283 (3), 122.09010 (14), 108.08025 (83), 84.06540 (29), 82.06535 (38), 80.05012 (60)	b, c	Aasen y col., 1969
4	<i>N</i> –Óxido de retronecina	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	30	172.09701 (100)	1.1	111.06800 (49), <b>94.06503</b> (25), <b>80.05016</b> (99)	b	Ruan y col., 2012
5	7–Hidroxi–1– metilene–8– pirrolizidina	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO	30	140.10697 (14)	–0.14	<b>96.08078</b> (100), 83.07274 (38), <b>82.06567</b> (37)	b, c	Flores y col., 2009
6	<i>N</i> –Óxido de macronecina isómero	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	40	174.11264 (70)	0.98	156.10174 (5), 124.07289 (3), <b>96.06879</b> (4), 83.07338 (100)	b	Ruan y col., 2012
7	Laburnina isómero	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO	50	142.12297 (87)	0.91	124.11103 (11), <b>122.09683</b> (5), 108.08125 (60), <b>96.07726</b> (24), <b>82.06539</b> (100), <b>80.05064</b> (62)	b, c	Neuner-Jehle y col., 1965
8	Supinidina isómero	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO	30	140.10692 (16)	–0.50	122.09651 (95), <b>120.08093</b> (45), 107.07281 (44), 106.06528 (52), <b>94.06553</b> (93), 82.06559 (55), <b>80.05028</b> (100)	b, c	Flores y col., 2009; Tufariello y Tette, 1975
9	<i>N</i> –Óxido de 7– Hidroxi–1–metilene– 8–pirrolizidina	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	30	156.10195 (55)	0.26	138.09134 (5), <b>95.07323</b> (100), <b>94.06561</b> (23)	b	Ruan y col., 2012
10	14–Hidroxi– monocrotalina isómero	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	30	342.15459 (100)	–0.41	324.14405 (7), 296.14924 (7), 140.10691 (34), <b>138.08998</b> (11), <b>120.08077</b> (50), <b>94.06568</b> (16)	b	These y col., 2013

**Tabla 2.** Continuación.

11	<i>N</i> -Óxido de creatonotina A	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	30	272.14916 (49)	-0.33	172.09691 (45), 154.08383 (10), <b>138.0913</b> (100), <b>136.07475</b> (28), <b>94.06524</b> (54)	b	Hartmann y col., 2005; Beuerle y col., 2007
12	Monocrotalina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	40	326.15953 (10)	-0.86	298.16491 (3), 280.15425 (3), 237.13582 (5), 194.11759 (18), <b>138.09131</b> (18), 121.08824 (75), <b>120.08104</b> (100), <b>94.06591</b> (39)	a	
13	<i>N</i> -Óxido de <i>iso</i> -Creatonotina B	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	40	286.16490 (100)	0.01	172.09691 (41), 155.09465 (8), <b>136.07581</b> (11), 111.06808 (47), <b>94.06534</b> (25)	b	Hartmann y col., 2005; Beuerle y col., 2007
14	Creatonotina B	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	20	270.16971 (100)	-1.0	156.10128 (18), <b>138.09093</b> (43), <b>120.07927</b> (21), <b>94.06507</b> (85)	b	Hartmann y col., 2005; Beuerle y col., 2007
15	<i>N</i> -Óxido de monocrotalina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	40	342.15461 (100)	-0.35	236.12801 (17), <b>136.07573</b> (28), <b>120.08045</b> (36), 119.07291 (40), <b>118.06606</b> (26), <b>94.06556</b> (23)	b, d	These y col., 2013
16	Anacrotina isómero	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	50	352.17581 (8)	0.99	264.15980 (1), 236.12844 (4), 156.10190 (11), <b>138.09163</b> (38), <b>120.08115</b> (83), <b>94.06595</b> (100), 80.05071 (48)	b	Asres y col., 2004; Mattocks, 1968
17	<i>N</i> -Óxido de anacrotina isómero	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	50	368.16980 (61)	-1.6	<b>136.07551</b> (42), <b>120.07933</b> (78), <b>118.06555</b> (69), <b>94.06535</b> (100), 80.05038 (23)	b	Ruan y col., 2012
18	<i>N</i> -Óxido de creatonotina B	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	40	286.16502 (100)	0.42	172.09697 (18), 155.09453 (4), <b>138.09148</b> (50), <b>136.0759</b> (16), 111.06718 (19), <b>94.06554</b> (95)	b	Hartmann y col., 2005; Beuerle y col., 2007
19	14-Metil-monocrotalina isómero	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	40	340.17603 (7)	1.7	252.15932 (2), 208.13044 (33), <b>138.09105</b> (17), <b>120.08113</b> (100), <b>94.06567</b> (57)	b	These y col., 2013
20	Retusina	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	50	312.18024 (6)	-0.99	284.18536 (11), 158.11756 (79), <b>140.10698</b> (77), <b>122.09653</b> (100), <b>96.08036</b> (45), 82.06559 (27)	b, c	Aasen y col., 1969

Tabla 2. Continuación.

21	<i>N</i> -Óxido de macronecina-derivado (tipo creatonotina B)	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	40	288.18008 (89)	-1.6	174.11236 (100), <b>156.1018</b> (25), <b>140.10679</b> (51), 124.07645 (19), <b>96.08031</b> (53), 83.07301 (98)	b	Hartmann y col., 2005; Beuerle y col., 2007
22	12-Acetato de monocrotalina isómero	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	30	368.16964 (100)	-1.2	326.16250 (5), <b>280.15370</b> (63), 164.10505 (32), <b>138.090931</b> (5), <b>120.08072</b> (79), <b>94.06556</b> (12)	b	These y col., 2013
23	PA tipo retronecina, N.I.	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	30	310.16505 (14)	0.48	280.15376 (3), <b>138.09142</b> (28), <b>120.08096</b> (92), <b>94.06558</b> (100)	b	Ruan y col., 2012
24	<i>N</i> -Óxido de 14-metil-monocrotalina isómero	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	50	356.17066 (80)	0.79	<b>136.07607</b> (78), <b>120.08085</b> (94), <b>118.06597</b> (65), <b>94.06547</b> (100), 80.05104 (38)	b	Ruan y col., 2012
25	Usaramina	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	40	352.17581 (48)	0.99	324.18086 (24), 276.15968 (9), 248.16470 (2), 220.13199 (8), <b>138.09164</b> (70), <b>120.08112</b> (100), <b>94.06601</b> (53)	b, c, d	Fletcher y col., 2009; Castells y col., 2014
26	<i>N</i> -Óxido de laburnina-derivado (tipo creatonotina B)	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	40	272.18597 (100)	1.2	<b>158.11789</b> (77), <b>140.10727</b> (22), 124.1124 (72), 110.09624 (13), 83.07359 (30)	b	Hartmann y col., 2005; Beuerle y col., 2007
27	<i>N</i> -Óxido del 12-acetato de monocrotalina	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>8</sub>	50	384.16558 (100)	0.75	<b>136.07604</b> (62), <b>120.08077</b> (80), <b>118.06579</b> (67), 108.07943 (40), <b>94.06520</b> (68), 80.05086 (26)	b	Ruan y col., 2012
28	PA- <i>N</i> -óxido tipo retronecina, N.I.	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	40	352.17597 (17)	1.4	324.18101 (8), 184.16961 (16), 154.08693 (27), <b>136.07629</b> (27), <b>120.08115</b> (18), 108.08029 (24), <b>94.06564</b> (100), 80.05053 (24)	b	Ruan y col., 2012
29	7-Senecioilretronecina	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	30	238.14358 (23)	-0.80	156.10144 (32), <b>138.0906</b> (87), <b>120.08027</b> (91), 108.0795 (60), <b>94.06543</b> (95), 83.0496 (100)	b, c	Asres y col., 2004; Flores y col., 2009; Pedersen, 1970
30	<i>N</i> -Óxido de usaramina	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	50	368.16995 (100)	-1.2	<b>136.07549</b> (49), <b>120.08052</b> (72), <b>118.0654</b> (68), <b>94.06527</b> (97), 80.05023 (22)	b	Ruan y col., 2012

**Tabla 2.** Continuación.

31	<i>N</i> -Óxido de 7-senecioilretronecina	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	30	254.13849 (13)	-0.75	<b>136.07543</b> (35), 111.06588 (39), <b>106.06542</b> (100), <b>94.06500</b> (40), 83.04993 (37), 80.05011 (55)	b	Ruan y col., 2012
32	Crotaleschenina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	40	310.16484 (40)	-0.19	282.16993 (33), 264.15955 (4), <b>222.14914</b> (3), 194.11765 (1), 156.10199 (24), <b>138.09134</b> (60), <b>120.08097</b> (86), <b>94.06562</b> (100)	b, c	Smith y col., 1988
33	<i>N</i> -Óxido de retusina	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	50	328.17516 (47)	-0.91	154.08621 (37), <b>140.10660</b> (49), <b>138.0912</b> (34), <b>122.09621</b> (90), <b>120.08075</b> (100), 82.06538 (72)	b	Ruan y col., 2012
34	<i>N</i> -Óxido de crotaleschenina	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	50	326.15986 (100)	0.15	<b>136.07579</b> (55), <b>120.08061</b> (57), 119.07237 (51), <b>118.06621</b> (76), <b>94.06547</b> (76)	b	Ruan y col., 2012
35	PA 9-monoéster tipo retronecina, N.I.	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	20	354.19169 (16)	1.6	336.1809 (6), 318.1704 (4), <b>156.10271</b> (15), <b>138.09152</b> (100), <b>120.08102</b> (22), <b>94.06566</b> (22), 82.06563 (15)	b	Ruan y col., 2012
36	9-Tigloilretronecina isómero	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	30	238.14378 (5)	0.04	<b>138.09124</b> (11), <b>120.08103</b> (22), <b>94.06560</b> (100)	b, c, d	Witte y col., 1993; Zhang y col., 2014
37	Crispatina isómero	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	30	310.16518 (89)	0.90	266.13933 (38), <b>237.13652</b> (12), 194.11804 (9), <b>138.09126</b> (25), <b>120.08121</b> (100), <b>94.06544</b> (36)	b, c	Smith y col., 1988
38	9-Senecioilretronecina	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	30	238.14350 (5)	-1.1	156.09950 (1), <b>138.09054</b> (5), <b>120.08087</b> (15), <b>94.06548</b> (100)	b, c, d	Asres y col., 2004; Flores y col., 2009
39	PA- <i>N</i> -óxido 9-monoéster tipo retronecina, N.I.	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>7</sub>	50	370.18643 (18)	1.1	<b>172.09709</b> (25), <b>138.09155</b> (42), <b>136.07595</b> (17), 111.06697 (23), <b>94.06559</b> (100), 80.05024 (13)	b	Ruan y col., 2012
40	PA 9-monoéster tipo platinecina, N.I.	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	30	240.15921 (12)	-0.87	158.11736 (27), <b>140.10689</b> (56), <b>122.09653</b> (100), <b>96.08128</b> (32), 83.04961 (76)	b, c	Aasen y col., 1969

**Tabla 2.** Continuación.

41	<i>N</i> -Óxido de callimorfina	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	30	314.16020 (57)	1.2	254.13897 (100), <b>154.08561</b> (54), <b>138.09028</b> (65), <b>136.07409</b> (50), 93.05444 (52)	b	Hartmann y col., 2005; Beuerle y col., 2007
42	<i>N</i> -Óxido de 9-tigloilretronecina	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	50	254.13860 (59)	-0.31	154.08633 (20), <b>136.07575</b> (32), <b>94.06513</b> (68), 93.05758 (100), 80.05019 (55)	b	Ruan y col., 2012
43	<i>N</i> -Óxido de crispatina isómero	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	30	326.15971 (81)	-0.31	154.08544 (12), <b>138.09122</b> (100), <b>136.0749</b> (38), <b>118.06558</b> (14), <b>94.06499</b> (52)	b	Ruan y col., 2012
44	PA tipo retronecina, N.I.	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	30	308.14891 (68)	-1.10	182.08094 (19), <b>138.08567</b> (42), <b>120.08084</b> (100), <b>94.06512</b> (82)	b	These y col., 2013
45	<i>N</i> -Óxido de 9-senecioilretronecina	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	50	254.13833 (80)	-1.4	154.08625 (26), <b>136.07572</b> (31), <b>94.06518</b> (90), 93.05776 (100), 80.05018 (52)	b	Ruan y col., 2012
46	Integerrimina	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	50	336.18043 (8)	-0.36	308.18557 (3), 220.13323 (3), 156.10181 (6), <b>138.09126</b> (34), <b>120.08095</b> (78), <b>94.06569</b> (100)	b, c, d	Fletcher y col., 2009; Flores y col., 2009; Fang y col., 2014
47	<i>N</i> -Óxido de integerrimina	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	50	352.17570 (48)	0.68	<b>136.07585</b> (49), <b>120.08085</b> (71), <b>118.06566</b> (67), <b>94.06558</b> (100), 80.05083 (23)	b, d	Ruan y col., 2012; Fang y col., 2014
48	PA- <i>N</i> -óxido 9-monoéster tipo platinecina, N.I.	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	40	256.15447 (74)	0.55	156.10199 (10), <b>138.09183</b> (10), <b>120.08134</b> (15), 113.08403 (30), 95.07358 (28), 82.06596 (100)	b	Ruan y col., 2012
49	Dihidro-integerrimina isómero	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>	30	338.19631 (7)	0.33	<b>138.09107</b> (35), <b>120.08068</b> (39), <b>94.06537</b> (100)	b	These y col., 2013
50	<i>N</i> -Óxido de la dihidro-integerrimina	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	50	354.19132 (24)	0.59	<b>138.09148</b> (30), <b>136.07584</b> (32), <b>94.06540</b> (100), 80.05051 (12)	b	Ruan y col., 2012
51	12-Acetato de crotaleschenina isómero	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	40	352.17512 (19)	-1.0	<b>292.15406</b> (100), 264.15919 (3), 222.14926 (1), 194.11751 (1), <b>138.09129</b> (48), <b>120.08079</b> (59), <b>94.06566</b> (42)	b	These y col., 2013

**Tabla 2.** Continuación.

52	12-Acetato de integerrimina isómero	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	40	378.19149 (18)	1.0	<b>318.17035</b> (90), 220.13314 (3), <b>138.09048</b> (63), <b>120.08021</b> (100), 96.07677 (19), <b>94.06500</b> (23)	b	These y col., 2013
----	-------------------------------------	---	----	----------------	-----	--	---	--------------------

N.I., No identificado. Los compuestos resaltados en azul son los alcaloides transformados por *U. oratrix*. En negrita los fragmentos característicos para la identificación de los PA.

<sup>a</sup>Identificación confirmada con sustancias de referencia.

<sup>b</sup>Tentativamente identificados con base en el análisis de los espectros de masas, la fórmula molecular generada a partir de la masa exacta de la molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> y los fragmentos característicos en *m/z* 138.09134, *m/z* 120.08078 y *m/z* 94.06513 para los PA tipo retronecina y dos fragmentos adicionales en *m/z* 136.07569 y *m/z* 118.06513, para sus *N*-óxidos. Los fragmentos para los PA tipo platinecina fueron *m/z* 140.10699, *m/z* 122.09643 y *m/z* 96.08078.

<sup>c</sup>Los nombres se asignaron teniendo en cuenta la información complementaria obtenida por GC-MS (**Tabla 3**) y comparación de espectros de masas (EI, 70 eV) de la literatura (Neuner-Jehle y col., 1965; Aasen y col., 1969; Smith y col., 1988; Witte y col., 1993; Asres y col., 2004; Fletcher y col., 2009; Flores y col., 2009; Martins y col., 2015).

<sup>d</sup>Comparación de espectros de masas [ESI(+)-MS] con la literatura (Ruan y col., 2012; These y col., 2013; Castells y col., 2014; Fang y col., 2014; Avula y col., 2015; Schulz y col., 2015; Zhang y col., 2017).

**Tabla 3.** Índices de retención lineales e información espectroscópica GC–MS (EI, 70 eV) de los alcaloides pirrolizidínicos detectados en raíces, hojas, flores y semillas de especies de *Crotalaria* colectadas en el presente trabajo.

Alcaloide pirrolizidínico	Fórmula	Columna DB–5MS		M <sup>+</sup> (I, %)	Iones característicos m/z (I, %)
		IRL <sub>exp</sub>	IRL <sub>lit</sub>		
Retronecina <sup>a</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	1490	1199, 1487, 1465	155 (17)	138 (2), 111 (46), 94 (20), 80 (100), 68 (16)
Dihidropirrolizina, N.I. <sup>b</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	1189		137 (35)	109 (80), 108 (65), 94 (91), 80 (100), 53 (37)
Macronecina (Aasen y col., 1969) <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	1577	–	157 (19)	140 (12), 112 (11), 98 (27), 83 (100), 68 (12), 55 (33)
Laburnina (Neuner-Jehle y col., 1965) <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO	1408	–	141 (29)	124 (21), 110 (13), 84 (10), 83 (100), 82 (69), 55 (40)
Monocrotalina <sup>a</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	2370	2388, 2338, 2336,	325 (1)	236 (33), 138 (8), 137 (13), 136 (51), 121 (18), 120 (100), 119 (67), 95 (12), 94 (29), 93 (44), 80 (25)
Retusina (Aasen y col., 1969) <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	2245	2208	311 (12)	154 (43), 140 (42), 138 (22), 123 (29), 122 (49), 121 (12), 108 (12), 96 (19), 82 (100)
Usaramina <sup>b</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	2680	2695, 2673, 2647, 2640	351 (5)	220 (10), 138 (39), 137 (20), 136 (92), 121 (55), 120 (100), 119 (92), 95 (56), 94 (66), 93 (86), 80 (35)
7–Senecioilretronecina <sup>b</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	1843	1861, 1863	237 (2)	137 (20), 136 (18), 124 (20), 111 (29), 106 (40), 94 (25), 80 (100), 68 (10)
Crotaleschenina (Smith y col., 1988) <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	2221	–	309 (2)	222 (6), 138 (19), 137 (24), 136 (83), 121 (27), 120 (81), 119 (100), 95 (42), 94 (42), 93 (64), 80 (29)

**Tabla 3.** Continuación.

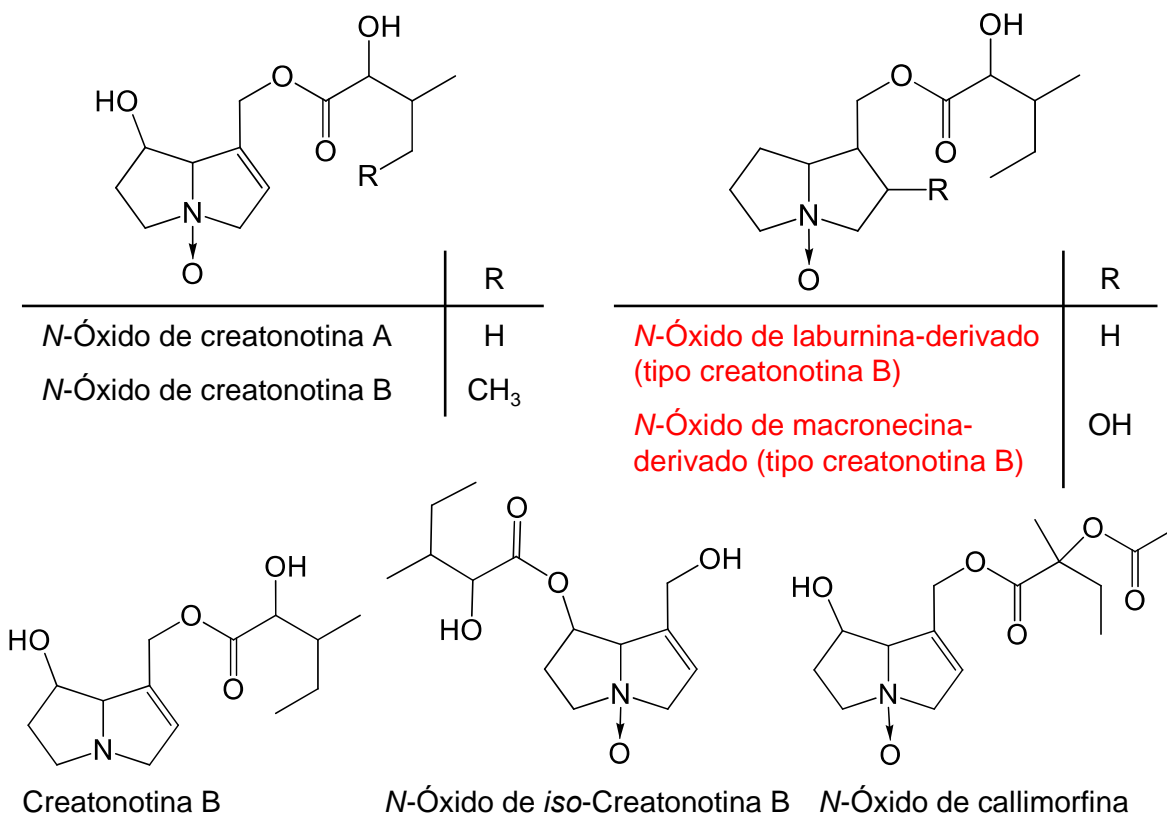
9–Tigloilretronecina <sup>b</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	1905	1888	237 (2)	193 (4), 154 (12), 138 (20), 137 (23), 136 (14), 94 (27), 93 (100), 80 (19)
Crispatina isómero (Smith y col., 1988) <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	2255	–	309 (12)	138 (22), 137 (25), 136 (100), 121 (39), 120 (94), 119 (83), 95 (26), 94 (36), 93 (100), 80 (33)
9–Senecioilretronecina <sup>b</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	1857	1826, 1890, 1875	237 (1)	193 (4), 154 (13), 138 (30), 137 (22), 136 (13), 94 (31), 93 (100), 80 (18)
PA tipo retronecina, N.I. <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	2241	–	307 (16)	220 (6), 138 (22), 137 (20), 136 (79), 121 (21), 120 (94), 119 (60), 95 (18), 94 (59), 93 (100), 80 (47)
Integerrimina <sup>b</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	2436	2451, 2414, 2410, 2402	335 (4)	291 (9), 248 (10), 220 (19), 138 (45), 137 (22), 136 (96), 121 (62), 120 (100), 119 (85), 95 (62), 94 (68), 93 (91), 80 (39)
12–Acetato de crotaleschenina isómero <sup>b</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	2347	–	351 (7)	264 (80), 236 (6), 185 (7), 138 (8), 137 (24), 136 (100), 121 (15), 120 (82), 119 (82), 95 (9), 94 (45), 93 (59), 80 (28)
12–Acetato de integerrimina isómero <sup>b</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	2624	–	377 (17)	290 (64), 137 (12), 136 (100), 121 (18), 120 (100), 119 (72), 95 (17), 94 (71), 93 (63), 80 (32)

N.I., no identificado.

<sup>a</sup> Identificación confirmada con material de referencia.

<sup>b</sup> Identificación tentativa basada en el análisis de los espectros de masas, su comparación con literatura (Neuner-Jehle y col., 1965; Aasen y col., 1969; Smith y col., 1988) y bases de datos (Wiley y NIST, concordancia >90%) o por comparación de los IRL experimentales con los reportados en literatura (Witte y col., 1993; Fletcher y col., 2009; Flores y col., 2009; Martins y col., 2015).

**Figura 18.** Alcaloides pirrolizidínicos detectados en oruga, polilla o huevos de *U. ornatrix*. Las moléculas resaltadas en rojo no se habían reportado en literatura (última revisión en octubre de 2020).

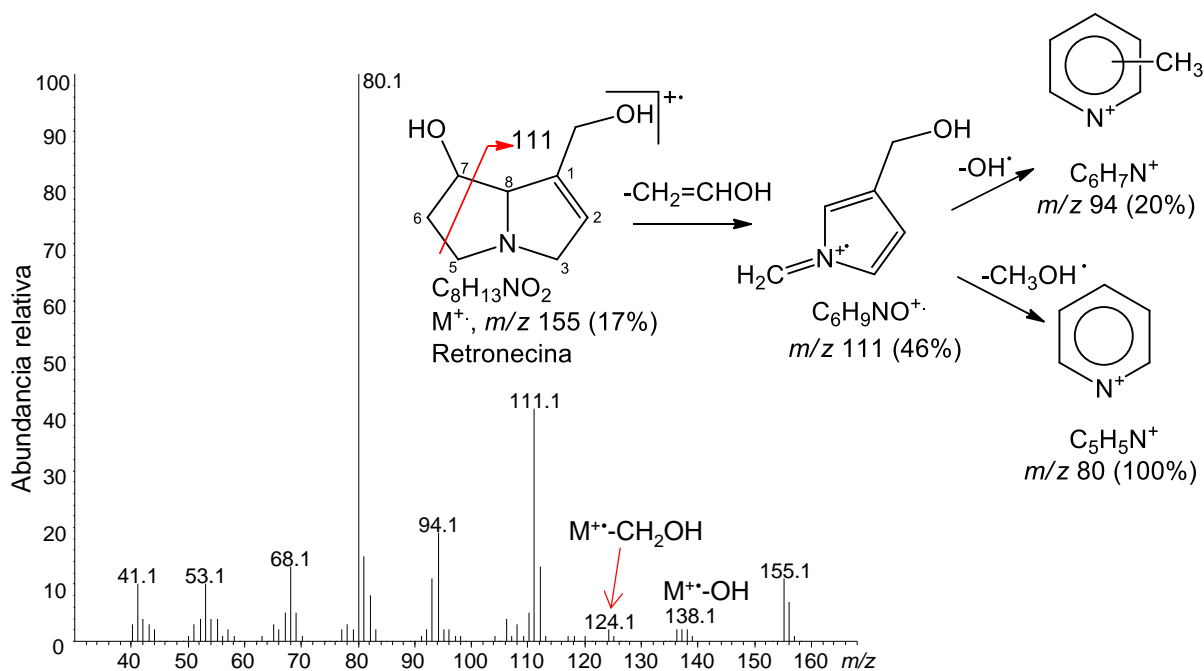


### 3.1.3 Patrones de fragmentación por impacto con electrones en GC-MS

El análisis GC-MS permitió encontrar en los extractos MSPD de *Crotalaria* spp. cuatro PA no esterificados, la retronecina, con IRL 1490 ( $M^+$ ,  $m/z$  155). Su espectro de masas mostró el fragmento en  $m/z$  111 que se forma a partir del ion molecular mediante una ruptura  $\beta$  con respecto al nitrógeno y ruptura simple del enlace entre los carbonos C(7)-C(8). El ion en  $m/z$  94 y el ion en  $m/z$  80 surgieron debido a las pérdidas radicales  $OH^\bullet$  y  $CH_2OH^\bullet$  del fragmento en  $m/z$  111, respectivamente (**Figura 19**). Los cationes resultantes en  $m/z$  94 y en

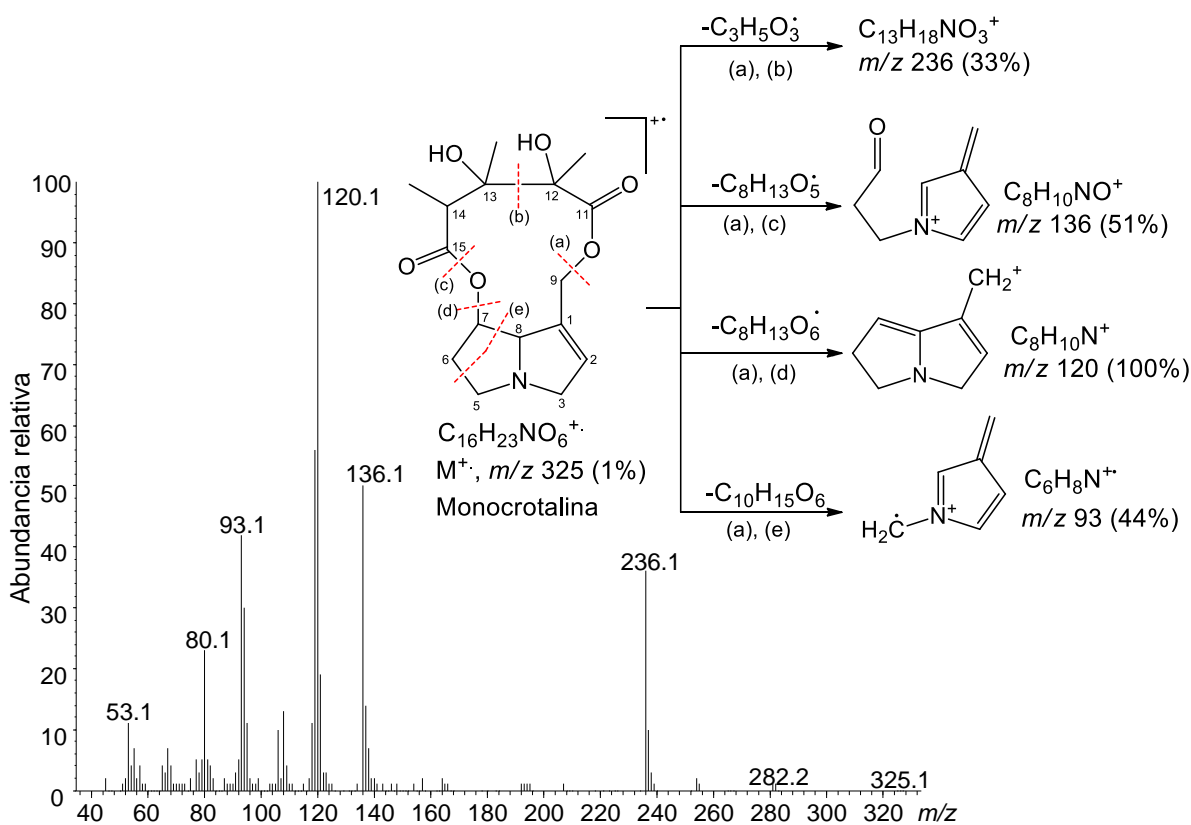
$m/z$  80 forman anillos aromáticos mas estables. Otro PA detectado fue la dihidropirrolizina con IRL 1189 ( $M^+$ ,  $m/z$  137) reportado por Flores y col. (2009) con fragmentos en  $m/z$  108,  $m/z$  91 y el pico de base en  $m/z$  80. El espectro MS de la macronecina con IRL 1577 ( $M^+$ ,  $m/z$  157) se asemeja al descrito por Aasen y col. (1969), mostró un pico base en  $m/z$  83 y otros picos en  $m/z$  140 ( $M-OH$ ),  $m/z$  98 y  $m/z$  55. La laburnina con IRL 1408 ( $M^+$ ,  $m/z$  141), su espectro de masas fue similar al del reportado por Neuner-Jehle y col. (1965), con un pico de base en  $m/z$  83 y otros fragmentos en  $m/z$  124 ( $M-OH$ ) y  $m/z$  110 ( $M-CH_2OH$ ). Los tres compuestos con  $M^+$ ,  $m/z$  237 se identificaron tentativamente como los monoésteres de 7-, 9-senecioilretronecina y 9-tigloilretronecina, según sus espectros de masas y los IRL de 1843, 1857 y 1905, respectivamente (Witte y col., 1993; Beuerle y col., 2007; Fletcher y col., 2009; Flores y col., 2009; Martins y col., 2015).

**Figura 19.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de la sustancia de referencia retronecina y su patrón de fragmentación. Tomado con modificaciones de Neuner-Jehle y col. (1965).



Los diésteres de tipo retronecina mostraron tres grupos predominantes de iones de fragmentos en (1)  $m/z$  138, 137 y 136; (2)  $m/z$  121, 120 y 119; y (3)  $m/z$  95, 94 y 93, con picos de base en  $m/z$  119 o en  $m/z$  120. La monocrotalina ( $M^+$ ,  $m/z$  325) se usó como ejemplo para mostrar su perfil de fragmentación. Los iones-fragmento más importantes fueron en  $m/z$  236, 136, 120, 93 (**Figura 20**). Los espectros de masas estudiados fueron similares a otros diésteres cíclicos como crotaleschenina, crispatina, integerrimina y usaramina (Smith y col., 1988; Witte y col., 1993; Asres y col., 2004; Flores y col., 2009; Fletcher y col., 2009; Hsieh y col., 2015). El espectro de masas del diéster de tipo platinecina con  $M^+$ ,  $m/z$  312 fue similar al de la retusina (Culvenor y Smith, 1957; Neuner-Jehle y col., 1965; Aasen y col., 1969).

**Figura 20.** Espectro de masas (EI, 70 eV) del material de referencia monocrotalina y su patrón de fragmentación. Tomado con modificaciones de Neuner-Jehle y col. (1965).



### 3.1.4 Análisis de espectros de masas de alcaloides pirrolizidínicos deuterados.

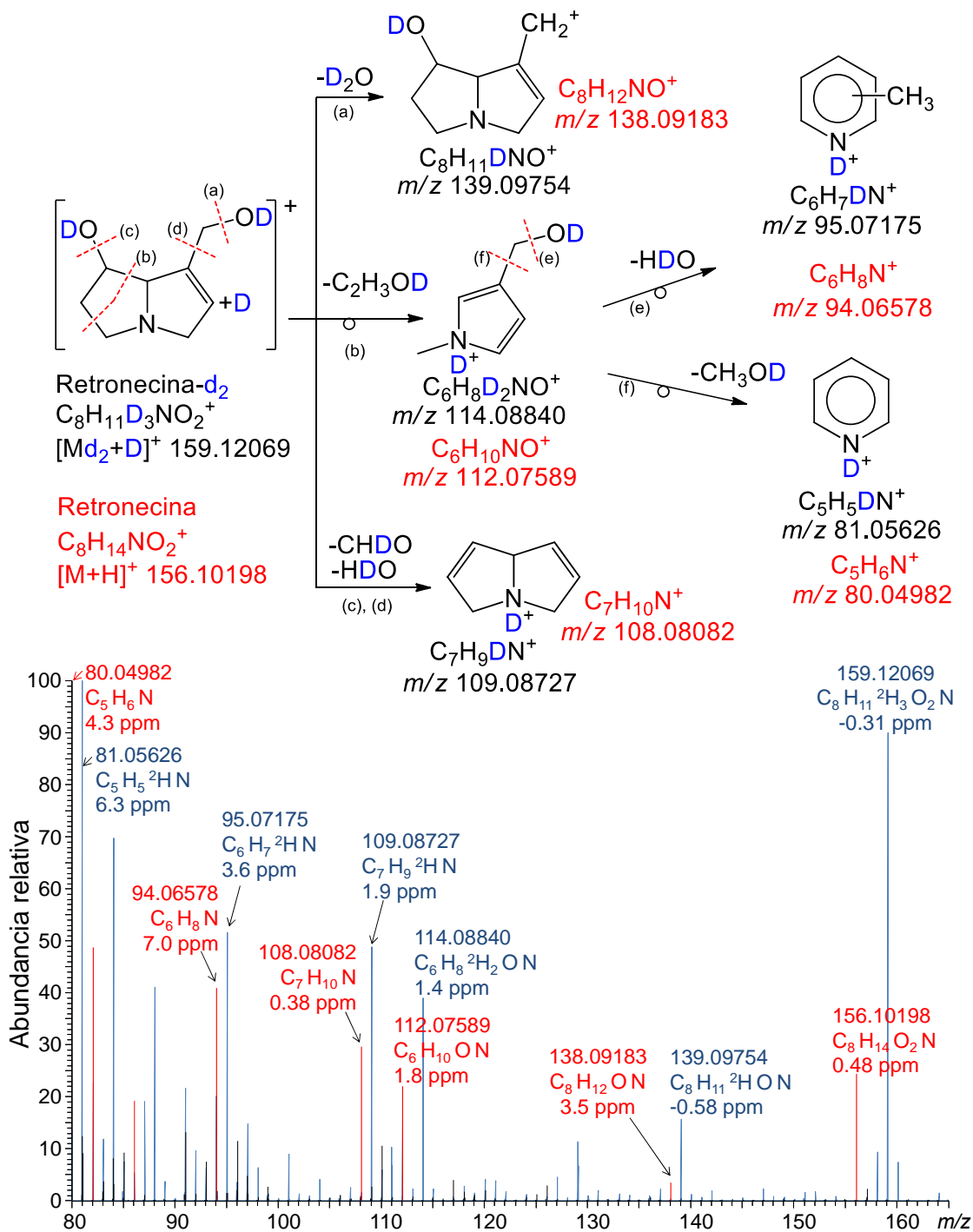
Los pocos reportes de literatura sobre las rutas de fragmentación para los PA analizados por ESI(+)-MS, se han sugerido solamente basados en los registros de los iones fragmento de los espectros de masas (Kamel y col., 2002; Niu y col., 2017). En este experimento se usó el intercambio H/D para dilucidar mejor las vías de fragmentación de los PA de los espectros de masas ESI(+)-MS. El alcaloide no esterificado retronecina, el monoéster heliotrina, el principal alcaloide de *Heliotropium indicum* (Pandey y col., 1982), y el diéster cíclico monocrotalina, se disolvieron en una mezcla de D<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>OD para realizar el intercambio H/D y posterior análisis por *Orbitrap*-MS. La inyección de los alcaloides deuterados y no deuterados se hizo directamente a la interfaz de electronebulización del espectrómetro de masas. En los espectros de masas se observó el intercambio H/D de todos los hidrógenos lábiles disponibles en los alcaloides y formación de la especie cargada [Md<sub>2</sub>+D]<sup>+</sup>. La retronecina-d<sub>2</sub> exhibió una señal en  $m/z$  159.12069 C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>D<sub>3</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup> [Md<sub>2</sub>+D]<sup>+</sup> (**Figura 21**). La formación del fragmento C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>D<sub>2</sub>NO<sup>+</sup> en  $m/z$  114.08840 fue el resultado de la escisión de los enlaces C(5)-C(6) y C(7)-C(8); el fragmento eliminado se llevó un deuterio, presumiblemente, de la posición C(7). La pérdida de HDO produjo C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>DN<sup>+</sup> en  $m/z$  95.07175 y la de CH<sub>3</sub>OD, el ion C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>DN<sup>+</sup> en  $m/z$  81.05626. La fragmentación de la retronecina-d<sub>2</sub> fue similar a la retronecina sin deuterar, analizada bajo las mismas condiciones, en la **Figura 21** los iones de retronecina aparecen en rojo (Modesto-Costa y col., 2018).

En el monoéster heliotrina se realizó el intercambio de H por D en la base necina C(7) y el H del ácido necínico. La especie cargada C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>D<sub>3</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> [Md<sub>2</sub>+D]<sup>+</sup> se registró en  $m/z$  317.21472. El primer fragmento que se observó fue generado debido a la ruptura del enlace éster (**Figura 22**) para dar lugar a C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>D<sub>3</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup> en  $m/z$  159.12068, con tres deuterios, lo que

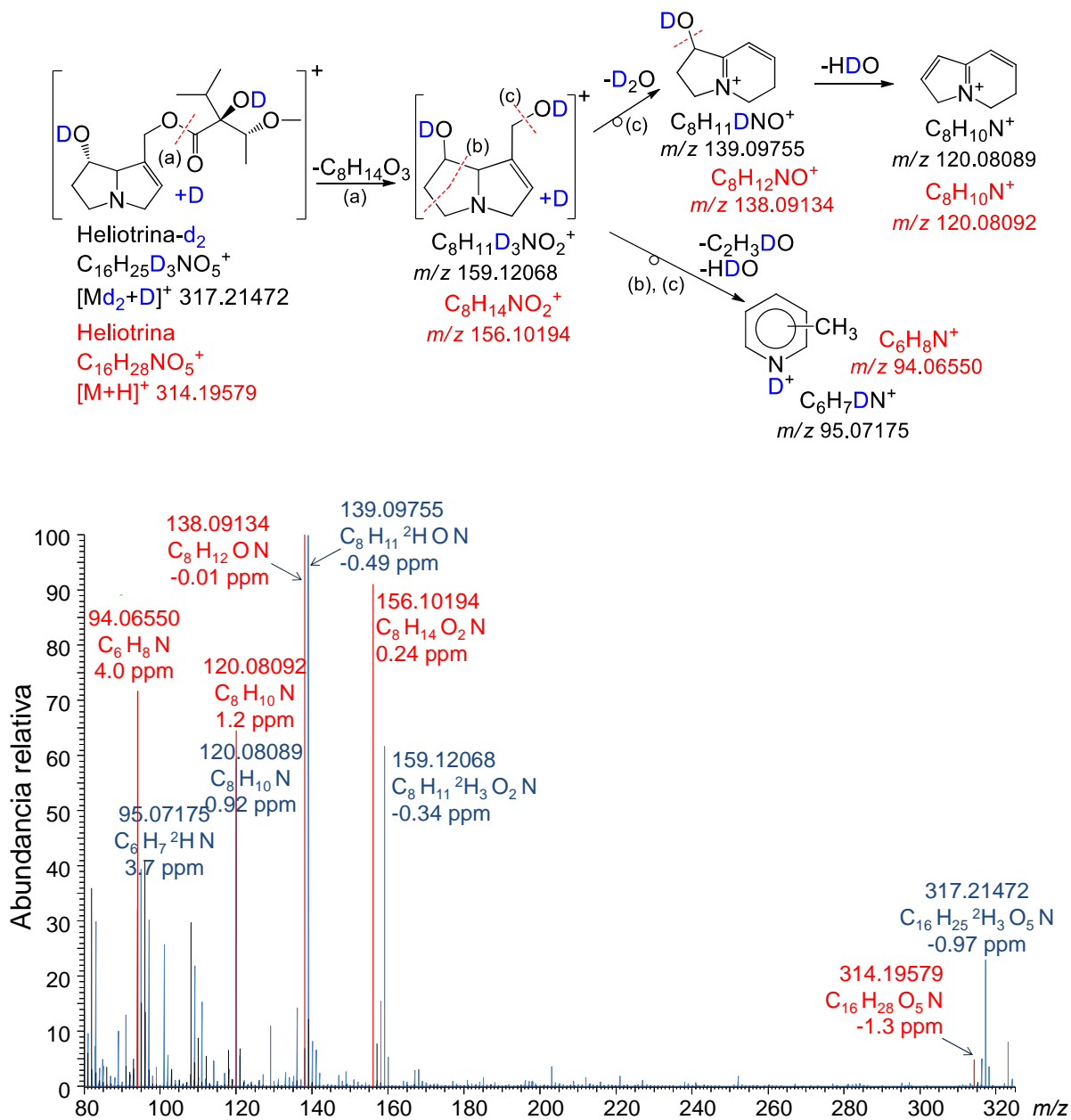
evidencia la migración del deuterio del ácido necínico ( $-\text{OD}$ ) a la base necina. Las pérdidas sucesivas de  $\text{D}_2\text{O}$  y  $\text{HDO}$  generaron los iones-fragmentos en  $m/z$  139.09755 y en  $m/z$  120.08089, respectivamente. La formación de  $m/z$  95.07175 se propuso a partir de ion  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{D}_3\text{NO}_2^+$ . La fragmentación de la heliotrina fue típica para otros PA monoésteres reportados en literatura (These y col., 2013).

La monocrotalina tiene sustituidos los dos grupos  $-\text{OH}$  de la base necina, pero contiene dos hidrógenos lábiles en el macrociclo. La especie deuterada que se formó fue  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{D}_3\text{NO}_6^+$   $[\text{Md}_2+\text{D}]^+$  registrada en  $m/z$  329.17822. Durante su fragmentación ocurrieron las pérdidas de  $\text{CO}$  y  $\text{D}_2\text{O}$ . Las rupturas posteriores de la molécula dieron los fragmentos en  $m/z$  139.09753 ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{DNO}^+$ ), en  $m/z$  122.09495 ( $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{DN}^+$ ) y en  $m/z$  95.07174 ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{DN}^+$ ) (**Figura 23**), mientras que en el espectro de masas de la monocrotalina no deuterada se registraron los fragmentos análogos en  $m/z$  138.09131 ( $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}^+$ ), en  $m/z$  120.08104 ( $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}^+$ ) y en  $m/z$  94.06591 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}^+$ ). La fragmentación de la base necina de la monocrotalina fue similar a la observada para integerrimina (**Figura 24**). Se propone la ruta de fragmentación para la integerrimina en la **Figura 25**. Los fragmentos son típicos de PA diésteres tipo retronecina (These y col., 2013; Avula y col., 2015; Zhang y col., 2017). Sin embargo, en el espectro de masas del *N*-óxido de integerrimina se registraron dos fragmentos adicionales en  $m/z$  136.07585 ( $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}^+$ ) y  $m/z$  118.06566 ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}^+$ ), en comparación con la base libre integerrimina. Estos fragmentos se han reportado para otros *N*-óxidos de tipo retronecina (Wuilloud y col., 2004; Colegate y col., 2005; Ruan y col., 2012; These y col., 2013; Fang y col., 2014; Avula y col., 2015; Schulz y col., 2015)

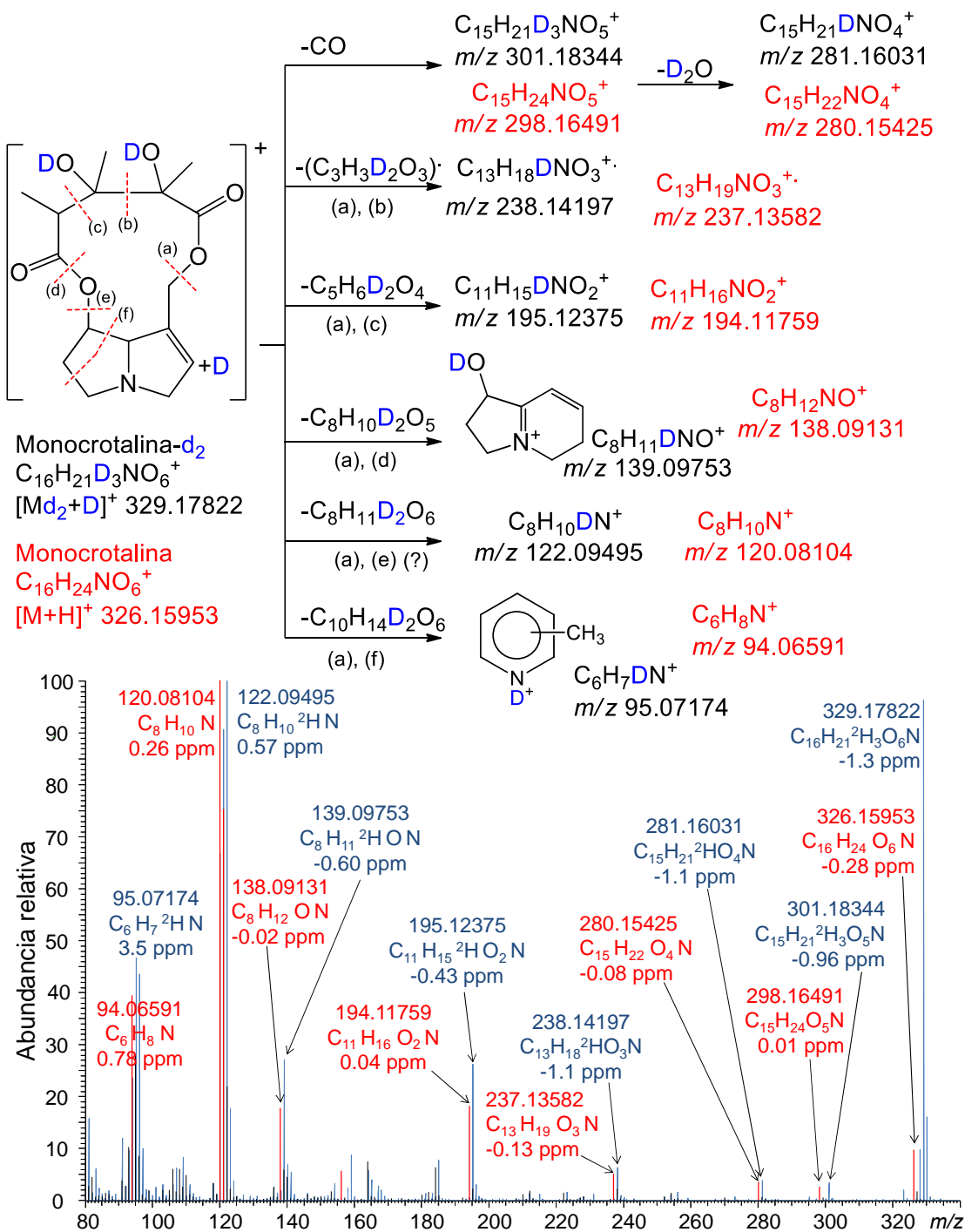
**Figura 21.** Patrón de fragmentación propuesto para un alcaloide pirrolizidínico **no esterificado**, según los espectros de masas (ESI, HCD: 30 eV, Orbitrap-MS) de la retronecina-d<sub>2</sub> (azul) y retronecina (rojo).



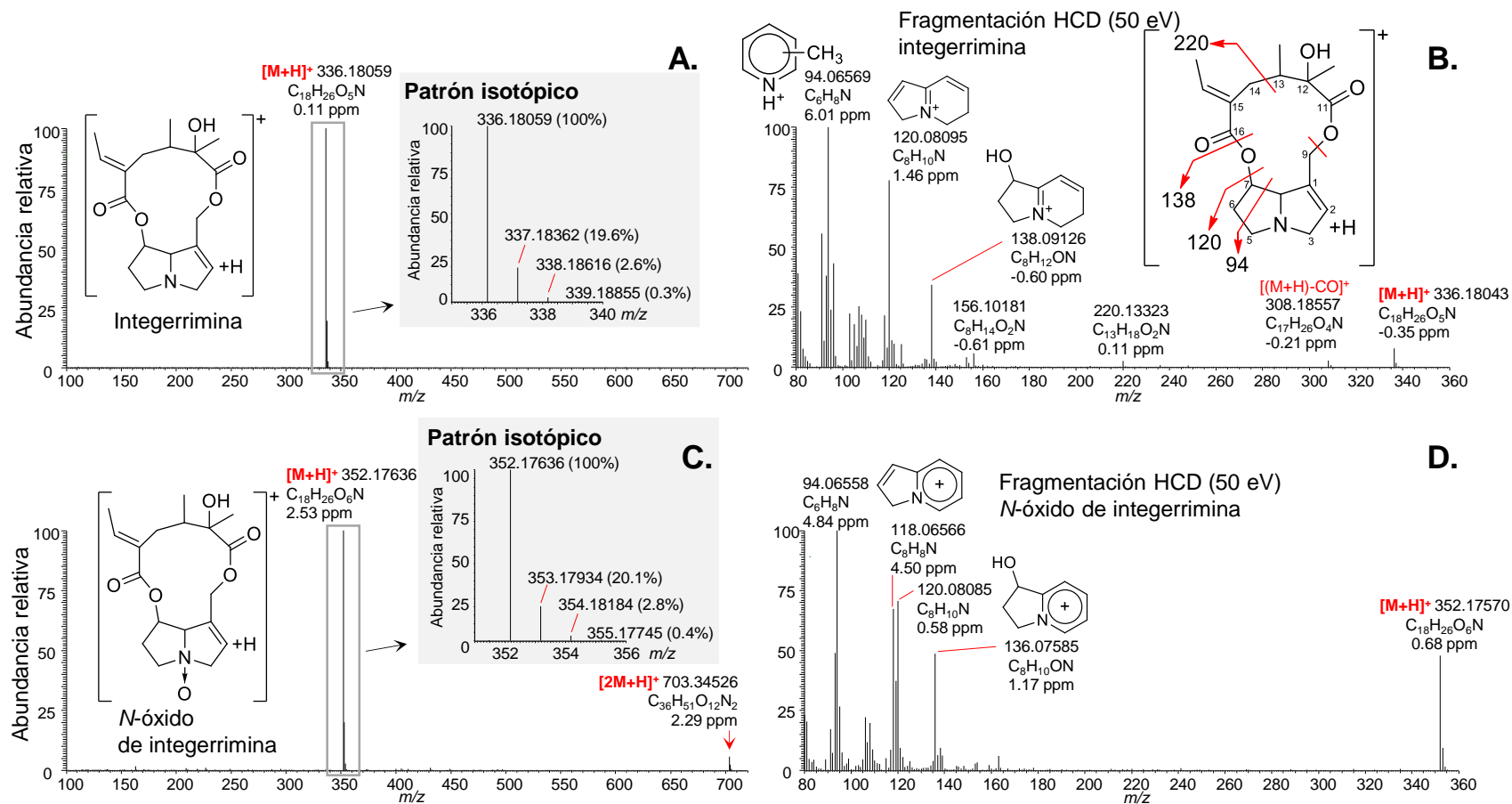
**Figura 22.** Patrón de fragmentación propuesto para un alcaloide pirrolizidínico **9-monoéster**, según los espectros de masas (ESI, HCD: 40 eV, *Orbitrap-MS*) de la heliotrina-d<sub>2</sub> (azul) y heliotrina (rojo).



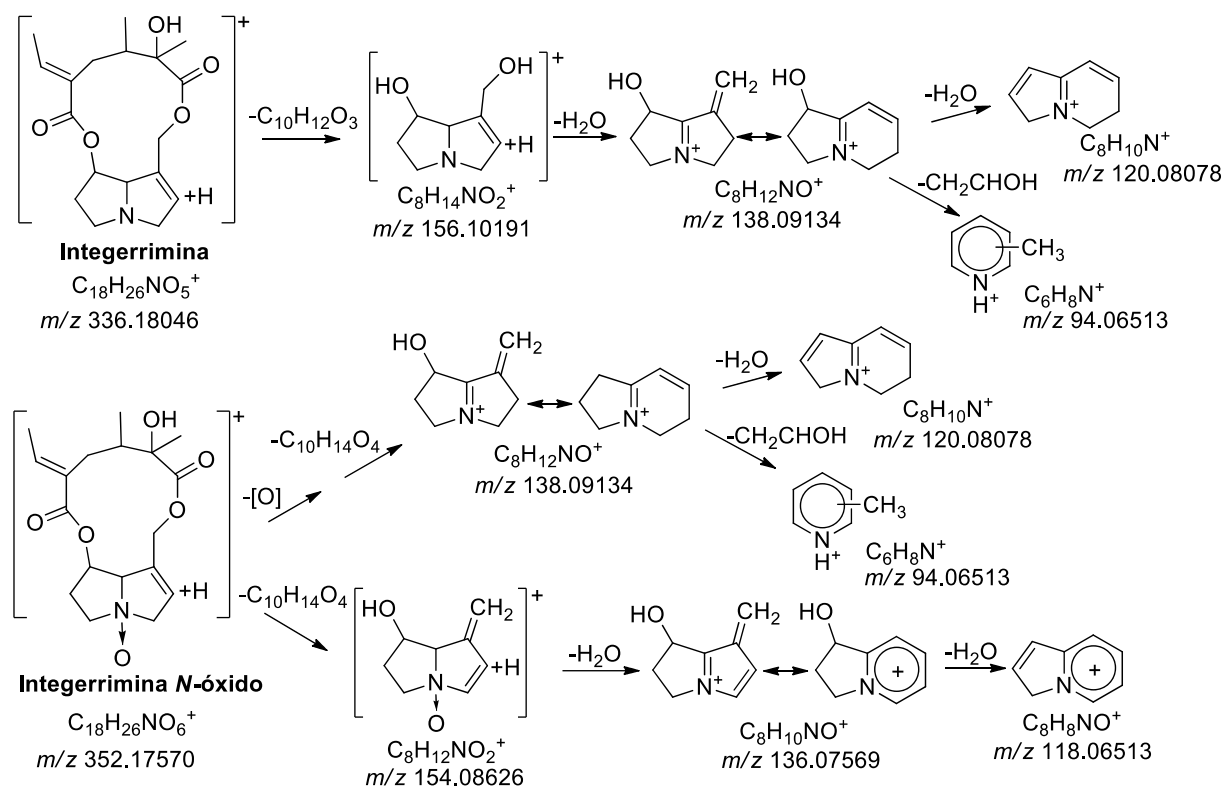
**Figura 23.** Patrón de fragmentación propuesto para un alcaloide pirrolizidínico **diéster cíclico**, según los espectros de masas (ESI, HCD: 40 eV, *Orbitrap-MS*) de la monocrotalina- $d_2$  (azul) y monocrotalina (rojo).



**Figura 24.** Espectros de masas de la integerrimina y del *N*-óxido de integerrimina. A. Integerrimina, MS adquirido en modo *full scan*. B. Fragmentación de la integerrimina. C. *N*-Óxido de integerrimina en modo *full scan* y D. Fragmentación del *N*-óxido de integerrimina.



**Figura 25.** Ruta de fragmentación y el origen de los iones-fragmento característicos propuestos para los espectros de masas de la integerrimina y su *N*-óxido. La ruta de fragmentación aplica para otros PA cíclicos tipo retronecina.

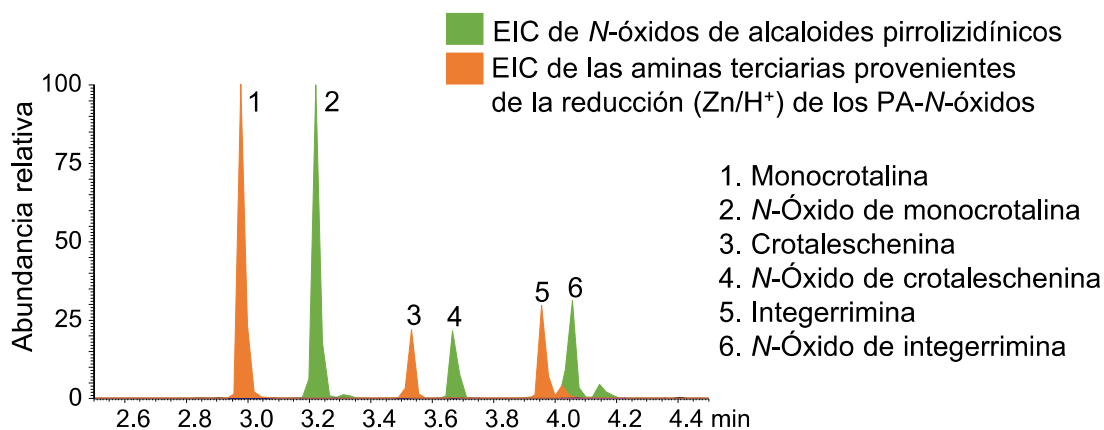


### 3.1.5 Patrones de fragmentación e identificación de alcaloides pirrolizidínicos por ESI(+)-MS (*Orbitrap*)

Los extractos obtenidos de varias partes de las especies de *Crotalaria* colectadas, que contenían los PA y sus *N*-óxidos, se analizaron por LC-MS (*Orbitrap*). Las masas exactas ( $\Delta ppm < 2$ ) de las especies protonadas  $[M+H]^+$  fueron las bases para elucidar sus fórmulas moleculares. El patrón isotópico del ion  $[M+H]^+$  fue similar al patrón calculado a partir de enviPat Web 2.4 (Loos y col., 2015); el ejemplo para la integerrimina se muestra en la **Figura**

**24.** Los patrones de fragmentación de las  $[M+H]^+$  se adquirieron a 20, 30, 40 o 50 eV en la celda HCD. La energía de la celda HCD se seleccionó de tal manera que los espectros de masas tuvieron tanto iones-fragmento, como iones  $[M+H]^+$ , con una intensidad relativa superior al 5%. La identificación de los *N*-óxidos con sus respectivos PA se realizó analizando las corrientes iónicas antes y después de la reducción del extracto con zinc (**Figura 26**). En los espectros ESI(+)-MS, adquiridos de los *N*-óxidos, en modo *full MS*, se registró un dímero molecular protonado  $[2M+H]^+$  con intensidad relativa entre el 1 y 35%, que no apareció en los ESI(+)-MS de sus respectivas bases libres (**Figura 24**) (Colegate y col., 2005; Crews y col., 2009; Ruan y col., 2012; Avula y col., 2015). La **Tabla 2** y el **Apéndice E** contienen las características cromatográficas y de espectrometría de masas de las bases libres y algunos de sus *N*-óxidos.

**Figura 26.** Corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  para los *N*-óxidos antes (verdes) y después de ser convertidos en sus respectivos PA (naranja). Los *N*-óxidos se extrajeron de hojas de *C. nitens* usando MSPD. Análisis LC-MS (*Orbitrap*).



En el espectro de masas del *N*-óxido de retronecina se registraron la molécula protonada  $C_8H_{14}NO_3^+$   $[M+H]^+$  en  $m/z$  172.09701 (100%), el fragmento  $C_6H_9NO^{+•}$  en  $m/z$  111.06800 (49%), que posiblemente se originó por la pérdida de  $O^•$  y un  $C_2H_5O^•$  con posterior eliminación de un radical  $OH^•$  para formar  $C_6H_8N^+$  en  $m/z$  94.06503 (25%). La pérdida de  $CH_3O^•$  del ion  $C_6H_9NO^{+•}$  resultó en la formación de  $C_5H_6N^+$  en  $m/z$  80.05016 (99%) (Véase el pico N° 4 en el **Apéndice E**). La pérdida de dos radicales se reportó previamente por Carnevale y col. (2019) en alcaloides aporfinas por análisis ESI(+)-MS. En los espectros de masas de macronecina, 7-hidroxi-1-metilen-8-pirrolizidina, laburnina, supinidina (Tufariello y Tette, 1975) y sus *N*-óxidos aparecieron fragmentos y pérdidas neutras similares a la retronecina o su *N*-óxido.

Los 9-monoésteres de tipo retronecina se identificaron con base en los fragmentos en  $m/z$  156.10191 ( $\Phi_1$ ) producido por la escisión de su enlace éster (**Figura 27**) y los fragmentos  $\Phi_2$ ,  $\Phi_3$  y  $\Phi_4$ , que son iones típicos de los PA tipo retronecina (Avula y col., 2015). Basados en el análisis de los espectros de masas se identificaron 9-senecioilretronecina, 9-tigloilretronecina y el 9-monoéster no identificado (Pico N ° 35, **Tabla 2, Apéndice E**) y los monoésteres presentes en *U. ornatrix*, creatonotina B, *N*-óxido de creatonotina A, *N*-óxido de creatonotina B, *N*-óxido de *iso*-creatonotina B y dos compuestos nuevos derivados del *N*-óxido de laburnina y el *N*-óxido de macronecina, ambos con un sustituyente tipo creatonotina B en la posición C(9) (**Figura 18**).

**Figura 27.** Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) encontrados en los espectros de masas de los 9-monoésteres tipo retronecina detectados en las especies de *Crotalaria* y en *U. ornatix* estudiados en este trabajo.

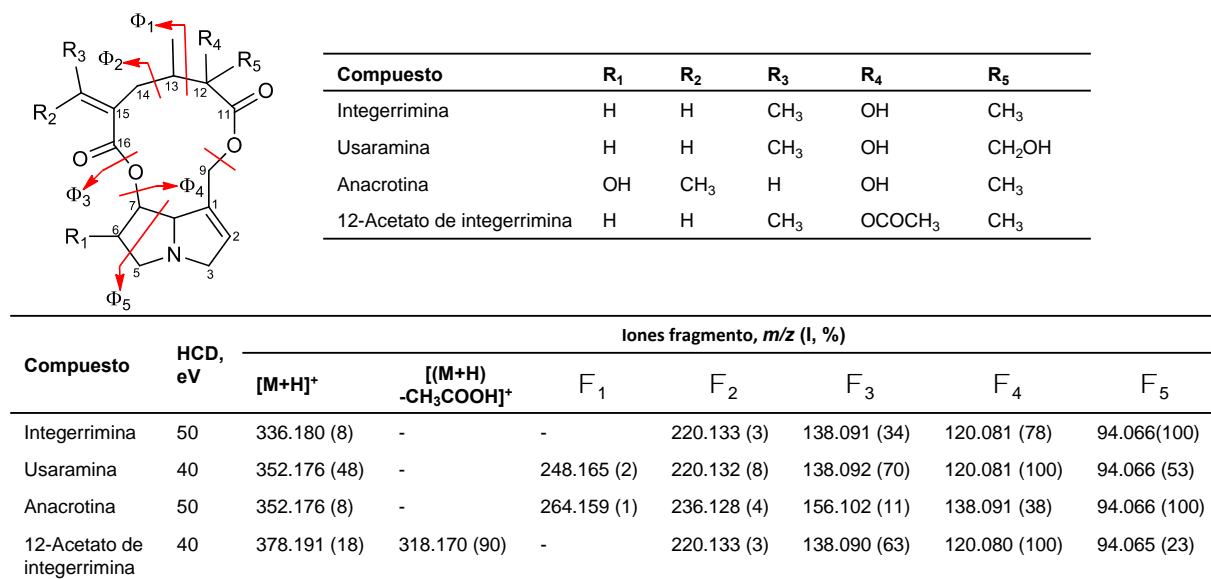
Compuesto	R
9-Senecioilretronecina	Senecioilo
9-Tigloilretronecina	Tigloilo
Creatonotina B	COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O
9-Monoester (35, <b>Tabla 3</b> )	COC <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub>

Compuesto	HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I, %)				
		[M+H] <sup>+</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
9-Senecioilretronecina	30	238.143 (5)	156.099 (1)	138.091 (5)	120.081 (15)	94.066 (100)
9-Tigloilretronecina	30	238.144 (5)	-	138.091 (11)	120.081 (22)	94.067 (100)
Creatonotina B	20	270.170 (100)	156.101 (18)	138.091 (43)	120.079 (21)	94.065 (85)
9-Monoester (35, <b>Tabla 3</b> )	20	354.192 (16)	156.103 (15)	138.092 (100)	120.081 (22)	94.066 (22)

El espectro de masas (HCD, 50 eV) de la integerrimina y sus homólogos (**Figura 28**) mostraron el fragmento  $\Phi_2$  en  $m/z$  220.13323 (3%) por la pérdida de C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> a partir de [M+H]<sup>+</sup> (**Figura 24**), este fragmento es típico de los diésteres cíclicos de 12 miembros. Excepto para la anacrotina que mostró un fragmento en  $m/z$  236.12844 por la adición del grupo –OH en el C(6). Los iones de fragmentos  $\Phi_3$ ,  $\Phi_4$  y  $\Phi_5$  fueron los mismo típicos de los PA tipo retronecina (These y col., 2013; Fang y col., 2014; Avula y col., 2015). El estudio de los fragmentos característicos permitió la identificación de integerrimina, usaramina y anacrotina. El 12-acetato de integerrimina se identificó por la presencia del fragmento  $m/z$  318.170 (90%) debido a la pérdida de ácido acético [(M+H)–CH<sub>3</sub>COOH]<sup>+</sup> del grupo acetato. El 12-acetato de integerrimina no se había reportado antes en literatura.

**Figura 28.** Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) encontrados en los espectros de masas de los diésteres cíclicos de 12 miembros tipo retronecina, detectados en las especies de *Crotalaria* estudiadas en este trabajo.

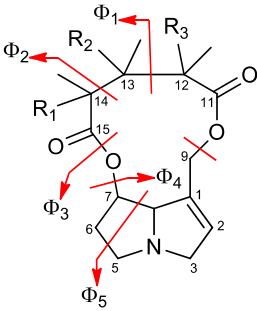


En los MS de los diésteres cíclicos de 11 miembros (**Figura 29**), como la monocrotalina, aparecen dos fragmentos característicos,  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$ , generados por las rupturas de los enlaces C(12)–C(13) y C(13)–C(14), respectivamente. Se observaron los mismos fragmentos  $\Phi_3$ ,  $\Phi_4$  y  $\Phi_5$  en los espectros de masas de los alcaloides tipo retronecina (Wuilloud y col., 2004; Colegate y col., 2005; Ruan y col., 2012; These y col., 2013; Fang y col., 2014; Avula y col., 2015; Schulz y col., 2015; Yoon y col., 2015; Nardin y col., 2016; Sixto y col., 2019). El estudio del patrón de fragmentación permitió la identificación de crotaleschenina, crispatina y 14–metil–monocrotalina (Culvenor y Smith, 1957). Se identificaron tentativamente 14–hidroximonocrotalina, 12–acetato de crotaleschenina y 12–acetato de monocrotalina, no reportados previamente en literatura. La 14–hidroximonocrotalina se identificó tentativamente por la presencia del fragmento  $\Phi_2$  C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> en m/z 210.11247

(34%), debido a la presencia de un grupo hidroxilo en C(14), mientras que el fragmento  $\Phi_2$   $C_{12}H_{18}NO_2^+$  en  $m/z$  208.13044 (33%) es debido al grupo metilo en la 14-metilmonocrotalina. El 12-acetato de crotaleschenina y 12-acetato de monocrotalina se fragmentaron con una pérdida característica de ácido acético  $[(M+H)-CH_3COOH]^+$ , por un reordenamiento de McLafferty, provocado por la presencia del grupo acetato. La crotaleschenina y la crispatina tienen la misma fórmula molecular y la misma masa exacta  $[M+H]^+$  en  $m/z$  310.16490, pero diferente localización del grupo  $-OH$  (**Figura 29**). La posición del  $-OH$  en la crispatina se corroboró en la posición C(13) por la aparición en su MS del fragmento  $\Phi_1$   $C_{13}H_{19}NO_3^{+*}$  en  $m/z$  237.13652 (12%), mientras que en el MS de la crotaleschenina se registró un fragmento  $\Phi_1$   $C_{13}H_{20}NO_2^+$  en  $m/z$  222.14914 (3%) debido a la presencia del grupo  $-OH$  en C(12) (Smith y col., 1988).

Finalmente, los ésteres de tipo platinecina como la retusina, el 9-monoéster (Pico N° 40, **Tabla 2** y **Apéndice E**) y los alcaloides ésteres derivados de la macronecina y laburnina (**Figura 18**, **Apéndice E**) biosintetizados por *U. ornatrix*, se identificaron por la presencia de los iones fragmento  $C_8H_{16}NO_2^+$  en  $m/z$  158.11756,  $C_8H_{14}NO^+$  en  $m/z$  140.10680,  $C_8H_{12}N^+$  en  $m/z$  122.09640 y  $C_6H_{10}N^+$  en  $m/z$  96.08017. Los patrones de fragmentación de los alcaloides tipo platinecina muestran dos hidrógenos adicionales en comparación con los ésteres de tipo retronecina, lo que demuestra la saturación del enlace doble 1,2 en la base retronecina (Ruan y col., 2012; Castells y col., 2014).

**Figura 29.** Fragmentos característicos y sus intensidades relativas (%) encontrados en los espectros de masas de los diésteres cíclicos de 11 miembros tipo retronecina detectados en las especies de *Crotalaria* estudiado en este trabajo.



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Crotaleschenina	H	H	OH
Crispatina	H	OH	H
Monocrotalina	H	OH	OH
14-Metil-monocrotalina	CH <sub>3</sub>	OH	OH
14-Hidroxi-monocrotalina	OH	OH	OH
12-Acetato de crotaleschenina	H	H	OCOCH <sub>3</sub>
12-Acetato de monocrotalina	H	OH	OCOCH <sub>3</sub>

Compuesto	HCD, eV	Iones fragmento, m/z (I, %)						
		[M+H] <sup>+</sup>	[(M+H)-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
Crotaleschenina	40	310.165 (40)	-	222.149 (3)	194.118 (1)	138.091 (60)	120.081 (86)	94.066 (100)
Crispatina	30	310.165 (89)	-	237.137 (12)	194.118 (9)	138.091 (25)	120.081 (100)	94.065 (36)
Monocrotalina	40	326.160 (10)	-	237.136 (5)	194.118 (18)	138.091 (18)	120.081 (100)	94.066 (39)
14-Metil-monocrotalina	40	340.176 (7)	-	252.159 (2)	208.130 (33)	138.091 (17)	120.081 (100)	94.066 (57)
14-Hidroxi-monocrotalina	30	342.155 (100)	-	253.131 (8)	210.112 (34)	138.090 (11)	120.081 (50)	94.066 (16)
12-Acetato de crotaleschenina	40	352.175 (19)	292.154 (100)	222.149 (1)	194.118 (1)	138.091 (48)	120.081 (59)	94.066 (42)
12-Acetato de monocrotalina	30	368.170 (100)	308.149 (24)	237.135 (30)	194.117 (19)	138.091 (5)	120.080 (79)	94.066 (12)

### 3.1.6 Repetibilidad en las áreas cromatográficas, método de extracción y reproducibilidad entre especímenes

Se evaluó la repetibilidad de las áreas de las corrientes iónicas extraídas de los materiales de referencia que se pudieron conseguir comercialmente, monocrotalina y retrorsina (**Tabla 4**). Las inyecciones de las soluciones se realizaron por triplicado por LC-MS bajo las condiciones obtenidas de la maximización de las corrientes iónicas de [M+H]<sup>+</sup>.

**Tabla 4.** Repetibilidad de las áreas corrientes iónicas extraídas de los  $[M+H]^+$  de los materiales de referencia monocrotalina (28 ng/mL) y retrorsina (27 ng/mL), analizados por LC-MS (*Orbitrap*).

Alcaloide pirrolizidínico	$[M+H]^+$	Área corriente iónica extraída			Promedio	s	CV, %
		x 10 <sup>6</sup> , (n = 3)					
Monocrotalina	326,15981	19,2	18,6	19,6	19,1	0,48	2,5
Retrorsina	352,17546	9,5	9,7	9,5	9,6	0,15	1,5

Se realizaron ensayos para determinar la variación de la extracción de los PA de hojas frescas de *C. nitens* usando el método MSPD. Se tomaron varias hojas y se homogeneizaron, usando nitrógeno líquido, se extrajeron los PA por MSPD con gel de sílice-C<sub>18</sub> como agente dispersante y metanol con FA 2% como solvente de extracción (**Tabla 5**). El coeficiente de variación estuvo entre 4,7% y 15,2% para los compuestos individuales.

**Tabla 5.** Repetibilidad del método MSPD para la extracción de los PA de las hojas frescas de *C. nitens* Análisis por LC-MS (*Orbitrap*).

Alcaloide pirrolizidínico	$[M+H]^+$	Contenido de PA, µg/g (n = 6)			Promedio	s	CV, %
Crotaleschenina	310,16490	5,3	3,4	4,9	4,6	0,65	14,1
		4,7	4,7	4,8			
N-Óxido de crotaleschenina	326,15981	25,1	20,9	25,0	24	1,6	6,5
		24,0	24,6	24,3			
Integerrimina	336,18055	9,0	6,7	8,3	9	1,2	13,6
		9,8	8,5	9,8			
N-Óxido de integerrimina	352,17546	31,3	24,9	29,2	30	2,9	9,6
		32,8	29,2	32,3			
Monocrotalina	326,15981	48,6	30,4	46,8	42	6,3	15,2
		41,0	42,0	41,9			
N-Óxido de monocrotalina	342,15473	154,4	158,6	149,5	151	7,0	4,7
		138,1	153,7	149,9			
PA totales		273,7	272,8	258,6	260	18,2	7,0
		224,4	265,9	263,1			

La variación entre especímenes se realizó muestreando la hoja N° 5 de diez plantas de *C. nitens* de ocho semanas de edad cultivadas en parcelas experimentales de CENIVAM. Se extrajeron los PA por MSPD de cada hoja, los valores de contenido de los alcaloides en las hojas se presentan en la **Tabla 6**. El coeficiente de variación para cada uno de los alcaloides estuvo entre el 41% y 59%, mientras que para su contenido total por planta fue del 44%.

**Tabla 6.** Variación (reproducibilidad) del contenido de los PA en las hojas frescas de diferentes plantas de *C. nitens*, cultivadas en parcelas experimentales de CENIVAM. Extracción por MSPD y análisis por LC-MS.

Alcaloide pirrolizidínico	[M+H] <sup>+</sup>	Contenido de PA, µg/g (n = 10)					Promedio	s	CV, %
Crotaleschenina	310,16490	19,6	9,2	4,1	7,8	4,3	8	4,9	59
		2,3	12,5	8,1	7,2	8,8			
N-Óxido de crotaleschenina	326,15981	24,6	39,4	53,9	29,6	14,2	30	14,8	50
		18,1	52,6	17,2	33,8	15,5			
Integerrimina	336,18055	25,2	17,9	16,5	21,8	8,2	14	7,9	58
		3,6	7,5	4,3	21,7	10,4			
N-Óxido de integerrimina	352,17546	24,6	34,7	35,5	54,2	18,6	33	13,6	41
		25,0	23,1	59,4	24,4	34,8			
Monocrotalina	326,15981	27,2	14,2	3,8	30,5	15,2	17	9,8	56
		5,3	31,0	17,2	9,7	19,2			
N-Óxido de monocrotalina	342,15473	65,5	115,2	94,0	206,5	136,4	136	73,6	54
		92,4	314,4	90,2	139,7	109,0			
PA totales		186,7	230,5	207,8	350,5	159,3	240	104,6	44
		188,9	491,7	164,6	235,6	175,3			

### 3.1.7 Composición de alcaloides pirrolizidínicos en las especies de *Crotalaria* colectadas

El contenido de cada PA se determinó por LC–MS usando el factor de respuesta de la monocrotalina. Los resultados se expresaron en equivalentes de la monocrotalina como se ha reportado en otros trabajos (Vacillotto y col., 2013; Zhu y col., 2016; Sixto y col., 2019), por la ausencia de materiales de referencia. Las áreas cromatográficas de los PA se obtuvieron extrayendo la corriente iónica de la masa exacta del  $[M+H]^+$  de cada alcaloide (Avula y col., 2015). Las ecuaciones lineales de las curvas de calibración (11–550 ng/mL) de la monocrotalina tenían un  $r^2 > 0,99$ . El límite de detección (0,05 ng/mL) se determinó con diluciones sucesivas de una solución de la monocrotalina, este valor estuvo por debajo del reportado por Avula y col. (2015) para la monocrotalina (0.1 ng/mL) pero similar al de los otros PA analizadas en el mismo trabajo por ESI–qTOF–MS (Avula y col., 2015). La **Tabla 7** muestra el contenido total de los PA (mg/g) y de los compuestos individuales encontrados en las raíces, hojas, flores y semillas de *C. retusa*, *C. spectabilis*, *C. pallida*, *C. incana*, *C. maypurensis* y *C. nitens*. Las raíces presentaron alcaloides no esterificados, monoesterificados y cíclicos, mientras que las semillas contenían principalmente los alcaloides cíclicos tipo retronecina de 11 miembros para *C. retusa*, *C. spectabilis* y los de 12 miembros para *C. incana*, *C. pallida* y *C. maypurensis*. *C. nitens* presentó una mezcla de monocrotalina y crotaleschenina, los PA cíclicos de 11 miembros (Pilbeam y col., 1983), e integerrimina de 12 miembros (**Figura 17**).

Las semillas de *C. retusa* y *C. spectabilis* tenían monocrotalina, reportada previamente en semillas de especies de *Crotalaria* en Australia (Fletcher y col., 2009), Etiopía (Asres y col., 2004) o Brasil (Flores y col., 2009). Se encontraron pequeñas cantidades de 14–metil–monocrotalina que se habían reportado en *C. fascicularis* (Asres y col., 2004) y *C. aegyptiaca*

(Flores y col., 2009), mientras que la crotaleschenina y la crispatina se habían registrado en *C. leschenaultii* (Smith y col., 1988) y la retusina en *C. retusa* (Culvenor y Smith, 1957). La macronecina, laburnina, 7-, 9-senecioilretronecina y el PA 9-monoéster no identificado (tipo platinecina) se encontraron por primera vez en las raíces de *C. retusa*, *C. spectabilis* y *C. nitens* del presente trabajo. Las especies de *C. pallida* y *C. incana* contenían principalmente integerrimina y usaramina (Asres y col., 2004; Flores y col., 2009; Fletcher y col., 2009). También, se detectó la anacrotina en *C. incana* (Asres y col., 2004). Los PA macronecina, laburnina y dihidropirrolizina y 9-senecioilretronecina estuvieron presentes en *C. pallida*, mientras que en *C. incana* tenía 9-senecioilretronecina, 9-tigloilretronecina, retronecina, 7-hidroxi-1-metilen-8-pirrolizidina y el 9-monoéster no identificado (Pico N° 35, **Tabla 2**).

Las plantas de *C. maypurensis* recolectadas en dos sitios diferentes tuvieron diversos perfiles de los PA. Las semillas de *C. maypurensis*, identificada con el *voucher* COL586229 tenían principalmente 7-hidroxi-1-metilen-8-pirrolizidina (Flores y col., 2009; Culvenor y col., 1968) y el alcaloide supinidina, mientras que sus flores contenían exclusivamente el *N*-óxido de 7-hidroxi-1-metilen-8-pirrolizidina. El 7-hidroxi-1-metilen-8-pirrolizidina y la supinidina son isómeros estructurales de la fórmula  $C_8H_{13}NO$ , pero sus espectros de masas fueron diferentes (Véanse los picos N° 5 y N° 8 del **Apéndice E**). En contraste, *C. maypurensis*, identificada con el *voucher* COL582805 contenía principalmente integerrimina y usaramina (Culvenor y col., 1968), así como macronecina y laburnina, pero no la 7-hidroxi-1-metilen-8-pirrolizidina.

**Tabla 7.** Contenido de alcaloides pirrolizidínicos (mg/g) en equivalentes de monocrotalina, presentes en raíces, hojas, flores, y semillas de las especies de *Crotalaria* colectadas en el presente trabajo.

PA, contenido promedio, mg/g (min-max)		<i>C. retusa</i>	<i>C. spectabilis</i>	<i>C. pallida</i>	<i>C. incana</i>	<i>C. maypurensis</i>	<i>C. nitens</i>
<sup>a</sup> Raíces		2 (0.1-3)	4 (0.7-9)	2 (0.5-5)	1 (0.4-3)	1 (0.3-3)	2 (0.5-3)
<sup>b</sup> Hojas		4 (1-8)	3 (1-4)	0.3 (0.05-2)	0.2 (0.02-0.3)	0.05 (N.D.-0.3)	0.5 (0.1-1)
<sup>c</sup> Flores		16 (13-21)	13 (9-17)	0.2 (0.06-0.3)	2 (2-3)	0.1 (0.02-0.2)	2 (1-3)
<sup>d</sup> Semillas		21 (19-23)	15 (5-21)	2 (0.7-6)	3 (2-4)	2 (1-4)	6 (4-11)
<b>N°</b>	<b>PA en cada parte de la planta, mg/g</b>						
<b>Fig. 29</b>							
1	Retronecina	0.05 <sup>a</sup> , 0.08 <sup>d</sup>	0.08 <sup>a</sup>	—	0.02 <sup>a</sup> , 0.4 <sup>d</sup>	—	—
2	Dihidropirrolizina, N.I.	0.1 <sup>c</sup> , 0.1 <sup>d</sup>	0.2 <sup>c</sup>	0.1 <sup>b</sup> , 0.2 <sup>c</sup> , 0.05 <sup>d</sup>	0.2 <sup>b</sup> , 0.3 <sup>c</sup>	0.008 <sup>b</sup> , 0.09 <sup>c</sup>	—
3	Macronecina isómero	0.06 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup> , 0.1 <sup>d</sup>	0.06 <sup>a</sup> , 0.06 <sup>c</sup> , 0.3 <sup>d</sup>	0.1 <sup>a</sup> , 0.2 <sup>d</sup>	0.1 <sup>a</sup>
4	<i>N</i> -Óxido de retronecina	0.03 <sup>a</sup> , 0.03 <sup>c</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.009 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup> , 0.04 <sup>c</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>
5	7-Hidroxi-1-metilene-8-pirrolizidina	—	—	—	0.02 <sup>d</sup>	0.4 <sup>d,*</sup>	—
6	<i>N</i> -Óxido de macronecina isómero	0.1 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup> , 0.01 <sup>c</sup>	0.07 <sup>d</sup>	0.06 <sup>a</sup>
7	Laburnina isómero	0.05 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup> , 0.2 <sup>b</sup> , 0.03 <sup>c</sup> , 1 <sup>d</sup>	0.2 <sup>a</sup> , 2 <sup>c</sup> , 0.4 <sup>d</sup>	0.4 <sup>a</sup> , 0.05 <sup>b</sup> , 0.03 <sup>c</sup> , 1 <sup>d</sup>	0.03 <sup>a</sup>
8	Supinidina isómero	—	—	—	—	0.6 <sup>d,*</sup>	—
9	<i>N</i> -Óxido de 7-Hidroxi-1-metilene-8-pirrolizidina	—	—	—	0.006 <sup>a</sup> , 0.04 <sup>c</sup>	3 <sup>c,*</sup>	—
10	14-Hidroxi-monocrotalina isómero	0.008 <sup>d</sup>	0.01 <sup>d</sup>	—	—	—	—
12	Monocrotalina	0.4 <sup>a</sup> , 0.1 <sup>b</sup> , 0.5 <sup>c</sup> , 20 <sup>d</sup>	0.7 <sup>a</sup> , 0.1 <sup>b</sup> , 0.6 <sup>c</sup> , 15 <sup>d</sup>	—	—	0.005 <sup>d</sup>	0.3 <sup>a</sup> , 0.08 <sup>b</sup> , 0.05 <sup>c</sup> , 4 <sup>d</sup>

**Tabla 7.** Continuación.

15	<i>N</i> -Óxido de monocrotalina	0.9 <sup>a</sup> , 4 <sup>b</sup> , 14 <sup>c</sup> , 0.5 <sup>d</sup>	1.5 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 12 <sup>c</sup> , 0.02 <sup>d</sup>	–	–	–	0.8 <sup>a</sup> , 0.3 <sup>b</sup> , 1 <sup>c</sup> , 0.05 <sup>d</sup>
16	Anacrotina isómero	–	–	–	0.01 <sup>c</sup> , 0.09 <sup>d</sup>	–	–
17	<i>N</i> -Óxido de anacrotina isómero	–	–	–	0.04 <sup>c</sup>	–	–
19	14-Metil-monocrotalina isómero	0.09 <sup>d</sup>	0.06 <sup>d</sup>	–	–	–	–
20	Retusina	0.02 <sup>c</sup> , 0.4 <sup>d</sup>	–	–	–	–	–
22	12-Acetato de monocrotalina isómero	0.05 <sup>d</sup>	–	–	–	–	0.02 <sup>d</sup>
23	PA tipo retronecina, N.I.	–	0.003 <sup>d</sup>	–	–	–	0.2 <sup>d</sup>
24	<i>N</i> -Óxido de 14-metil- monocrotalina isómero	0.009 <sup>b</sup> , 0.1 <sup>c</sup>	0.005 <sup>b</sup> , 0.09 <sup>c</sup>	–	–	–	–
25	Usaramina	–	–	0.9 <sup>d</sup>	0.2 <sup>d</sup>	0.007 <sup>a</sup> , 0.9 <sup>d</sup>	–
27	<i>N</i> -Óxido del 12-acetato de monocrotalina isómero	0.04 <sup>a</sup> , 0.06 <sup>b</sup> , 0.1 <sup>c</sup>	–	–	–	–	0.01 <sup>b</sup> , 0.03 <sup>c</sup>
28	PA- <i>N</i> -óxido tipo retronecina, N.I.	–	–	0.1 <sup>a</sup>	–	–	–
29	7-Senecioilretronecina	–	–	–	–	–	0.002 <sup>a</sup>
30	<i>N</i> -Óxido de usaramina	–	–	0.3 <sup>a</sup> 0.007 <sup>d</sup>	0.02 <sup>a</sup> , 0.005 <sup>d</sup>	0.03 <sup>c</sup> , 0.1 <sup>a</sup> , 0.004 <sup>d</sup>	–
31	<i>N</i> -Óxido de 7- senecioilretronecina	–	–	–	–	–	0.005 <sup>a</sup>
32	Crotaleschenina	0.1 <sup>d</sup>	0.006 <sup>d</sup>	–	–	–	0.03 <sup>a</sup> , 0.02 <sup>b</sup> , 0.004 <sup>c</sup> , 1 <sup>d</sup>
33	<i>N</i> -Óxido de retusina	0.02 <sup>a</sup> , 0.05 <sup>b</sup> , 0.4 <sup>c</sup> , 0.006 <sup>d</sup>	0.05 <sup>c</sup>	–	–	–	0.01 <sup>a</sup>

**Tabla 7.** Continuación.

34	<i>N</i> -Óxido de crotaleschenina	0.01 <sup>a</sup> , 0.008 <sup>b</sup> , 0.03 <sup>c</sup>	0.02 <sup>a</sup> , 0.02 <sup>c</sup>	–	–	–	0.1 <sup>a</sup> , 0.07 <sup>b</sup> , 0.3 <sup>c</sup> , 0.01 <sup>d</sup>
35	PA 9–monoéster tipo retronecina, N.I.	–	–	–	0.005 <sup>d</sup>	–	–
36	9–Tigloilretronecina isómero	–	–	–	0.01 <sup>a</sup> , 0.06 <sup>d</sup>	–	–
37	Crispatina isómero	0.01 <sup>d</sup>	0.006 <sup>d</sup>	–	–	–	–
38	9–Senecioilretronecina	0.01 <sup>a</sup>	0.008 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.009 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>
39	PA– <i>N</i> -óxido 9–monoéster tipo retronecina, N.I.	–	–	0.09 <sup>a</sup>	–	0.02 <sup>a</sup>	–
40	PA 9–monoéster tipo platinecina, N.I.	–	–	–	–	0.03 <sup>a</sup>	0.009 <sup>a</sup>
42	<i>N</i> -Óxido de 9– tigloilretronecina	–	–	–	0.1 <sup>a</sup>	–	–
43	<i>N</i> -Óxido de crispatina isómero	0.01 <sup>c</sup>	0.1 <sup>a</sup> , 0.01 <sup>b</sup> , 0.03 <sup>c</sup>	–	–	–	0.04 <sup>a</sup>
44	PA tipo retronecina, N.I.	0.005 <sup>d</sup>	0.03 <sup>d</sup>	–	–	–	–
45	<i>N</i> -Óxido de 9– senecioilretronecina	0.1 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>
46	Integerrimina	–	–	0.03 <sup>a</sup> 0.02 <sup>d</sup>	0.07 <sup>a</sup> , 0.1 <sup>c</sup> , 2 <sup>d</sup>	0.2 <sup>d</sup>	0.02 <sup>a</sup> , 0.01 <sup>b</sup> , 0.01 <sup>c</sup> , 0.9 <sup>d</sup>
47	<i>N</i> -Óxido de integerrimina	–	–	0.2 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup> , 0.08 <sup>c</sup> , 0.02 <sup>d</sup>	0.04 <sup>a</sup> , 0.002 <sup>d</sup>	0.09 <sup>a</sup> , 0.04 <sup>b</sup> , 0.3 <sup>c</sup> , 0.01 <sup>d</sup>
48	PA– <i>N</i> -óxido 9–monoéster tipo platinecina, N.I.	–	–	–	–	0.04 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>
49	Dihidro–integerrimina isómero	–	–	–	0.2 <sup>d</sup>	–	–
50	<i>N</i> -Óxido de dihidro– integerrimina isómero	–	–	0.08 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup> , 0.02 <sup>d</sup>	0.03 <sup>a</sup>	–

**Tabla 7.** Continuación.

51	12-Acetato de crotaleschenina isómero	0.005 <sup>d</sup>	–	–	–	–	0.03 <sup>d</sup>
52	12-Acetato de integerrimina isómero	–	–	–	–	–	0.03 <sup>d</sup>
Proporción de PA/PA- <i>N</i> -óxidos, % (ésteres tipo retronecina y platinecina)		26 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 3 <sup>c</sup> , 98 <sup>d</sup>	32 <sup>a</sup> , 4 <sup>b</sup> , 5 <sup>c</sup> , 100 <sup>d</sup>	7 <sup>a</sup> , 99 <sup>d</sup>	19 <sup>a</sup> , 51 <sup>c</sup> , 98 <sup>d</sup>	9 <sup>a</sup> , 99 <sup>d</sup>	19 <sup>a</sup> , 29 <sup>b</sup> , 4 <sup>c</sup> , 99 <sup>d</sup>

N.D., No detectado.

\*Los perfiles de los PA en las flores y semillas de *C. maypurensis* (voucher COL586229) fueron diferentes a los encontrados para otras plantas *C. maypurensis* colectadas.

### 3.1.8 Composición de ácidos grasos y alcaloides pirrolizidínicos en aceites vegetales de semillas de *Crotalaria*.

Las semillas oleaginosas producen aceites vegetales con una variedad de aplicaciones alimenticias y también industriales, tales como, tensioactivos, emulsionantes, detergentes, lubricantes, cosméticos, oleoquímicos y combustibles. Se investigó el contenido de aceite, la composición de ácidos grasos en las semillas de las especies de *Crotalaria* y se evaluó si en el proceso de extracción, los aceites vegetales se contaminaban con los respectivos PA presentes en las semillas. La cantidad de aceite de las semillas de *C. retusa*, *C. pallida*, *C. spectabilis*, *C. incana*, *C. maypurensis* y *C. nitens* y su composición de ácidos grasos se presentan en la **Tabla 8**. Los valores estuvieron similares a los reportados para otras especies de *Crotalaria* (Chowdhury y Banerji, 1995; Hosamani y Ramesh, 2001; Mazlan y Said, 2011; Kathirvel y Kumudha, 2012; Górnas y col., 2019). El rango de humedad estuvo entre 10.7–12.7%, superior al reportado por Kathirvel y Kumudha (Kathirvel y Kumudha, 2012) para *C. semperflorens*, *C. clarkei*, *C. paniculata*, *C. fysonii* y *C. walkeri* (7.5–8.8%). Por el contrario, el contenido de aceite en las semillas estudiadas en este trabajo fue mayor (1.4–3.6% p/p), que el reportado por los mismos autores (0.8–1.7%) (Kathirvel y Kumudha, 2012), pero similar al contenido de aceite en semillas de *C. laburnifolia* (3.5%), *C. medicaginea* (2.4%), *C. juncea* (5.3%) (Chowdhury y Banerji, 1995), *C. cleomifolia* (5.3%) (Mazlan y Said, 2011), *C. juncea* (4.3%) o *C. albida* (3,0%) (Górnas y col., 2019).

Se encontraron 18 ácidos grasos en los aceites de las semillas. Los perfiles de ácidos grasos fueron muy similares para las seis especies (**Tabla 8**). Los ácidos grasos más abundantes fueron el linoleico C18: 2 (47.6–55.3%), palmítico C16: 0 (14.9–20.2%), oleico C18: 1 (8.0–13.8%), esteárico C18: 0 (4.3–7.8%) y linolénico C18: 3 (3.3–8.0%).

**Tabla 8.** Contenido de aceite en semillas y composición de ácidos grasos y alcaloides pirrolizidínicos en los aceites vegetales de las especies de *Crotalaria* colectadas en este trabajo.

Parámetros	<i>C. retusa</i>	<i>C. spectabilis</i>	<i>C. pallida</i>	<i>C. incana</i>	<i>C. maypurensis</i>	<i>C. nitens</i>
Humedad, %	12.7 ± 0.46	11.3 ± 0.16	12.06 ± 0.062	11.29 ± 0.031	10.70 ± 0.048	11.6 ± 0.18
Aceite (peso seco p/p), %	3.36 ± 0.063	1.41 ± 0.027	1.91 ± 0.024	2.3 ± 0.13	2.13 ± 0.013	3.57 ± 0.034
Ácidos grasos (área GC, %)						
Mirístico C14:0	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Palmítico C16:0	20.2 ± 0.50	16.9 ± 0.11	19.8 ± 0.43	19.9 ± 0.37	14.9 ± 0.25	19.2 ± 0.24
Esteárico C18:0	7.8 ± 0.38	5.14 ± 0.02	4.32 ± 0.04	4.65 ± 0.10	5.14 ± 0.02	5.69 ± 0.06
Oleico C18:1	13.8 ± 0.10	10.7 ± 0.17	8.0 ± 0.12	8.9 ± 0.15	12.5 ± 0.10	10.3 ± 0.12
Linoleico C18:2	47.6 ± 0.27	55.3 ± 0.13	52.5 ± 0.70	49.4 ± 0.58	48.3 ± 0.24	50.4 ± 0.26
Linolénico C18:3	3.33 ± 0.04	3.92 ± 0.03	3.8 ± 0.15	8.0 ± 0.28	5.38 ± 0.05	6.51 ± 0.02
Araquídico C20:0	1.70 ± 0.05	1.61 ± 0.01	1.50 ± 0.03	1.36 ± 0.05	2.26 ± 0.02	1.63 ± 0.02
Eicosenoico C20:1	0.30 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Behénico C22:0	1.13 ± 0.03	1.49 ± 0.01	3.75 ± 0.07	2.17 ± 0.11	3.35 ± 0.06	1.21 ± 0.01
Tricosanoico C23:0	0.24 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Lignocérico C24:0	0.74 ± 0.05	0.6 ± 0.04	1.80 ± 0.03	0.93 ± 0.06	1.88 ± 0.05	0.97 ± 0.05
SFA	33.0 ± 0.61	27.0 ± 0.11	32.4 ± 0.51	30.0 ± 0.57	28.8 ± 0.17	29.5 ± 0.14
MUFA	14.29 ± 0.09	11.34 ± 0.07	8.6 ± 0.15	9.7 ± 0.14	13.46 ± 0.08	10.8 ± 0.10
PUFA	51.0 ± 0.34	59.3 ± 0.16	56.4 ± 0.84	57.6 ± 0.85	53.7 ± 0.28	56.9 ± 0.10
PA en los aceites, mg/g <sup>a</sup>	5.0 ± 0.44	11.9 ± 0.72	1.5 ± 0.10	15.5 ± 0.62	2.1 ± 0.10	27.6 ± 0.94

SFA–suma de ácidos grasos saturados, MUFA–suma de ácidos grasos mono–insaturados, PUFA–suma de ácidos grasos poli–insaturados. <sup>a</sup>Contenido de los PA como equivalentes de monocrotalina. Los valores son el promedio ± desviación estándar ( $n = 3$ ).

La composición de ácidos grasos fue similar a la de otros taxones de la familia Fabaceae, en los cuales el ácido linoleico era el componente mayoritario (Hosamani y Ramesh, 2001; Górnas y col., 2019). La composición de ácidos grasos de los aceites de otras especies de *Crotalaria* spp. (*C. retusa*, *C. pallida*, *C. juncea*, *C. albida*, *C. laburnifolia*, *C. medicaginea*, *C. alata*, *C. cleomifolia*, *C. semperflorens*, *C. clarkei*, *C. paniculata*, *C. fysonii*, y *C. walker*) se presenta en el **Apéndice F**. No se encontraron reportes previos, que describieran la composición de ácidos grasos de los aceites de semillas de *C. spectabilis*, *C. incana*, *C. maypurensis* y *C. nitens*. Los ácidos grasos se agruparon, según el grado de insaturación, los ácidos grasos saturados (SFA) estaban representados por palmítico y esteárico (27.0–33.0%), los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) contenían ácido oleico (8.6–14.3%) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) fueron los más abundantes en los aceites (51.0–59.3%). La variación en los valores de rendimiento de aceite y composición de ácidos grasos dentro de la misma especie podría deberse a diferentes antecedentes genéticos de las plantas y diferentes condiciones ambientales, como la temperatura, la luz y la precipitación (Barbosa y col., 2014).

El análisis de los PA en los aceites de las semillas reveló que, durante el proceso de extracción con hexano, algunos PA se co-extrajeran con los aceites; las cantidades de los PA en los aceites variaron de 1,5 mg/g a 27,6 mg/g de aceite (**Tabla 8**). La información detallada sobre el contenido y tipo de PA en los aceites de las semillas de las especies de *Crotalaria* bajo estudio se encuentran en el **Apéndice G**. Los principales alcaloides detectados en los aceites de *C. retusa* y *C. spectabilis* fueron monocrotalina y la usamina e integerrimina para los aceites de *C. pallida* y *C. incana*. Se encontró una mezcla de monocrotalina, usamina e integerrimina en el aceite de *C. maypurensis*, y monocrotalina, crotaleschenina e integerrimina

en el aceite de *C. nitens*. Los PA no esterificados no se detectaron en los aceites de las semillas, no fueron extraídos por el hexano debido a la mayor polaridad de estos PA en comparación con los alcaloides esterificados de tipo retronecina.

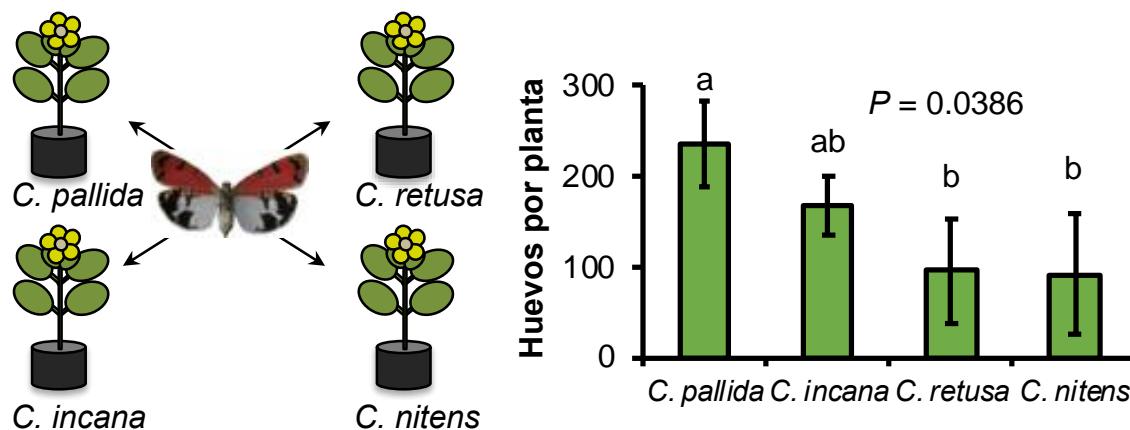
### **3.2 Acumulación y transformación de alcaloides pirrolizidínicos en *U. ornatix* alimentadas con hojas o semillas de algunas especies de *Crotalaria*.**

En esta sección, la primera pregunta que se respondió fue si las polillas preferían ovipositar en especies de *Crotalaria* con diferente diversidad y contenido de alcaloides en las hojas o semillas. Se usaron cuatro especies de *Crotalaria* a saber, *C. nitens* y *C. retusa* con mayor contenido de PA en hojas o semillas y alcaloides tipo monocrotalina, mientras que *C. pallida* y *C. incana* tienen menos alcaloides y sus estructuras eran de tipo integerrimina. Las orugas resultantes se alimentaron con hojas o semillas de las cuatro especies y se midieron sus pesos antes de pasar a crisálidas. En la segunda parte se respondió si la variación de alcaloides en las plantas generaba variación en los alcaloides transformados por *U. ornatix*. Para su evaluación se determinó la composición de alcaloides pirrolizidínicos en el alimento suministrado y, luego, en las orugas, las polillas, sus huevos y la espuma que se segregan del tórax.

#### **3.2.1 Preferencia de oviposición de adultos *U. ornatix* en hojas de *C. nitens*, *C. retusa*, *C. pallida* y *C. incana***

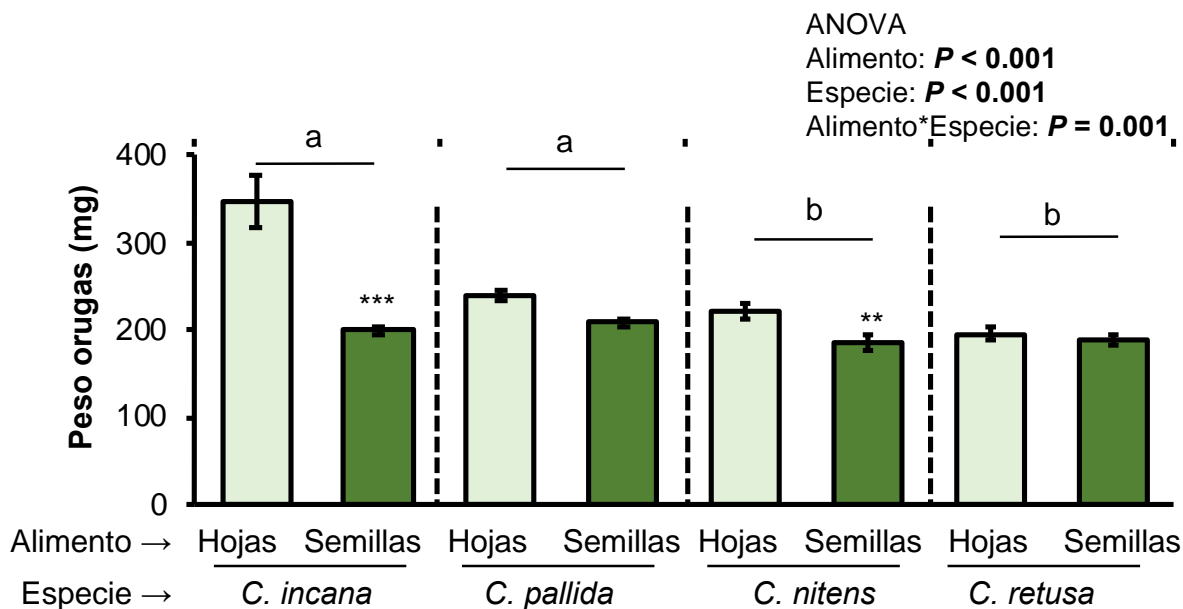
Los adultos de *U. ornatix* liberados en las cajas tuvieron una preferencia para poner huevos en hojas de *C. pallida* ( $F_{3,21} = 3,34$ ;  $P = 0,0386$ ), luego, en *C. incana* y por último en hojas de *C. retusa* o *C. nitens* (**Figura 30**). El área foliar fue similar en todas las especies ( $F_{3,21} = 0,18$ ;  $P = 0,906$ ) y por este criterio no se generó sesgo en la preferencia de las polillas.

**Figura 30.** Promedio ( $\pm$  error estándar,  $n = 8$ ) de huevos colocados por polillas en las hojas de *Crotalaria* spp. en un experimento de selección múltiple. Los datos se transformaron con raíz cuadrada para cumplir con los supuestos del ANOVA. Las letras diferentes significan diferencias significativas, prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).



Las orugas provenientes del anterior experimento se alimentaron con hojas o semillas de *C. pallida*, *C. incana*, *C. retusa* y *C. nitens* que se habían propagado en parcelas experimentales de CENIVAM. Las orugas alimentadas con partes de plantas de *C. incana* y *C. pallida*, con menos contenido de PA, pesaron más que las orugas alimentadas con plantas con más contenido de PA (*C. nitens* y *C. retusa*) (**Figura 31**). Se encontró que las orugas alimentadas con hojas de *C. incana* pesaron más que cuando se alimentaron con sus semillas, el mismo comportamiento se observó en *C. nitens*, pero para las demás especies, el peso de las orugas se mantuvo igual, indiferentemente si se alimentaban con hojas o semillas.

**Figura 31.** Promedio ( $\pm$  error estándar,  $n = 7$ ) del peso de las orugas en instar cinco alimentadas con hojas o semillas de las cuatro especies de *Crotalaria*. Los datos se transformaron con logaritmo natural para cumplir con los supuestos del ANOVA. Las letras diferentes significan diferencias significativas,  $**P < 0,01$ ,  $*** P < 0,001$ . Prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).



### 3.2.2 Acumulación y transformación de PA en *U. ornatix* alimentadas con hojas o semillas de *Crotalaria* spp.

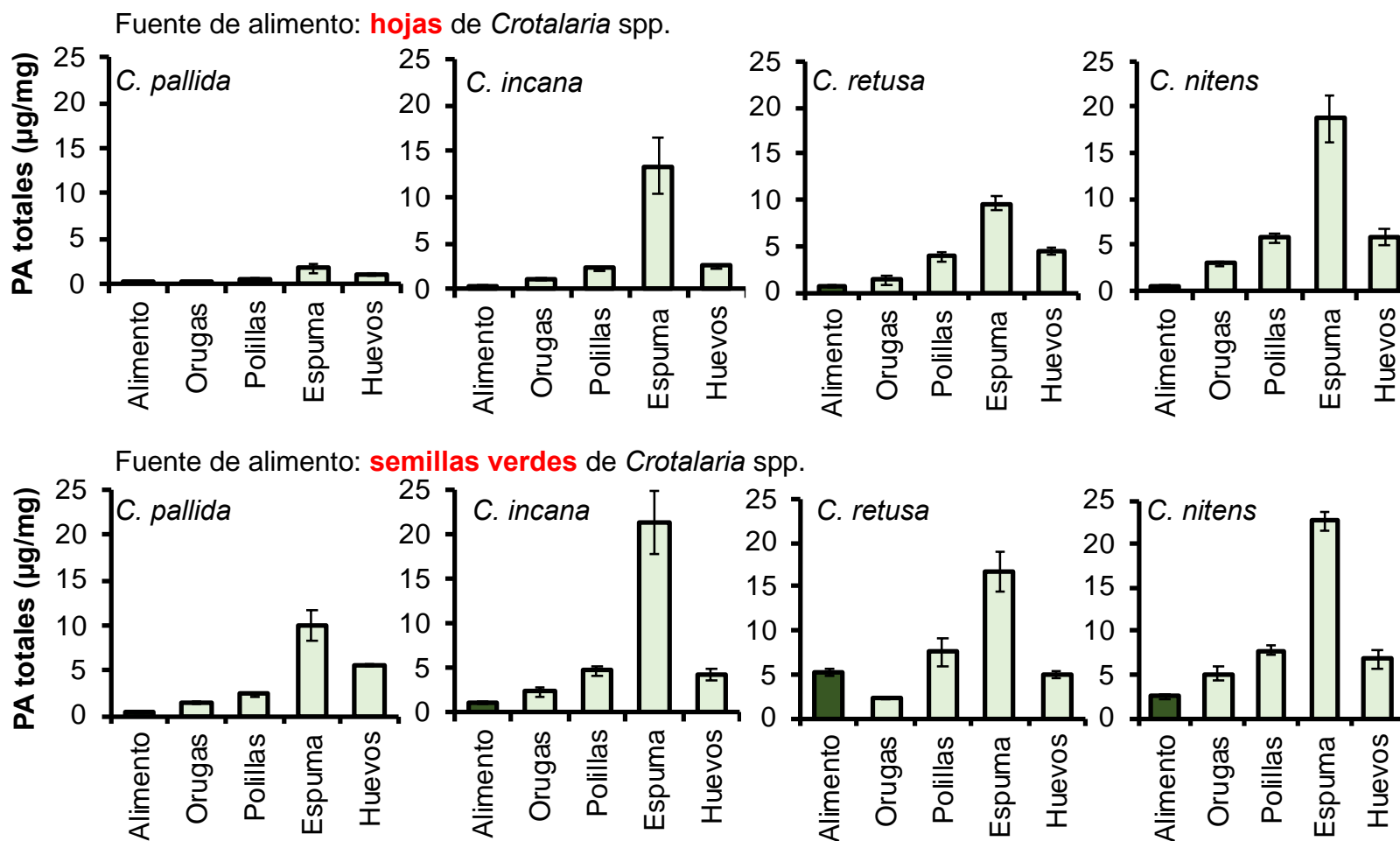
La **Figura 32** muestra la acumulación de PA en varios estados del ciclo de vida de *U. ornatix*, después de alimentarse con hojas o semillas de las cuatro especies de *Crotalaria*. El contenido de los PA en las orugas se determinó antes de convertirse en crisálidas y en las polillas, a los dos días de nacer. En todos los tratamientos la concentración de los PA en la oruga, fue hasta cinco veces, y en la polilla, hasta 15 veces mayor que la encontrada en el alimento, mientras que la espuma que segregó la polilla para defenderse (Eisner y Meinwald,

1995), tenía hasta 50 veces más alta la concentración de alcaloides en comparación el del alimento recibido.

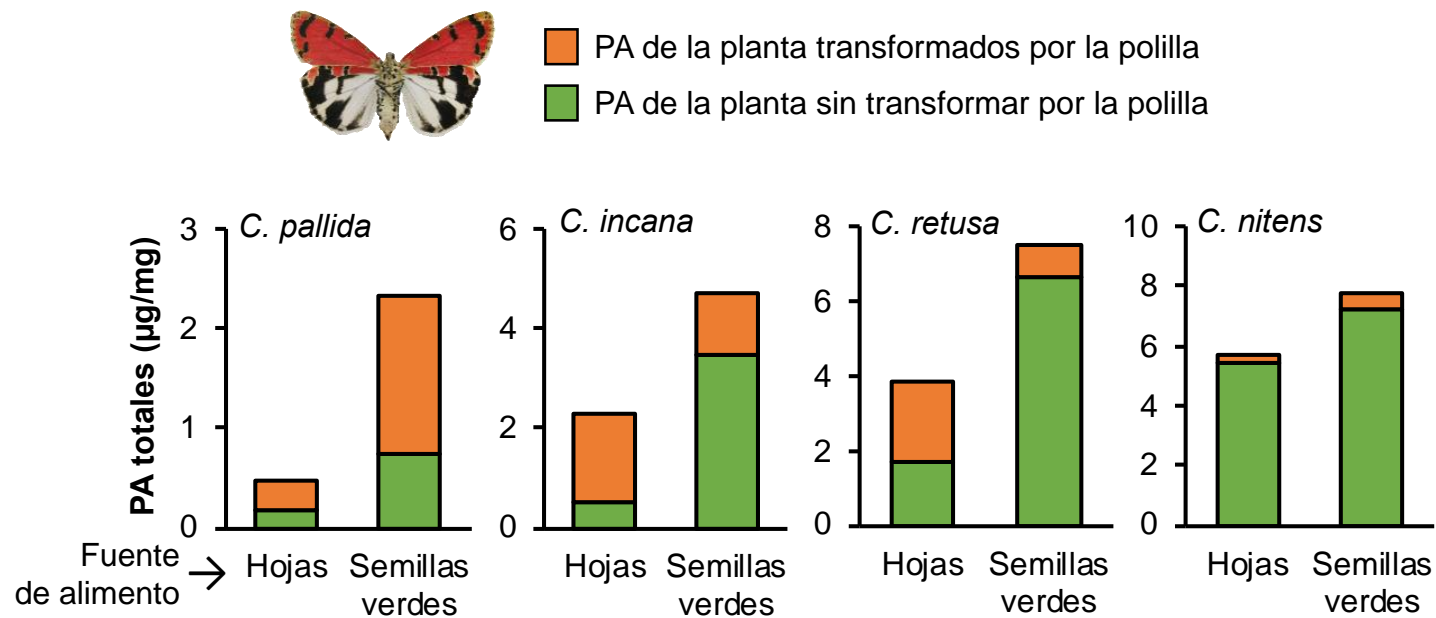
Se encontró que las orugas alimentadas con plantas de baja concentración de PA (*C. pallida* y *C. incana*), tenían una proporción más alta de compuestos transformados por *U. ornatix* (polilla), en comparación con las orugas que se alimentaron con plantas (*C. retusa* o *C. nitens*) con mucho más alto PA (**Figura 33**).

Los PA mayoritarios biosintetizados por *U. ornatix* alimentados con hojas de *C. pallida* o *C. incana* (**Figura 34, Tabla 9**) fueron el *N*-óxido de creatonotina B y dos compuestos nuevos, no reportados previamente, ambos *N*-óxidos, uno derivado de la macronecina y otro, derivado de la laburnina. En ambas moléculas, los espectros de masas muestran la pérdida del sustituyente  $[(M+H)-C_6H_{10}O_2]^+$  en la posición C(9), que correspondió a la misma pérdida reportada para la creatonotina B (Véase las estructuras moleculares propuestas en la **Figura 18**). No se detectaron alcaloides en las orugas control que se alimentaron con semillas de habichuela, es decir, los nuevos PA corresponden exclusivamente a los transformados por *U. ornatix*. Por el contrario, cuando la fuente de alimento fue hojas o semillas de *C. retusa* o *C. nitens* (**Figura 34, Tabla 10**), los compuestos mayoritarios presentes en el insecto fueron el *N*-óxido de creatonotina A, el *N*-óxido de creatonotina B y el *N*-óxido de callimorfina. El *N*-óxido de callimorfina no se había reportado previamente en *U. ornatix*.

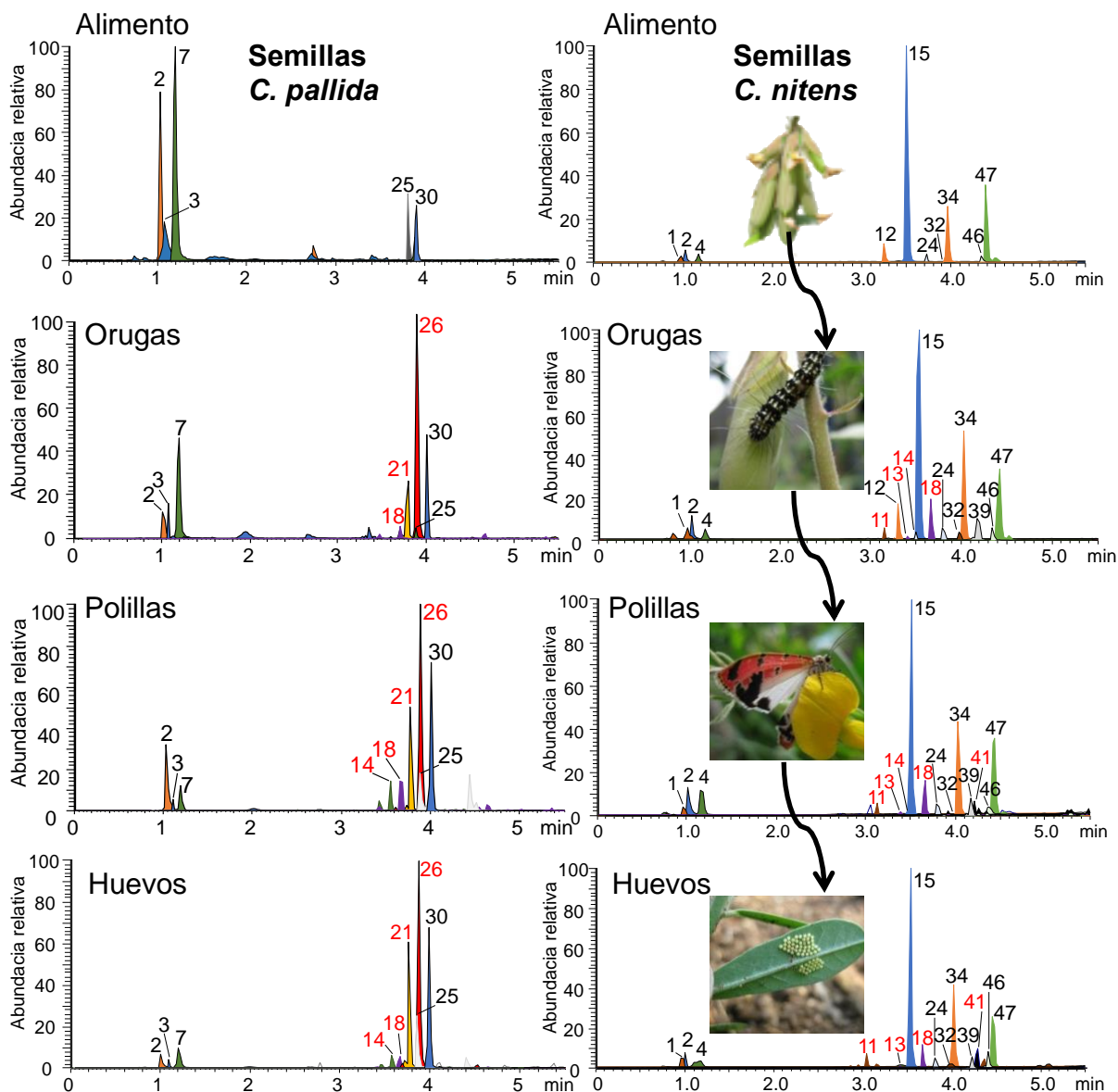
**Figura 32.** Acumulación de PA en *U. ornatix*: orugas, polillas, la espuma que segrega la polilla y sus huevos, después que las orugas se alimentaron con hojas o semillas de *C. pallida*, *C. incana*, *C. retusa* o *C. nitens*.



**Figura 33.** Contenido total de los PA acumulados por las polillas *U. ornatrix* y proporción de compuestos biotransformados cuando las orugas se alimentaron con hojas o semillas de *C. pallida* o *C. incana*, que tenían menos contenido de PA en comparación con *C. retusa* o *C. nitens*.



**Figura 34.** Perfiles cromatográficos (corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas  $[M+H]^+$ ) de los PA presentes *U. oratrix*, alimentadas con semillas inmaduras de *C. nitens* o *C. pallida*. Extracción MSPD y análisis LC-MS (*Orbitrap*). Los números registrados en negro corresponden a los PA que provienen de la planta y en rojo a los transformados por el insecto. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla 2**.



**Tabla 9.** Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en el alimento (semillas *C. pallida*) y en diferentes estados de *U. oratrix*.

N° pico Fig. 34	Alcaloide pirrolizidínico	Alcaloides pirrolizidínicos, µg/mg				
		Alimento	Oruga	Polilla	Espuma	Huevo
2	Dihidropirrolizina, N.I.	0,03±0,01	0,04±0,01	0,103±0,002	0,17±0,07	0,11±0,01
3	Macronecina isómero	0,03±0,01	0,04±0,01	0,009±0,001	N.D.	0,028±0,001
7	Laburnina isómero	0,27±0,06	0,12±0,03	0,071±0,008	0,04±0,03	0,18±0,03
11	<i>N</i> -Óxido de creatonotina A	N.D.	N.D.	N.D.	0,2±0,14	N.D.
14	Creatonotina B	N.D.	0,007±0,001	0,02±0,01	N.D.	0,006±0,005
18	<i>N</i> -Óxido de creatonotina B	N.D.	0,004±0,001	0,012±0,001	0,6±0,33	0,044±0,004
21	<i>N</i> -Óxido de macronecina-derivado	N.D.	0,10±0,01	0,28±0,01	0,5±0,14	0,78±0,01
25	Usaramina	0,02±0,02	0,010±0,002	0,09±0,04	3±2,0	0,13±0,01
26	<i>N</i> -Óxido de laburnina-derivado	N.D.	0,9±0,10	1,3±0,1	1,3±0,64	3,40±0,06
30	<i>N</i> -Óxido de usaramina	0,01±0,01	0,21±0,03	0,46±0,01	3,3±0,60	0,79±0,05
46	Integerrimina	N.D.	N.D.	N.D.	0,08±0,09	N.D.
47	<i>N</i> -Óxido de integerrimina	N.D.	N.D.	N.D.	0,6±0,30	N.D.
<b>PA totales</b>		<b>0,37±0,08</b>	<b>1,4±0,15</b>	<b>2,3±0,13</b>	<b>10±2,9</b>	<b>5,49±0,07</b>
PA de la planta, %		100	30±2,5	31,4±0,41	74±15,2	22,8±0,26
PA transformado por el insecto, %		–	70±3,5	68,6±0,84	26±9,2	77,2±0,86

N.I., No identificado. N.D., No detectado. Los PA sombreados en azul corresponden a los transformados por *U. oratrix*.

**Tabla 10.** Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en el alimento (semillas *C. nitens*) y en diferentes estados de *U. ornatrix*.

N° pico Fig. 34	Alcaloide pirrolizidínico	Alcaloides pirrolizidínicos, µg/mg				
		Alimento	Oruga	Polilla	Espuma	Huevo
1	Retronecina	0,009±0,006	0,06±0,05	0,047±0,003	0,03±0,01	0,012±0,001
2	Dihidropirrolizina, N.I.	0,05±0,02	0,10±0,01	0,14±0,01	0,05±0,01	0,020±0,004
4	<i>N</i> -Óxido de retronecina	0,012±0,009	0,07±0,03	0,13±0,01	N.D.	0,003±0,001
11	<i>N</i> -Óxido de creatonotina A	N.D.	0,023±0,007	0,092±0,004	0,002±0,001	0,011±0,001
12	Monocrotalina	0,41±0,21	0,102±0,001	0,04±0,01	5,3±0,57	0,021±0,005
13	<i>N</i> -Óxido de <i>iso</i> -Creatonotina B	N.D.	0,009±0,001	0,024±0,003	N.D.	0,012±0,001
14	Creatonotina B	N.D.	0,002±0,001	0,0011±0,0003	N.D.	N.D.
15	<i>N</i> -Óxido de monocrotalina	1,2±0,27	2,92±0,07	4,0±0,20	2,1±0,19	4,3±0,10
18	<i>N</i> -Óxido de creatonotina B	N.D.	0,12±0,02	0,41±0,08	0,25±0,15	0,18±0,01
24	<i>N</i> -Óxido de 14-metil-monocrotalina	0,006±0,001	0,033±0,001	0,08±0,01	N.D.	0,045±0,001
32	Crotaleschenina	0,06±0,04	0,016±0,001	0,011±0,002	3,2±0,10	0,004±0,001
34	<i>N</i> -Óxido de crotaleschenina	0,28±0,04	1,06±0,03	1,7±0,36	3,2±0,20	1,3±0,01
39	PA- <i>N</i> -óxido 9-monoéster, N.I.	N.D.	0,026±0,004	0,044±0,007	N.D.	0,011±0,001
41	<i>N</i> -Óxido de callimorfina	N.D.	N.D.	0,002±0,001	N.D.	0,102±0,003

**Tabla 10.** Continuación.

46	Integerrimina	0,09±0,04	0,049±0,009	0,006±0,001	2,3±0,23	0,003±0,001
47	N-Óxido de integerrimina	0,34±0,05	0,49±0,02	1,1±0,18	6,3±0,55	0,68±0,01
<b>PA totales</b>		<b>2,5±0,30</b>	<b>5,1±0,11</b>	<b>7,8±0,63</b>	<b>22,7±0,73</b>	<b>6,8±0,12</b>
PA de la planta, %		100	97,0±0,62	93,3±0,46	99±1,6	95,5±0,71
PA transformado por el insecto, %		–	3,0±0,61	6,7±0,41	1±1,1	4,5±0,27

N.I., No identificado. N.D., No detectado. Los PA sombreados en azul corresponden a los transformados por *U. ornatrix*.

### **3.3 Cambios en la composición de alcaloides pirrolizidínicos y volátiles inducidos por herbivoría en hojas de *C. nitens* sometidas al ataque de orugas *U. ornatrix*.**

Se determinó si la planta cambia la concentración de PA o emite volátiles como mecanismo de defensa al ataque de las orugas especializadas *U. ornatrix*.

#### **3.3.1 Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos en hojas de *C. nitens* antes y después del ataque de orugas *U. ornatrix*.**

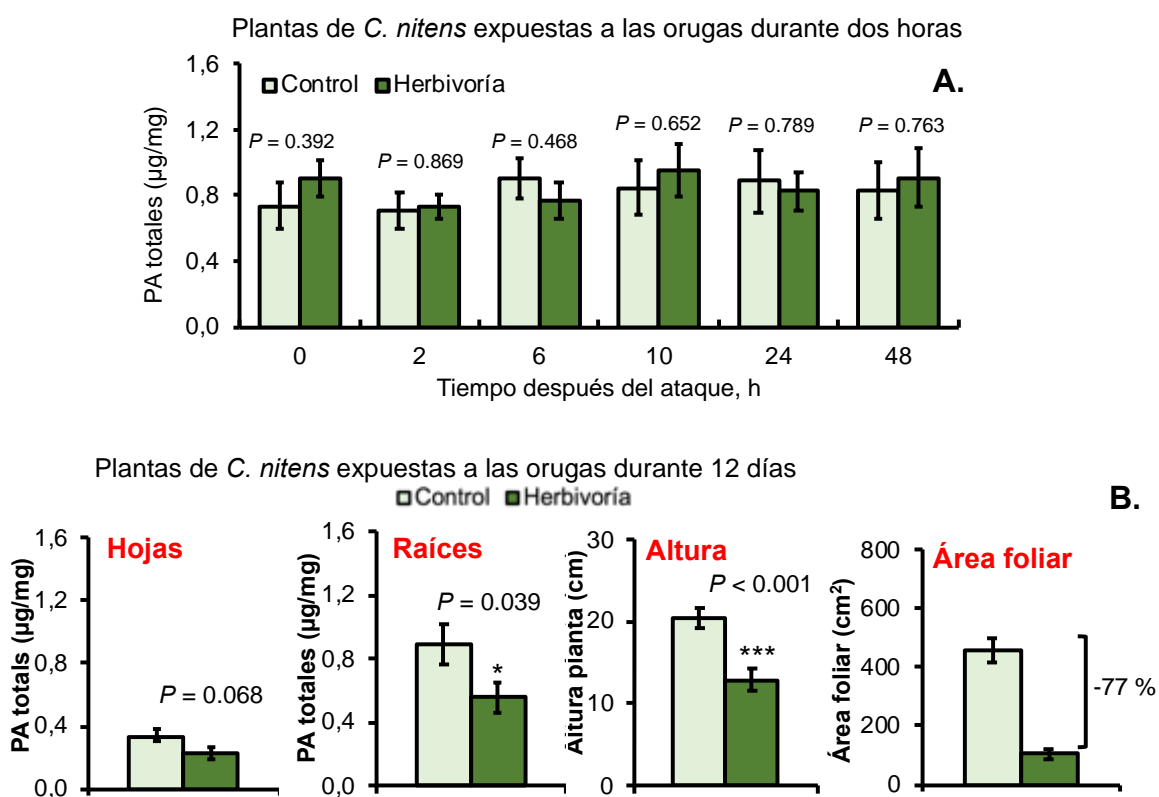
En el primer experimento, las plantas de *C. nitens* sufrieron ataque de seis orugas *U. ornatrix* durante dos horas. Los resultados no mostraron cambios significativos en la concentración del contenido total de los PA después de 2, 6, 10, 24 o 48 h del ataque (**Figura 35A**). En un segundo experimento, tres orugas se alimentaron durante 12 días con plantas. Las orugas lograron reducir el área foliar en un 77%. Las plantas también disminuyeron su crecimiento significativamente. Sin embargo, los resultados mostraron que no hubo cambios significativos en la concentración de los PA en las hojas de *C. nitens* afectadas. Por el contrario, se generó una disminución significativa en el contenido de los PA en las raíces (**Figura 35B**).

#### **3.3.2 Volátiles inducidos por herbivoría (HIPV) en hojas de *C. nitens* antes, durante y después del ataque de orugas *U. ornatrix*.**

Se aplicaron dos métodos de extracción de HIPV en hojas de *C. nitens*. Uno, usando HS-SPME y el otro, el sistema P&T. El análisis por GC-MS de las fracciones de volátiles permitió la identificación de 21 compuestos emitidos por las hojas de *C. nitens* atacadas con orugas *U. ornatrix*. En la **Tabla 11**, se muestran la identificación de los picos en columnas

polar y apolar, y las áreas cromatográficas relativas GC durante el ataque (hora dos) y después del ataque (hora seis). Antes del ataque de las orugas, las plantas emitían pocas cantidades únicamente del homoterpeno DMNT (**Figura 36**).

**Figura 35.** Cambios en la concentración de PA en plantas de *C. nitens*. **A.** Las hojas de *C. nitens* fueron atacadas durante dos horas. **B.** Las hojas de *C. nitens* se mantuvieron en contacto con las orugas durante 12 días, al finalizar este tiempo, se midieron los PA en hojas y raíces, y el cambio el crecimiento: área foliar y altura de las plantas.



**Tabla 11.** Identificación de compuestos orgánicos volátiles emitidos por herbivoría en hojas de *C. nitens*.

N°	Fig.	Compuesto	Tipo	DB-WAX		DB-5MS		Área relativa GC, %			
								Durante el ataque		Después del ataque (6h)	
				IRL <sub>Exp</sub>	IRL <sub>Lit</sub>	IRL <sub>Exp</sub>	IRL <sub>Lit</sub>	SPME	P&T	SPME	P&T
36											
1		<i>cis</i> -3-Hexenal <sup>a</sup>	GLV	1140	1139 [1]	800	799 [1]	0.2	10.1	N.D.	N.D.
2		<i>trans</i> -β-Ocimeno <sup>a</sup>	HMon.	1250	1250 [1]	1048	1048 [1]	2.9	N.D.	14	9
3		3-Octanona <sup>b,c</sup>	OCO	1253	1255 [1]	986	985 [1]	1.8	0.7	1.1	1.7
4		Acetato de hexilo <sup>b,c</sup>	GLV	1269	1264 [2]	1012	1010 [1]	0.5	0.31	N.D.	N.D.
5		<i>trans</i> -4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) <sup>b,c</sup>	HTerp.	1306	1302 [3]	1115	1119 [5]	5	1.2	19	8.9
6		Acetato de <i>cis</i> -3-hexenilo <sup>a</sup>	GLV	1316	1308 [2]	1004	1004 [1]	80	79	1.9	1.2
7		<i>allo</i> -Ocimeno <sup>b,c</sup>	HMon.	1367	1366 [1]	1129	1130 [1]	N.D.	N.D.	0.2	N.D.
8		2-Metil-propil-aldoxima <sup>a</sup>	Ald.	1381	–	752	–	N.D.	N.D.	5	3.4
9		<i>cis</i> -3-Hexenol <sup>a</sup>	GLV	1384	1378 [1]	855	857 [1]	6	8	N.D.	N.D.
10		3-Octanol <sup>b,c</sup>	OCO	1386	1392 [1]	998	993 [1]	N.D.	N.D.	0.03	N.D.
11		1-Octen-3-ol <sup>a</sup>	OCO	1448	1442 [1]	982	980 [1]	1.2	0.11	0.7	0.3
12		2-Metil-butil-aldoxima <sup>c</sup>	Ald.	1479	–	856	–	N.D.	N.D.	6	5.3
13		Linalool <sup>a</sup>	MO	1543	1543 [1]	1101	1099 [1]	0.4	0.05	13	11
14		<i>trans</i> -β-Cariofileno <sup>a</sup>	HSes.	1610	1598 [1]	1422	1420 [1]	0.7	N.D.	20	13
15		α-Humuleno <sup>a</sup>	HSes.	1683	1667 [1]	1471	1453 [1]	0.1	N.D.	4.1	3.1
16		Germacreno D <sup>b,c</sup>	HSes.	1720	1708 [1]	1492	1481 [1]	0.2	N.D.	0.6	N.D.

**Tabla 11.** Continuación.

17	<i>trans, trans</i> - $\alpha$ -Farneseno <sup>b, c</sup>	HSes.	1746	1744 [1]	1505	1504 [1]	N.D.	N.D.	4	8
18	Salicilato de metilo <sup>b, c</sup>	CA	1772	1768 [1]	1198	1193 [1]	N.D.	N.D.	0.3	1.6
19	<i>trans</i> -Nerolidol <sup>a</sup>	SO	2038	2036 [1]	1564	1561 [1]	N.D.	N.D.	1.4	10
20	Antranilato de metilo <sup>b, c</sup>	CA	2241	2255 [4]	–	–	N.D.	N.D.	N.D.	3
21	Indol <sup>a</sup>	CA	2446	2440 [1]	1300	1298 [1]	0.4	N.D.	2.2	18

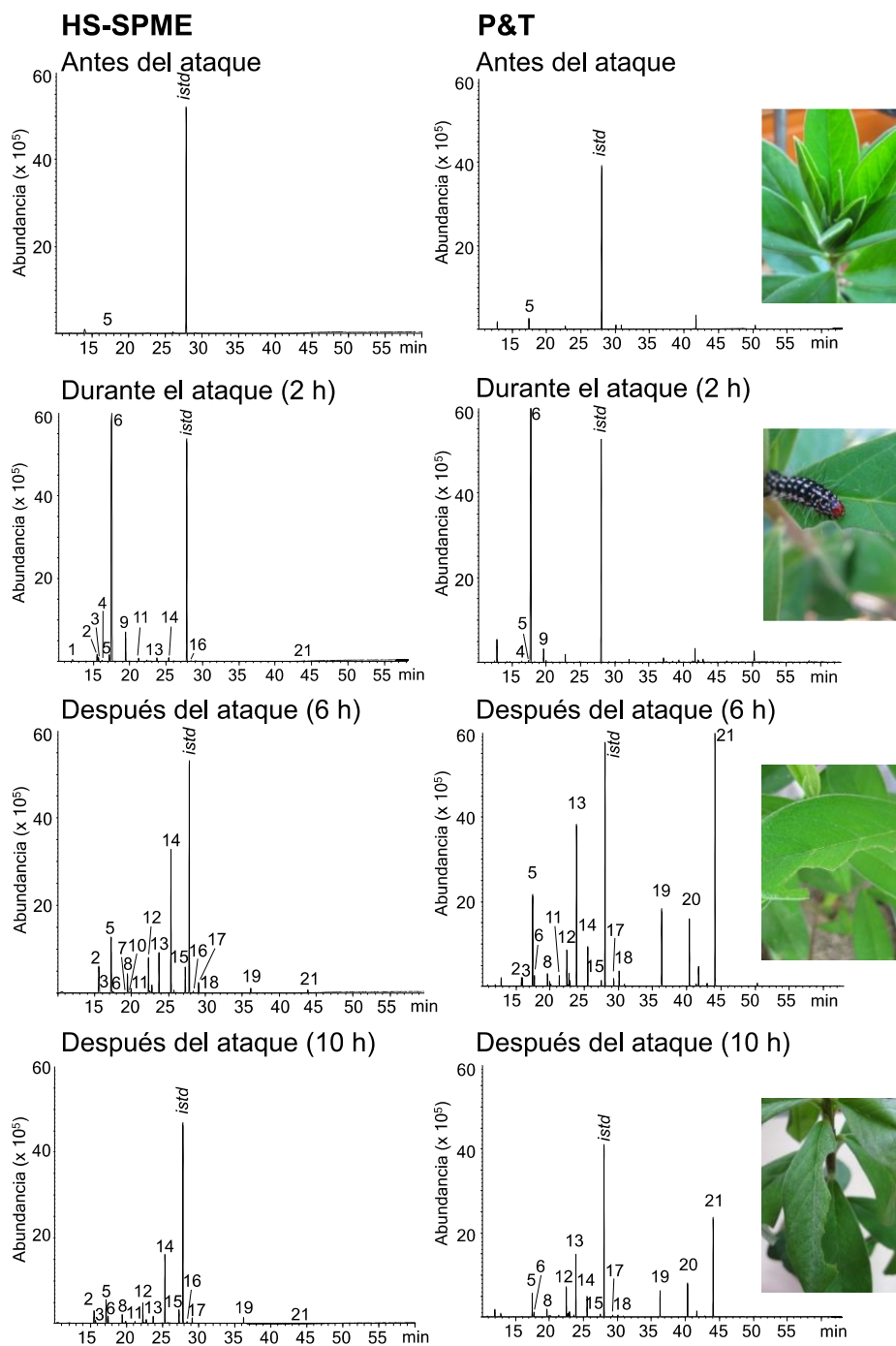
N.D., No detectado. SPME, micro-extracción en fase sólida. P&T, extracción con sistema de purga y trampa. GLV, volátiles de hojas verdes. HMon., hidrocarburos monoterpénicos. OCO, otros compuestos oxigenados. HTerp., homoterpeno; Ald. aldoximas; MO, monoterpenos oxigenados; HSes., hidrocarburos sesquiterpénicos; CA, compuestos aromáticos; SO, sesquiterpenos oxigenados.

<sup>a</sup>Identificación confirmatoria con materiales de referencia.

<sup>b</sup>Identificación tentativa basada en la comparación de los IRL experimentales con los reportados en literatura: [1] Babushok y col., 2011; [2] Ruther, 2000; [3] Buttery y col., 2000; [4] Ferreira y col., 2001; [5] Borges y col., 2018.

<sup>c</sup>Identificación tentativa con base en la comparación del espectro de masas con bases de datos NIST y Wiley (EI, 70 eV, coincidencia > 90%).

**Figura 36.** Perfiles cromatográficos de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens* antes del ataque (hora cero), durante el ataque (hora dos) y después del ataque (horas seis y diez) con orugas *U. ornatatrix*. Extracción HS-SPME (PDMS/DVB, 65  $\mu$ m) y P&T (Porapak-Q). Análisis GC-MS, columna DB-WAX (60 m). Véase la identificación de los picos en la **Tabla 11**.



Los mismos compuestos volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens*, se extrajeron con la fibra PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) en el método HS-SPME y por el Porapak-Q del sistema P&T, aunque se observó variación en la proporción de algunas familias de compuestos. Para realizar la comparación, los compuestos HIPV emitidos por las hojas de *C. nitens*, se agruparon según su estructura química de la siguiente manera: (i) volátiles de hojas verdes (GLV), (ii) monoterpenoides (hidrocarburos monoterpénicos y monoterpenos oxigenados), (iii) sesquiterpenoides (hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados), (iv) el homoterpeno DMNT, (v) aldoximas, (vi) compuestos aromáticos y (vii) otros compuestos oxigenados (**Tabla 12**). Se encontró que con la fibra de PDMS/DVB se extrajeron en mayor proporción compuestos apolares como el *trans*- $\beta$ -ocimeno, el monoterpeno DMNT y el *trans*- $\beta$ -cariofileno, en comparación con la trampa de Porapak-Q del sistema P&T, que extrajo en mayor grado compuestos más polares como el acetato de *cis*-3-hexenilo, el sesquiterpeno oxigenado, *trans*-nerolidol, y los compuestos heteroaromáticos, *e.g.*, indol y antranilato de metilo.

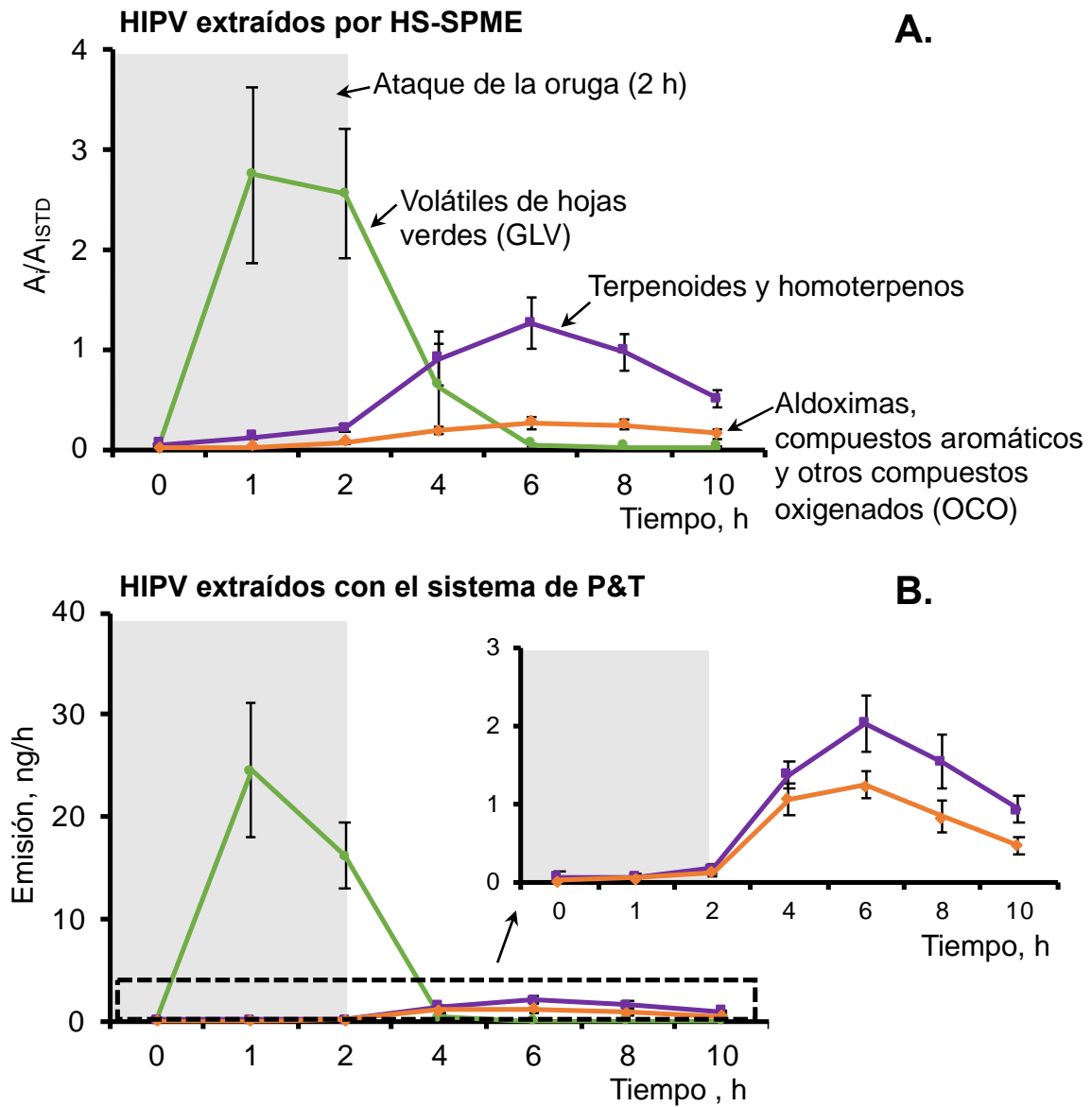
Las HIPV emitidos por las hojas de *C. nitens* se midieron durante 10 h usando los métodos de extracción por HS-SPME y de P&T (**Figura 36**). La dinámica de liberación se determinó cada hora, durante el ataque y, cada dos horas después de retirar las orugas. Se encontró que los GLV se emitieron apenas inició el daño causado por los herbívoros, pero disminuyó rápidamente después que se retiraron las orugas (**Figura 37**). La emisión de terpenoides y DMNT comenzó una hora después del ataque, mientras que las aldoximas y compuestos aromáticos aparecieron un poco más tarde, pero todos alcanzaron el pico máximo de emisión a las seis horas, después del inicio del ataque.

**Tabla 12.** Comparación de los métodos SPME con fibra PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) y Purga y Trampa (P&T) con adsorbente Porapak-Q, para la extracción de compuestos orgánicos volátiles emitidos por herbivoría en hojas de *C. nitens*.

Familias de compuestos	Área relativa GC, %					
	Durante el ataque (2 h)			Después del ataque (6 h)		
	SPME	P&T		SPME	P&T	
Volátiles de hojas verdes (GLV)	87 $\pm$ 2.7	97.6 $\pm$ 0.5	***	1.9 $\pm$ 0.54	1.2 $\pm$ 0.30	N.S.
Monoterpenoides	3.3 $\pm$ 0.80	0.05 $\pm$ 0.048	***	28 $\pm$ 6.6	20 $\pm$ 3.1	N.S.
Sesquiterpenoides	1.0 $\pm$ 0.20	0.10 $\pm$ 0.070	**	31 $\pm$ 5.8	35 $\pm$ 5.1	N.S.
Homoterpeno (DMNT)	5 $\pm$ 1.4	1.2 $\pm$ 0.31	N.S.	19 $\pm$ 2.1	8.9 $\pm$ 0.93	***
Aldoximas	–	–	–	12 $\pm$ 3.4	9 $\pm$ 1.2	N.S.
Compuestos aromáticos	0.5 $\pm$ 0.31	–	–	2.7 $\pm$ 0.93	22 $\pm$ 5.6	*
Otros compuestos oxigenados <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.73	0.8 $\pm$ 0.33	*	15 $\pm$ 3.4	13 $\pm$ 1.5	N.S.

<sup>a</sup> 3-Octanona, 3-octanol y 1-octen-3-ol. Promedio  $\pm$  error estándar (SMPE,  $n = 7$ ; P&T,  $n = 10$ ); N.S., no significativo; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

**Figura 37.** Emisión de HIPV en hojas de *C. nitens* de 12 semanas de edad. Las orugas *U. oratrix* atacaron las hojas durante dos horas. Los HIPV se extrajeron por **A.** Extracción HS-SPME (fibra PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ,  $n = 7$  plantas) y **B.** P&T (trampa Porapak-Q,  $n = 10$  plantas). Análisis GC-MS, columna DB-WAX (60 m). Los valores son el promedio  $\pm$  error estándar.



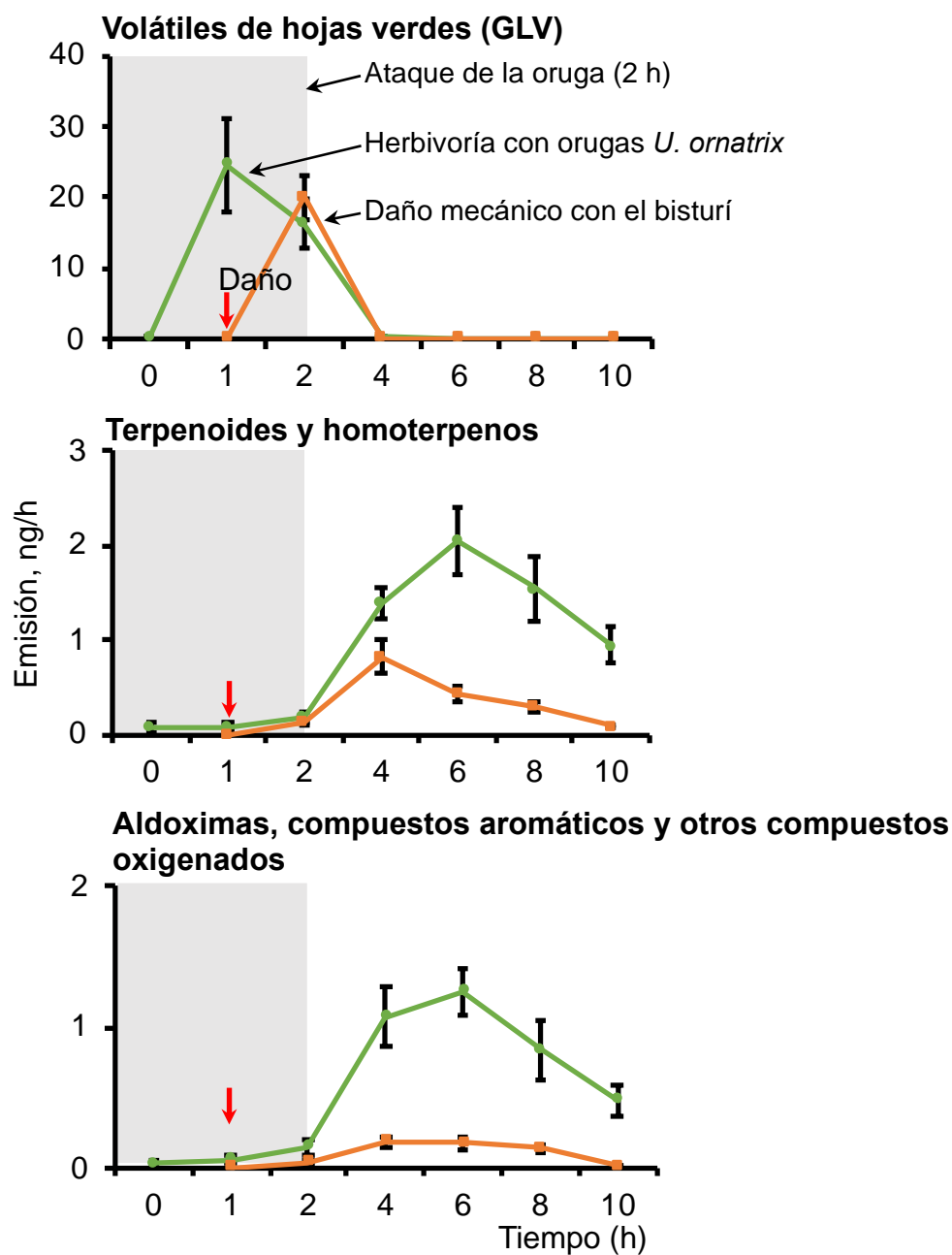
### 3.3.3 Volátiles emitidos en hojas de *C. nitens* con daño mecánico

Para responder a la pregunta de investigación sobre si la emisión de volátiles en *C. nitens* fue en respuesta a cualquier estímulo o si era específica al ataque de la oruga, se midieron los volátiles de las hojas con daño mecánico (con bisturí) y se compararon con los generados por el ataque con la oruga. El área de daño realizado para ambos tratamientos fue similar. Se observó que las hojas de *C. nitens* emiten los mismos GLV (principalmente, acetato de *cis*-3-hexenilo y *cis*-3-hexen-1-ol) al comienzo del ataque con la oruga o cuando se hace el daño mecánico (**Figura 38**). Sin embargo, posterior al daño mecánico, no se detectaron compuestos aromáticos y la emisión de los terpenoides y aldoximas disminuyó drásticamente en comparación con la emisión que realizan las hojas después del ataque con las orugas (**Figura 39**).

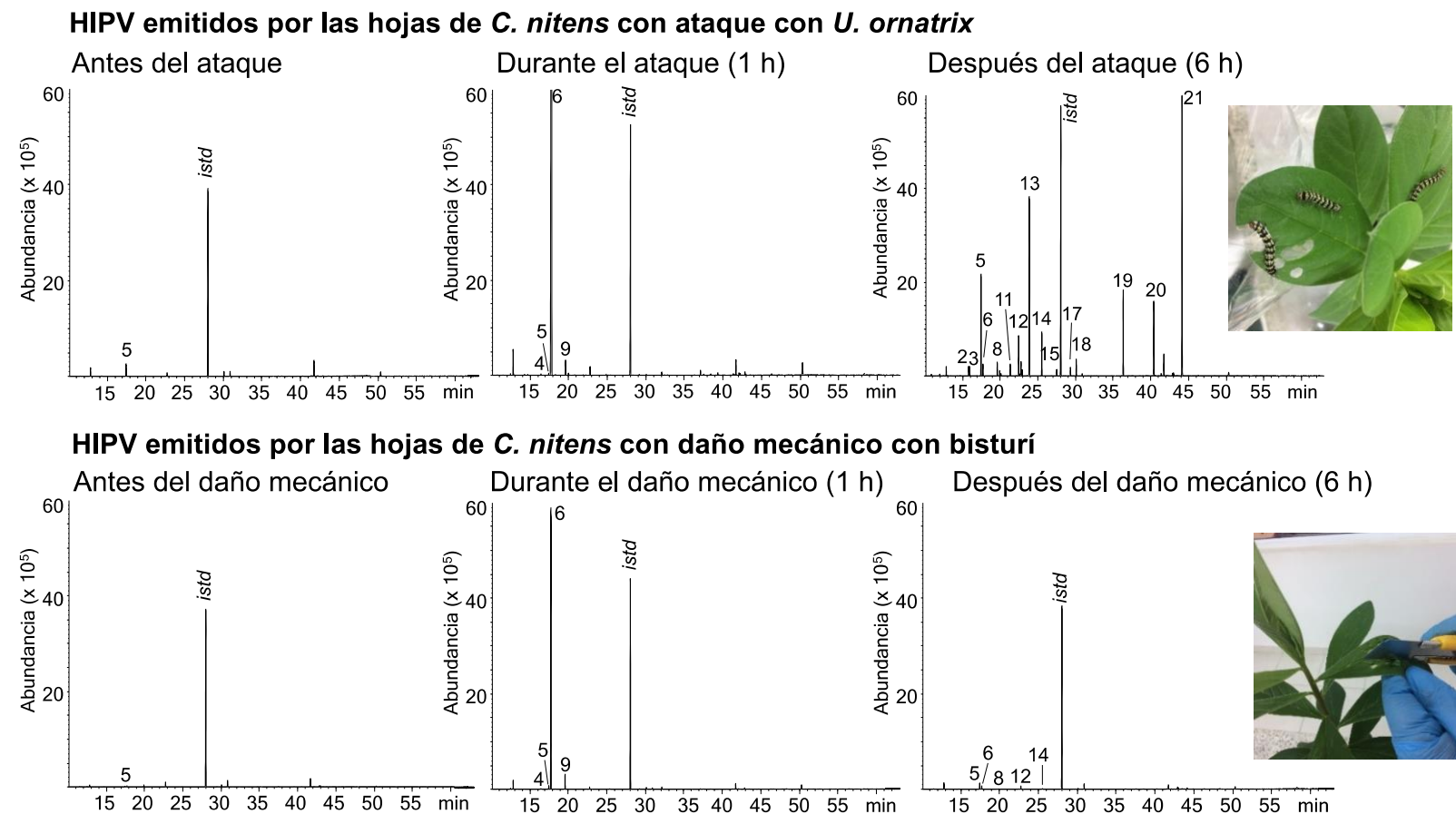
### 3.4 Los volátiles inducidos por herbivoría con orugas *U. ornatrix* repelen las hembras conespecíficas.

Los resultados mostraron que los volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens* estuvieron asociados con el ataque de la oruga y no con el daño mecánico. Se ha reportado (Kessler y Baldwin, 2001) que los HIPV emitidos pueden modificar el comportamiento de insectos herbívoros. En el último experimento de la presente investigación, se demostró que los volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens*, después del ataque de las orugas *U. ornatrix*, repelieron las polillas hembras de la misma especie. Las polillas prefirieron poner sus huevos en plantas sanas y no en las previamente atacadas por las mismas orugas *U. ornatrix* (**Figura 40**).

**Figura 38.** Emisión de HIPV por hojas de *C. nitens* de 12 semanas de edad, con herbivoría (verde) y con daño mecánico con el bisturí (naranja). Los HIPV se atraparón en el Porapak-Q del sistema de P&T. Análisis por GC-MS, columna DB-WAX (60 m). Valores son el promedio  $\pm$  error estándar ( $n = 10$ ).

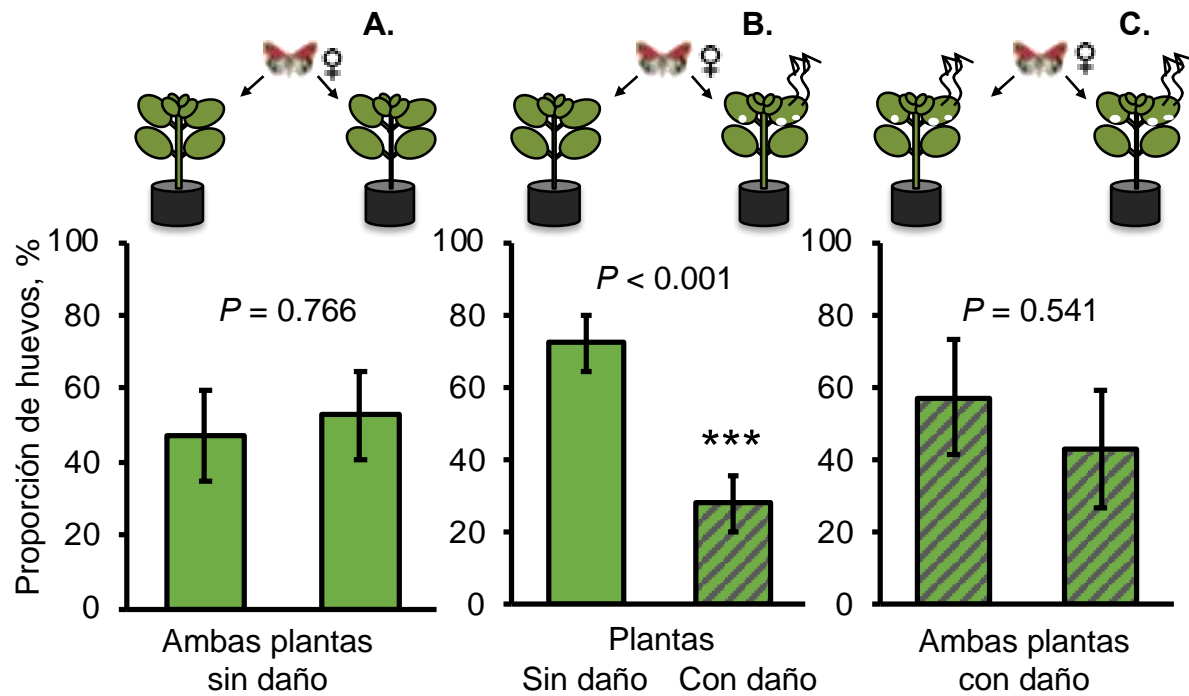


**Figura 39.** Perfiles cromatográficos de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens*, antes (hora cero), durante (hora dos) y después (horas seis y diez) del daño mecánico (bisturí) o el ataque con orugas *U. ornatix*. Extracción por P&T (Porapak-Q). Análisis por GC-MS, columna DB-WAX (60 m). Véase la identificación de los picos en la **Tabla 11**.



**Figura 40.** Preferencia en la oviposición de las polillas hembras *U. ornatrix* en hoja de *C. nitens*.

**A.** Ambas plantas sanas; **B.** Planta sana y planta después el ataque de las orugas durante dos horas, previo al experimento y **C.** Ambas plantas después del ataque de las orugas. ( $n = 7$ ).



#### 4 Discusión de resultados

Los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas son importantes para su supervivencia en todos los ecosistemas, la adaptación a los cambios ambientales y las interacciones ecológicas con otros organismos (Mithöfer y col., 2009; Mithöfer y Boland, 2012). Los mecanismos generados por plantas para defenderse de los herbívoros pueden usarse como herramientas para disminuir la presencia de insectos plaga en cultivos agrícolas y reducir la utilización de pesticidas nocivos (Mithöfer y Boland, 2012). No obstante, estas interacciones son muy complejas y aún se desconocen muchas de las funciones que cumplen los metabolitos secundarios en las interacciones de la planta con su entorno (Bouwmeester y col., 2019). En la presente investigación, se demostró que los PA sintetizados por especies de *Crotalaria* se acumulan eficientemente en las orugas *U. ornatix* y se mantienen durante todas las etapas de su ciclo. Los resultados mostraron que, a su vez, las plantas de *C. nitens* reconocieron la mordida de las orugas y se defendieron, emitiendo compuestos volátiles en respuesta al ataque de *U. ornatix*. Los HIPV modificaron el comportamiento de las polillas conespecíficas evitando la oviposición en plantas de *C. nitens* previamente atacadas.

Las plantas de las especies de *Crotalaria* sintetizan los PA para defenderse de insectos herbívoros (Trigo, 2011), sin embargo, estos compuestos han mostrado toxicidad en aves y mamíferos, incluidos los humanos (Álvarez, 2003; Nobre y col., 2005; Fletcher y col., 2009; Stashenko, 2011; Diaz y col., 2014; Diaz, 2015). La alta diversidad de estructuras de los PA presentes en la naturaleza (Ma y col., 2018) requiere de métodos de extracción y análisis eficientes y confiables. La tendencia de las nuevas técnicas de extracción es reducir el uso de solventes, para ser amigables con el ambiente, pero, al mismo tiempo, reducir pasos en la limpieza de la muestra a través del uso de materiales sorbentes que incrementen la selectividad

de la extracción (Barker, 2007). En el presente estudio, se implementó el método MSPD para la extracción de los PA en tejido vegetal de *Crotalaria* spp. y especímenes de *U. ornatrix*. Los resultados mostraron que el uso de sílice-C<sub>18</sub> como agente dispersante permitió la extracción más eficiente de los PA en comparación con sílice o florisil. El agente dispersante actuó como abrasivo para romper la estructura celular del material vegetal de *Crotalaria* y para facilitar la extracción de los PA. La baja recuperación de retrorsina con arena o florisil pudo deberse a las interacciones de los grupos hidroxilo con los grupos polares de estos materiales dispersantes (Barker y col., 1989). Por otro lado, las cadenas de hidrocarburos unidos a la sílice-C<sub>18</sub>, podrían tener interacciones más eficientes con interferencias no polares como lípidos y pigmentos. En consecuencia, los extractos se analizaron sin pasos adicionales de limpieza, lo que evitó la degradación de los PA o sus *N*-óxidos. El metanol con FA al 2% como solvente de extracción incrementó la polaridad de los PA (protonación) y sus interacciones con el solvente. Esto se reflejó en una eficiencia más alta de extracción de los PA en comparación con la obtenida con metanol sin el FA. Los resultados concordaron con lo reportado por Mroczet y col. (2006), quienes mejoraron la extracción de PA de las raíces de *Symphytum officinale* L., usando ácido tartárico al 1%.

La escasa disponibilidad de materiales de referencia requiere técnicas instrumentales de análisis de alta resolución con la capacidad de determinar el carácter pirrolizidínico de compuestos desconocidos dentro mezclas complejas que generan miles de señales en el equipo (Crews y col., 2010). La identificación de los PA desconocidos se realizó por LC-MS acoplado a un espectrómetro de masas *Orbitrap* de alta resolución. Se buscaron las condiciones para obtener la respuesta en el espectrómetro de masas más alta a los materiales de referencia, retrorsina y la monocrotalina. Las mejores condiciones de análisis de los PA se lograron con 0,2% de FA en la

fase móvil (pH = 2.5) y un *Vs*pray de 1,5 kV. A pesar de que una concentración de FA mayor reduce en 0,2 el valor del pH (FA 0,35%, pH = 2.3), lo que sugeriría un incremento en la formación de moléculas protonadas de PA  $[M+H]^+$ , los resultados mostraron una disminución en la respuesta del equipo (**Figura 15**). Esto sucedió probablemente porque algunas impurezas presentes en solución también se protonaron y pudieron generar una supresión de los iones  $[M+H]^+$  de las moléculas de interés (Kearle y Verkerk, 2009).

La estrategia para la identificación de los PA presentes en los extractos obtenidos de plantas de *Crotalaria* fue combinar la información cromatográfica y espectrométrica de los análisis realizados por LC-MS y GC-MS. Por LC-MS se detectaron un total de 45 PA (> 0,05 ng/mL), tanto en forma de bases libres como *N*-óxidos, mientras que por GC-MS, se detectaron 16 PA. La ventaja del análisis GC-MS fue la identificación de algunos PA por comparación de sus espectros de masas experimentales (EI, 70 eV) con los de bases de datos (NIST y Wiley) y por comparación los IRL experimentales con reportados en literatura (Witte y col., 1993; Fletcher y col., 2009; Flores y col., 2009; Martins y col., 2015). Sin embargo, la dificultad del análisis GC-MS es su baja sensibilidad. Varios PA no se detectaron a pesar que se realizó inyección *splitless* y los extractos se prepararon a partir de 2–3 g de muestra en comparación con 0,1–0,2 g para el análisis por LC-MS. Esta situación se presenta posiblemente por la alta polaridad de estas sustancias y su termoinestabilidad a las temperaturas que se trabajan en GC-MS (Ma y col., 2018). Además, para el análisis por GC-MS se realizaron pasos adicionales de reducción de los *N*-óxidos a sus formas libres y posterior limpieza de los extractos. No obstante, en estudios previos (Witte y col., 1993; Fletcher y col., 2009; Flores y col., 2009; Martins y col., 2015), la identificación de los PA en especies de *Crotalaria* se realizó principalmente por GC-MS. Hay pocos estudios de los PA en *Crotalaria* usando LC-ESI(+)-MS. Se encontraron, el

trabajo de Zhang y col. (2017), quienes reportaron monocrotalina, retrorsina, senecionina, integerrimina y 9-ángeloilretronecina en *C. sessiliflora* y el reporte de Sinan y col. (2020), quienes detectaron monocrotalina, su *N*-óxido y los *N*-óxidos de senecionina, usaramina y retrorsine en diferentes partes de plantas de *C. retusa*.

Los resultados de la presente investigación mostraron las ventajas de usar LC-ESI(+)-MS para la detección y análisis de compuestos desconocidos cuando se carecen de materiales de referencia. La asignación de una estructura química a un nuevo compuesto requiere conocer sus rutas de fragmentación, los cuales han sido poco estudiados en los PA analizados por ESI(+)-MS. Los experimentos de intercambio H/D de la presente investigación proporcionaron información sobre las posibles rutas de fragmentación de un PA no esterificado (retronecina, **Figura 21**), un monoéster (heliotrina, **Figura 22**) y un diéster (monocrotalina, **Figura 23**). Las rutas de fragmentación de los espectros de masas obtenidos por EI (70 eV) para la retronecina y la monocrotalina propuestos por Neuner-Jehle y col. (1965), se usaron para compararlos con de los espectros de masas ESI(+)-MS de la retronecina, heliotrina y monocrotalina deuteradas y no deuteradas del presente estudio. Los resultados mostraron que fueron más comunes las pérdidas de fragmentos neutros que los radicalarios en los espectros de masas de ionización a presión atmosférica, en comparación con los obtenidos por EI (70 eV). Las pérdidas neutras ocurrieron por transposiciones, en donde estuvieron involucrados los átomos de deuterio. Este fenómeno se observó en la migración del deuterio presente en ácido necínico en la heliotrina-d<sub>2</sub> [Md<sub>2</sub>+D]<sup>+</sup> para generar la pérdida neutra de C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 22**) y formar la misma retronecina-d<sub>2</sub> deuterada [Md<sub>2</sub>+D]<sup>+</sup>. Posteriormente, ocurrieron pérdidas sucesivas de D<sub>2</sub>O y HDO. La deuteración de la heliotrina-d<sub>2</sub> [Md<sub>2</sub>+D]<sup>+</sup> permitió suponer que el fragmento en *m/z* 95.07175 (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>DN<sup>+</sup>) provino del ion en *m/z* 159.12068 (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>D<sub>3</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) y no de la pérdida de HDO a partir

del ion en  $m/z$  139.09755 ( $C_8H_{11}DNO^+$ ), lo mismo se observó en la retronecina-d<sub>2</sub> deuterada [ $Md_2+D$ ]<sup>+</sup> (**Figura 21**), el fragmento en  $m/z$  95.07175 ( $C_6H_7DN^+$ ) se propuso a partir del ion en  $m/z$  114.08840 ( $C_6H_8D_2NO^+$ ) y no la eliminación de HDO a partir del ion en  $m/z$  139.09755 ( $C_8H_{11}DNO^+$ ), así como lo sugirió Ruan y col. (2012). Sin embargo, la confirmación mas precisa de estas posibles rutas de fragmentación se deberá realizar a futuro con ensayos en un equipo tándem ESI(+)-MS/MS, con el que no contábamos en el momento de los experimentos. En este equipo se podría seleccionar el ion fragmento específico en el primer filtro de masas para, posteriormente, enviarlo a la cámara de colisiones y confirmar sus iones producto. No obstante, los resultados de la presente investigación mostraron la facilidad con que se realizó el intercambio H/D en moléculas de PA y la posibilidad de estudiar con detalle sus rutas de fragmentación.

Los resultados del presente estudio mostraron que las corrientes iónicas totales obtenidas del análisis por LC-MS de los extractos MSPD proporcionaron muchas señales que correspondieron, tanto de los PA, como a otros compuestos co-extraídos del tejido vegetal de las plantas de *Crotalaria*. Los espectros de masas de alta resolución ESI(+)-MS (*Orbitrap*) proporcionaron las masas exactas de las moléculas protonadas y las fórmulas moleculares de los 45 PA y sus *N*-óxidos, lo mismo que para los siete PA presentes en el insecto *U. ornatix*. El carácter pirrolizidínico de los  $[M+H]^+$  se determinó con los perfiles de fragmentación basados en los iones característicos en  $m/z$  138.09134,  $m/z$  120.08078 y en  $m/z$  94.06513 para los PA tipo retronecina monoésteres y diésteres cíclicos; los iones en  $m/z$  136.07569 y  $m/z$  118.06513 para sus *N*-óxidos y los fragmentos en  $m/z$  140.10699,  $m/z$  122.09643 y en  $m/z$  96.08078 para los PA tipo platinecina. Los PA más comunes en las plantas de *Crotalaria* se identificaron fácilmente por comparación con los espectros de masas ESI(+)-MS reportados en literatura o con los

obtenidos por GC-MS. Sin embargo, muchos otros PA quedaron sin asignación de estructura. La identificación de algunos de estos PA desconocidos, se realizó con un estudio detallado de sus patrones de fragmentación. Como resultado, se identificaron tentativamente la mayoría de los compuestos detectados sin la comparación con materiales de referencia, imposibles de conseguir. Se propuso la estructura tentativa para nueve PA no reportados previamente en literatura. Siete en las especies de *Crotalaria* y dos en *U. ornatrix*. Además, se publica por primera vez un compendio completo de sus espectros de masas ESI(+)-MS en alta resolución (**Tabla 2** y **Apéndice E**) que servirá para comparación con resultados de futuras investigaciones.

Los alcaloides más representativos encontrados en las especies de *Crotalaria* fueron la monocrotalina, crotaleschenina, integerrimina, usaramina y sus *N*-óxidos. Estos alcaloides se habían reportado previamente en semillas de especies de *Crotalaria* de Australia (Fletcher y col., 2009), Etiopía (Asres y col., 2004) y Brasil (Flores y col., 2009). Sin embargo, no se había reportado un estudio de la distribución y composición de los PA en raíces, hojas, flores y semillas de especies de *Crotalaria*. El presente estudio reveló que el contenido de los PA en semillas fue más alto para *C. retusa*, seguido de *C. spectabilis* y luego, en este orden: *C. nitens* > *C. incana* > *C. pallida* = *C. maypurensis*. En general, las especies de *C. retusa*, *C. spectabilis* tenían PA de tipo retronecina cíclicos de 11 miembros (*e.g.*, monocrotalina), en las especies *C. incana*, *C. pallida* y *C. maypurensis* habían PA tipo retronecina cíclicos de 12 miembros (*e.g.*, usaramina, integerrimina), mientras que la especie *C. nitens* tenía monocrotalina, crotaleschenina e integerrimina al mismo tiempo. Esta quimiotaxonomía sería interesante comparar con datos genéticos en el futuro. Los resultados de los análisis mostraron que las semillas de *Crotalaria* contenían la mayor concentración de PA, seguida de flores, raíces y hojas. Los resultados concordaron con los reportados previamente (Hartmann y Zimmer, 1986; Hartmann y col., 1989)

para *Senecio vernalis* y *S. vulgaris* (Asteraceae). Estas plantas acumulan PA, fundamentalmente, en sus partes reproductivas para protegerse de los herbívoros y asegurar su progenie (Trigo, 2011). Sin embargo, en la presente investigación se encontró que las especies con presencia de nectarios extraflorales (*C. maypurensis*, *C. pallida* y *C. incana*) (Guimarãs y col., 2006), mostraron un contenido de PA más bajo en las flores en comparación con las especies que no los tenían (*C. nitens*, *C. retusa* y *C. spectabilis*). La presencia de nectarios en las plantas es un mecanismo de defensa indirecta de las plantas. La solución azucarada que secreta el nectario atrae insectos que defienden a la planta de posibles herbívoros. Se presume que la baja concentración de PA en las flores de las especies de *Crotalaria* con nectarios extraflorales disminuye la toxicidad de las secreciones y favorece la presencia de los insectos benéficos como las hormigas que repelen a insectos herbívoros (Magalhães y col., 2017).

En otro aspecto, la mayor diversidad de estructuras de PA en las especies de *Crotalaria* estuvo presente en las raíces, comparado la de las hojas, flores o semillas. Según los estudios realizados en *Senecio vulgaris* (Hartmann y col., 1989), las raíces fueron el sitio de la biosíntesis de los PA, que luego se traslocaron a las hojas e inflorescencias. Las flores, hojas y raíces, presentaron principalmente los PA forma de sus *N*-óxidos. Los resultados en las especies de *Crotalaria* concordaron con lo reportado (Frölich y col., 2007) para algunas especies de la familia Boraginaceae. En contraste, las semillas contenían principalmente las formas libres de los PA (98–100%), lo que concordó con los resultados previos para la especie africana *C. scassellatii* (Toppel y col., 1988). El mismo trabajo mostró que los PA libres se oxidan rápidamente a los *N*-óxidos, cuando se germinaban las semillas (Toppel y col., 1988). Aún se desconoce cual es la ventaja ecológica para las especies de *Crotalaria*, en transformar y acumular los PA de las semillas en forma libre o en forma de *N*-óxidos.

Las orugas de *U. ornatix* se alimentaron principalmente de hojas o semillas de las especies de *Crotalaria* y se ha reportado que, el insecto acumula y transforma los PA provenientes de la planta para su propio beneficio (Eisner, 1982; Trigo, 2011; Martins y col., 2015). Las polillas cuyas orugas se alimentaron con altas concentraciones de PA, se defienden mejor del ataque de depredadores (Martins y col., 2015) y, por lo tanto, las orugas prefirieron plantas con altas concentraciones de estos alcaloides (Hoina y col., 2013). Los resultados de los experimentos de esta investigación, mostraron que las polillas, al contrario de las orugas, prefirieron poner los huevos bajo las hojas de especies de *C. pallida* o *C. incana* con menor contenido de los PA en hojas o semillas en comparación con *C. retusa* y *C. nitens*. Se esperaba que las polillas pusieran sus huevos en plantas con mayor contenido de los PA, así, su descendencia tendría una mayor concentración de PA y mejor defensa química, como sucede con las mariposas monarcas (*Danaus plexippus* L.) infectadas con un parásito (Lefèvre y col., 2012). Las hembras adultas monarcas prefirieron poner sus huevos en plantas tropicales *Asclepias curassavica* con mayor contenido de cardenólidos que disminuían la afectación del parásito en sus crías. Los resultados evidenciaron que puede haber otros factores que influenciaron la decisión de la polilla *U. ornatix*, algunos de ellos como mayor sensibilidad para detectar los PA en la planta o mayor la calidad nutricional del alimento, entre muchos otros.

Las orugas resultantes, eclosionadas de los huevos provenientes del anterior experimento, se alimentaron con hojas o semillas de las cuatro especies de *Crotalaria*; el peso de las orugas alimentadas con *C. incana* y *C. pallida* fue mayor que el de las que se alimentaron con *C. nitens* o *C. retusa*. Esto concuerda con los reportes de Cogni y col. (2012), quienes encontraron que, en condiciones de campo, las polillas *U. ornatix* prefirieron a la especie *C. pallida* como su plana huésped. Aunque hubo menor concentración de PA en las hojas/semillas de *C. pallida* o de *C.*

*incana*, los resultados del presente estudio mostraron que las orugas se desarrollaron mejor en estas dos especies. Al parecer, la baja concentración de PA en las plantas hospederas no fue un problema para las especies de insectos que acumulan PA en sus tejidos, *e.g.*, las orugas de *Estigmene acrea* tienen receptores altamente sensibles a los alcaloides y pueden detectar concentraciones de  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  M de PA en el alimento (Bernays y col., 2002). Se desconoce aún, que otros factores estimularon a las polillas *U. ornatix* para preferir poner sus huevos en las hojas de las especies de *C. pallida* o de *C. incana* con menor concentración de alcaloides en las hojas y se necesitan más experimentos para averiguarlo.

Las especies de *Crotalaria* usadas como alimento tenían diferente composición de alcaloides. *C. retusa* y *C. nitens* contenían PA cíclicos de 11 miembros, mientras que *C. incana* y *C. pallida* presentaban alcaloides cíclicos de 12 miembros y otros alcaloides no esterificados como laburnina y macronecina. Se evaluó si la acumulación y transformación de PA en varias etapas del ciclo de *U. ornatix* estaban influenciadas por la diversidad química de los PA suministrados a las orugas. Los resultados mostraron que las orugas acumularon los PA provenientes de su alimento, los transformaron y transfirieron durante todas las etapas del ciclo de vida de *U. ornatix*, casi exclusivamente en forma de *N*-óxidos. Las polillas *U. ornatix* provenientes de orugas que se alimentaron con semillas de *Crotalaria* spp. acumularon más PA en comparación con orugas alimentadas con hojas. Los resultados concordaron con los estudios realizados por Hartmann y col. (2005a y 2005b), quienes mostraron que las orugas *E. acrea* y *G. geneura* alimentadas con diferentes fuentes de PA, acumularon, transformaron y transmitieron los PA durante las etapas de la vida del insecto. La acumulación de los PA en insectos adaptados a su consumo, ocurre por la acción de una enzima específica que cataliza la conversión de la base libre a sus respectivos *N*-óxidos, según se reportó para *T. jacobaeae*, *C. transiens* y *Arctia caja*

(Lindigkeit y col., 1997). Los estudios realizados Eisner (1982) y por Martins y col. (2015), demostraron que la acumulación de los PA en *U. ornatix* es un mecanismo de defensa contra depredadores naturales como la araña *N. clavipes*.

El análisis por LC-MS de las orugas, polillas y sus huevos, no solo reveló la presencia de los PA provenientes de la fuente de alimento, sino que también mostró algunos PA transformados por el insecto, tales como, la creatonotina A, creatonotina B, *iso*-creatonotina B, callimorfinas y dos estructuras no reportadas previamente. Los dos nuevos PA fueron derivados de la macronecina y laburnina que, según los datos experimentales de los perfiles de fragmentación ESI(+)-MS, están esterificados con el ácido 2-hidroxi-3-metilpentanoico, el mismo ácido necínico de la creatonotina B. La confirmación definitiva de sus estructuras no hizo parte de la presente investigación y queda pendiente para futuros trabajos. Previamente, se habían reportado creatonotinas en el único trabajo con *U. ornatix* reportado por Martins y col. (2015). Las creatonotinas se encontraron inicialmente en *Creatonotos transiens* (Hartmann y col., 1990), mientras que las callimorfinas, en *T. jacobaeae* (Aplin y col., 1968). Otras especies, como la *E. acrea* transforma los PA exclusivamente a creatonotinas (Hartmann y col., 2005b) y las polillas de *G. geneura* a creatonotinas y callimorfinas simultáneamente (Hartmann y col., 2005a). El presente trabajo encontró que los adultos *U. ornatix* cuyas orugas se alimentaron con hojas o semillas de *C. nitens* o *C. retusa* modificaron entre el 5% y 55% de los PA adquiridos de la planta, la mayoría correspondían a creatonotinas y pequeñas cantidades de callimorfina en las polillas y sus huevos.

Los dos nuevos PA se encontraron en las polillas provenientes de orugas alimentadas con hojas o semillas de *C. incana* o *C. pallida*. Los derivados de la laburnina y macronecina, junto con pequeñas cantidades de creatonotinas, correspondieron entre el 26% y el 78% del total de los

PA en la polilla. De manera similar a otros insectos especializadas, los PA tienen una doble función: protección química contra depredadores y precursores de feromonas sexuales (Hartmann y col., 2003). Los alcaloides 1,2-saturados (laburnina y macronecina) no son tóxicos, pero se han reportado como intermediarios en la síntesis de feromonas en *E. acrea*, así como los alcaloides 1,2-insaturados tipo retronecina (creatonotinas y callimorfina) (Hartmann y col., 2005b). La transformación de los PA 1,2-saturados no se había reportado en *U. ornatix*, por lo que su rol en la defensa química o síntesis de feromonas queda para otras investigaciones. Sin embargo, si las orugas *U. ornatix* consumen, acumulan, mantienen y transforman los PA 1,2-saturados presentes en *C. pallida*, es probable que estos derivados biosintéticos en el insecto tengan mucha importancia para varios aspectos ecológicos del mismo.

En la presente investigación, se observó que las polillas segregaban una espuma blanca-amarilla en la parte lateral anterior del tórax. El interés por estudiar el contenido y composición de PA en la espuma surgió porque, en una ocasión, un individuo de *Phyllodactylus* sp. (nombre común: salamaqueja) atrapó una polilla que se había escapado del mariposario, pero la salamaqueja la liberó de manera inmediata (observación personal del autor), posiblemente por la acción de la espuma repleta de alcaloides tóxicos que proporcionaron una advertencia al depredador. Los resultados mostraron que, independiente de la fuente de alimento, la espuma contenía mucho más PA que en la polilla misma, entre 2 y 6 veces (**Figura 32**). La composición química de los PA de la espuma fue similar a la del insecto que la segregó, se encontraron tanto los PA provenientes de la fuente de alimento, como los que transformó la polilla. La presencia de la espuma en *U. ornatix* ya se había reportado por Eisner y Meinwald (1995), donde describieron la secreción de la espuma como una forma de defensa del insecto. González y col. (1999) reportaron que contenía monocrotalina cuando las orugas se alimentaron con *C.*

*spectabilis*. Los resultados del presente estudio demostraron que la polilla segregó la espuma como mecanismo de defensa incrementando la concentración de PA tóxicos que repelen eficazmente a sus agresores.

La acumulación de los PA por parte de las orugas *U. ornatix* provenientes de hojas o semillas de especies de *Crotalaria* no tiene ningún efecto negativo en el insecto (Cogni y col., 2012). Sin embargo, no se ha estudiado si las plantas de *Crotalaria* spp. tienen mecanismos para defenderse del ataque de este insecto especializado. Los resultados mostraron que las hojas de *C. nitens* no cambian la composición de PA, pero emiten una gama de compuestos orgánicos volátiles cuando las orugas *U. ornatix* atacaron sus hojas. Los alcaloides más importantes en las hojas de *C. nitens* fueron la monocrotalina, crotaleschenina, integerrimina y sus *N*-óxidos, su concentración no cambió en plantas de *C. nitens* atacadas por orugas *U. ornatix* después de 2, 6, 10, 24, 48 h o 12 días, en comparación con la de las plantas no atacadas (control). En contraste, se observó una disminución significativa de la concentración de PA en las raíces de las plantas de *C. nitens* que recibieron el ataque de *U. ornatix* durante 12 días, en comparación con la del control. La reducción en la concentración de los PA en las raíces posiblemente se debió a la defoliación inclemente que recibieron las plantas de *C. nitens* por el ataque prolongado de las orugas. Los resultados concordaron con los reportados por Hol y col. (2004), quienes observaron que en las hojas de *Jacobaea vulgaris* (Asteraceae) atacadas por orugas *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), no modificó la concentración de PA con respecto a la del control, mientras que su contenido en las raíces sí disminuyó.

La falta de defensa directa con PA por parte de las plantas de *C. nitens* al ataque de las orugas *U. ornatix*, posiblemente, se debe a la capacidad de la planta para reconocer el atacante. Un incremento en la concentración de alcaloides tóxicos no resultaría efectivo contra los

herbívoros especializados y, por el contrario, las orugas *U. ornatix* se favorecerían con el incremento del contenido de PA en los tejidos de *C. nitens*. Sin embargo, los niveles de alcaloides no pueden bajar demasiado, porque la planta necesita enfrentar el ataque de los otros insectos no especializados que sí se ven afectados negativamente por los PA (Trigo, 2011). Este mismo comportamiento se registró en *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Los alcaloides tropánicos no cambiaron de concentración cuando la planta recibió el ataque de las orugas *Placidina euryanassa* (Lepidoptera: Nymphalidae). Las ramas de *B. suaveolens* produjeron más brotes en vez de sintetizar más alcaloides (Arab y Trigo, 2011). En general, la evolución les ha dado a las plantas un mecanismo fino para mantener un balance con relación a las concentraciones de toxinas; por un parte, sintetizar lo suficiente para defenderse de los herbívoros generalistas, pero por otra parte, no incrementar demasiado su concentración, lo cual se traduce en un elevado costo energético y atracción los herbívoros especializados.

La defensa directa con PA en *C. nitens* no tuvo efecto sobre las orugas *U. ornatix*. Sin embargo, las plantas tienen otros mecanismos indirectos para lidiar con los atacantes (Mithöfer y col., 2009). Los resultados mostraron que las hojas de *C. nitens* liberaron una mezcla de volátiles en respuesta al ataque de orugas *U. ornatix*. Los primeros en aparecer fueron los GLV (*cis*-3-hexenal, *cis*-3-hexenol y acetato de *cis*-3-hexenilo) y, posteriormente, los terpenoides *trans*- $\beta$ -ocimeno, linalool, *trans*- $\beta$ -cariofileo,  $\alpha$ -humuleno, *trans*, *trans*- $\alpha$ -farneseno y *trans*-neronidol; el homoterpeno DMNT; las 2-metil-propil- y 2-metil-butil-aldoximas y los compuestos aromáticos, salicilato de metilo, antranilato de metilo e indol. Las hojas de *C. nitens*, con daño mecánico (bisturí), emitieron grandes cantidades de GLV, pero luego, las emisiones de terpenos y aldoximas prácticamente cesaron y no se detectó ningún compuesto aromático en comparación con el daño causado por el insecto. Este resultado indica claramente que la mordida de las orugas

de *U. ornatix* fue la responsable de generar una respuesta específica en las hojas de *C. nitens* y no fue solamente el daño mecánico. La planta de *C. nitens* reconoció el atacante y generó una serie de reacciones bioquímicas que indujeron la liberación de los volátiles (Mithöfer y col., 2009). La inducción de respuesta en la planta por el insecto se había reportado previamente. Las orugas *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) contienen volicitina, un derivado del ácido linolénico, responsable de inducir la emisión de los HIPV en las hojas de maíz (Alborn y col., 1997). Queda por determinar si la inducción de HIPV en *C. nitens* se pudo generar por ciertos compuestos químicos, enzimas o microorganismos provienen de la saliva de las orugas *U. ornatix* o por otros factores.

Todos los compuestos liberados por las hojas de *C. nitens* habían sido reportados previamente como volátiles inducidos por herbivoría en otras plantas (McCormick y col., 2014). Algunos, pueden repeler directamente los herbívoros y otros llevan mensajes para atraer a enemigos naturales del atacante (Mithöfer y col., 2009). Los primeros HIPV en aparecer ante el ataque de las hojas de *C. nitens* fueron los GLV. Estos predominaron durante los primeros minutos del ataque de la oruga o el daño mecánico. Los GLV son la primera línea de respuesta de las plantas frente el daño en las hojas (Scala y col., 2013) y se han reportado anteriormente en plántulas de maíz (Turlings y col., 1990; Erb y col., 2015), *A. thaliana* (D'Auria y col., 2007), algodón (Loughrin y col., 1995) y álamo negro (*Populus nigra*) (McCormick y col., 2019), entre otros. Los GLV tienen funciones ecológicas como atraer o repeler insectos (Wei y Kang, 2011), *e.g.* se demostró que el acetato de *cis*-3-hexenilo pueden incrementar las defensas a la herbivoría en el maíz (Hu y col., 2019) e inducir la activación de genes de defensa en el álamo negro (Frost y col., 2008). Scala y col. (2013) revisaron con detalle las funciones de los GLV en las interacciones de las plantas con herbívoros y patógenos.

Cuando se retiraron las orugas de las hojas de *C. nitens* y cesó el ataque, se observó que los GLV disminuyeron y se inició la liberación de los terpenoides, el DMNT, las aldoximas y los compuestos aromáticos, con un máximo de emisión a las 6 h después del inicio del ataque. Se sabe que los HIPV emitidos por la planta alteran el comportamiento de otros insectos (El-Sayed y col., 2016; Sokame y col., 2019). En el presente trabajo, la mezcla de los HIPV emitidos por las hojas de *C. nitens* después del ataque de las orugas, redujo significativamente la oviposición de las polillas *U. ornatix* en plantas atacadas. La capacidad de las polillas para detectar y evitar la oviposición en plantas con daño podría tener varios beneficios al insecto. Por un lado, la reducción en la competencia por los recursos alimenticios de su futura descendencia, por otro, la disminución de la probabilidad de encontrar enemigos naturales del herbívoro atraídos por la mezcla de los volátiles (De Moraes y col., 2001). Los resultados del presente estudio fueron similares a los reportados por Kessler y Baldwin (2012), quienes observaron que las polillas *Manduca quinquemaculata* (Lepidoptera: Sphingidae) pusieron menos huevos en plantas de tabaco silvestres (*Nicotiana attenuata*) previamente atacadas. Lo mismo sucedió con los volátiles de las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que repelieron las polillas *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) (De Moraes y col., 2001).

Varios HIPV identificados en el presente trabajo han mostrado funciones ecológicas y se han visto involucrados en la interacción entre diferentes organismos, tanto en experimentos de campo y laboratorio. El *trans*- $\beta$ -cariofileno, liberado por las hojas de *C. nitens* en cantidades relativas de 13–20%, es muy importante en las interacciones ecológicas entre diferentes especies. Es responsable de repeler al insecto *B. fusca* en el sistema de atracción–repulsión en cultivos de maíz (Cook y col., 2007), también repele al insecto *Diaphorina citri*, vector de la diseminación de una bacteria en cultivos cítricos (Alquézar y col., 2017) o previene el crecimiento de bacterias

en flores y hojas de *A. thaliana* y es muy importante para atraer polinizadores (Huang y col., 2012). El linalool, *trans*- $\beta$ -ocimeno, el DMNT y el salicilato de metilo atraieron las hembras del ácaro (*Phytoseiulus persimilis*) depredador natural de otro ácaro (*Tetranychus urticae*), considerado plaga en plantas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) (Dicke y col., 1990). La emisión de DMNT indujo la activación de una enzima anti-herbivoría en plantas vecinas de *Ipomoea batatas* (Meents y col., 2019). Aunque *C. nitens* emitió pocas cantidades de *allo*-ocimeno, este compuesto ha mostrado propiedades antifúngicas contra el hongo *Botrytis cinerea* en *A. thaliana* (Kishimoto y col., 2006). El  $\alpha$ -humuleno redujo la capacidad de apareamiento de hembras y machos de *Ceratitis capitata*, una plaga de varios cultivos en el Mediterráneo (Shelly y Nishimoto, 2015) y, recientemente, se encontró que el *trans*-nerolidol induce resistencia contra herbívoros y patógenos en las plantas de té (Chen y col., 2020).

Las dos familias de HIPV más abundantes en las hojas de *C. nitens* fueron los GLV y los terpenos. Sin embargo, *C. nitens* también emitió 2-metil-propil-aldoxima y 3-metil-butil-aldoxima en cantidades relativas de 9–11%. Las aldoximas son compuestos de tipo imina derivados de aminoácidos que se han reportado en especies del género *Populus* (Salicaceae), cuando sucede el ataque de herbívoros (Irmisch y col., 2013). Son precursores de nitrilos volátiles en *P. trichocarpa* con actividad repelente contra las orugas de la polilla *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae) (Irmisch y col., 2014). Las 2- y 3-metil-butil-aldoximas participaron en la defensa indirecta contra herbívoros, atrayendo las avispas *Glyptapantheles liparidis*, enemigos naturales de las orugas *L. dispar* en árboles de *P. nigra* (McCormick y col., 2014). En relación a los compuestos aromáticos, las hojas de *C. nitens* emitieron principalmente indol y, en pocas proporciones, salicilato y antranilato de metilo. Otros estudios encontraron que el salicilato de metilo mejoró el crecimiento de *Lecanicillium lecanii*, un hongo entomopatógeno,

enemigo natural del áfido *Lipaphis erysimi* (Lin y col., 2017). El antranilato de metilo, un volátil natural de la fresa, redujo el crecimiento de hongos que afecta negativamente la vida útil del fruto (Chambers y col., 2013). Finalmente, el indol emitido como respuesta del ataque de *S. littoralis* en hojas de maíz, estuvo involucrado en la comunicación planta-planta. El indol indujo la emisión de volátiles (GLV y terpenoides) dentro de la misma planta y en plantas vecinas que las preparó para futuros ataques de las orugas *S. littoralis* (Erb y col., 2015).

En general, las hojas de *C. nitens* liberaron una mezcla de volátiles en respuesta a la herbivoría de las orugas *U. ornatrix*, los cuales funcionaron como señales de alarma para las polillas *U. ornatrix*. Determinar el compuesto, o grupo de compuestos responsables de llevar la señal queda podría ser el tema de futuras pesquisas que involucrarían el uso de electroantenografía. En general, los HIPV son importantes en las interacciones de las plantas con otros organismos. Tienen potenciales aplicaciones en la agricultura, particularmente en la repelencia de insectos plaga o atracción de enemigos naturales de los herbívoros para el control biológico.

## 5 Conclusiones

La extracción MSPD y el análisis de la información cromatográfica y espectrométrica obtenida por GC-MS y por UHPLC-ESI(+)-HRMS permitió la identificación de 45 alcaloides pirrolizidínicos (PA) en plantas de *Crotalaria retusa* L., *C. pallida* Aiton, *C. spectabilis* Roth, *C. incana* L., *C. maypurensis* Kunth, and *C. nitens* Kunth. Los PA no esterificados más representativos fueron la macronecina, laburnina y supinidina, los monoésteres de 9-tigloilretronecina y 9-senecioilretronecina y los diésteres cíclicos de monocrotalina, crotaleschenina, integerrimina y usaramina y sus *N*-óxidos. La interpretación de los espectros de masas de alta resolución (*Orbitrap*) junto con el análisis de las rutas de fragmentación de la retronecina, heliotrina y monocrotalina deuteradas, permitieron la identificación tentativamente de 14-hidroxi-monocrotalina, acetato de 12-crotaleschenina, acetato de 12-monocrotalina, acetato de 12-integerrimina, dihidrointegerrimina, un 9-monoéster tipo retronecina y otro tipo platinecina que no se habían reportado previamente en literatura. Se encontró que las semillas y las flores contenían mayor concentración de PA en comparación con la de las hojas y raíces. Mientras las formas libres de los PA se encontraron exclusivamente en las semillas, los *N*-óxidos fueron las principales estructuras presentes en las hojas, flores y raíces.

Las orugas *U. ornatix* acumularon los PA provenientes de las hojas y semillas inmaduras de *C. retusa*, *C. nitens*, *C. pallida* y *C. incana*. Los PA se transformaron y transfirieron durante todo el ciclo de vida de *U. ornatix*. Entre más alta la concentración de PA en la fuente de alimento de la oruga, mayor cantidad de los PA puede acumular y transferir a las polillas y, éstas, a sus huevos. La concentración más alta de los PA se encontró en la espuma segregada por la parte superior del tórax de la polilla. La espuma sirvió como mecanismo de defensa contra el ataque de arañas o salamanquejas. Las polillas transformaron químicamente los PA, según la

fuelle de alimento de la siguiente manera: las polillas, cuyas orugas se alimentaron con plantas que contenían PA tipo retronecina (*C. nitens* y *C. retusa*), los transformaron a creatonotina A, *iso*-creatonotina B, creatonotina B y pequeñas cantidades de callimorfina. Las creatonotinas y callimorfinas son intermediarios en la síntesis de la feromona hidroxidanaidal, que la polilla usa para el cortejo. Cuando las orugas consumieron *C. pallida* o *C. incana* ricos en alcaloides tipo macronecina o laburnina, las polillas los usaron para sintetizar dos nuevos derivados no reportados en literatura. Estos dos PA se identificaron tentativamente como ésteres del ácido 2-hidroxi-3-metilpentanoico derivados con las bases macronecina y laburnina. Es necesario aislarlos para para confirmar sus estructuras químicas completamente, usando la espectroscopia de RMN.

Las plantas de *C. nitens* reconocieron y respondieron al ataque de las orugas *U. ornatix* emitiendo una mezcla de volátiles. Las hojas de *C. nitens* liberaron volátiles de hojas verdes (GLV) en la primera fase del ataque. Posterior al daño, la emisión de GLV se redujo drásticamente, mientras que incrementaron la emisión de terpenoides, el homoterpeno DMNT, las aldoximas y los compuestos aromáticos. Los HIPV modificaron el comportamiento de las polillas hembras de *U. ornatix*, reduciendo su oviposición en las plantas previamente atacadas. La mayoría de los volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens* tienen funciones ecológicas en otros modelos de interacción planta-insecto e incluso han estado involucrados en la comunicación planta-planta. La presente investigación aportó en la comprensión de los mecanismos asociados con la interacción entre plantas e insectos y la caracterización química de los compuestos involucrados. Los resultados demostraron la capacidad que tienen estos metabolitos secundarios (PA y volátiles) para modificar la conducta de los insectos. Se requieren más investigaciones para comprender las intrincadas interacciones químicas y ecológicas entre

las plantas, los herbívoros y otros organismos, que pueden ser aprovechados como herramientas ecológicas en una agricultura sostenible y amigable con el ambiente.

**Referencias bibliográficas**

- Aasen, A. J., Culvenor, C. C., Smith, L. W. (1969). Saturated pyrrolizidinediols. I. Spectral studies and the conversion of an ester of dihydroxyheliotridane into the (+)-enantiomer of hastanecine. *J. Org. Chem.*, 34, 4137–4143.
- Alborn, H. T., Turlings, T. C. J., Jones, T. H., Stenhagen, G., Loughrin, J. H., Tumlinson, J. H. (1997). An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276, 945–949.
- Alquézar, B., Volpe, H. X. L., Magnani, R. F., Pedreira, M., Almeida, M., Arno, N., Simoes, J., Postali, J., Bouwmeester, H., Peña, L. (2017).  $\beta$ -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacters*. *Sci. Rep.*, 7, 5639.
- Álvarez, A. T. (2003). Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloidales en plantas del género *Crotalaria* y alimento contaminado para aves, Tesis de Maestr a, Universidad Industrial de Santander, 129 p.
- Aplin, R. T., Benn, M. H., Rothschild, M. (1968). Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). *Nature*, 219, 747–748.
- Arab, A., Trigo, J. R. (2011). Host plant invests in growth rather than chemical defense when attacked by a specialist herbivore. *J. Chem. Ecol.*, 37, 492–495.
- Asres, K., Sporer, F., Wink, M. (2004). Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, 32, 915–930.
- Avula, B., Sagi, S., Wang, Y. H., Zweigenbaum, J., Wang, M., Khan, I. A. (2015). Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and *N*-oxides from botanicals

- and dietary supplements using UHPLC–high resolution mass spectrometry. *Food Chem.*, 178, 136–148.
- Babikova, Z., Gilbert, L., Bruce, T. J., Birkett, M., Caulfield, J. C., Woodcock, C., Johnson, D. (2013). Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecol. Lett.*, 16, 835–843.
- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., Zenkevich, I. G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 40, 043101.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Kessler, A., Schittko, U. (2001). Merging molecular and ecological approaches in plant–insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 351–358.
- Ballhorn, D. J., Kautz, S., Lion, U., Heil, M. (2008). Trade–offs between direct and indirect defences of lima bean (*Phaseolus lunatus*). *J. Ecol.*, 96, 971–980.
- Barbosa, M. O., Almeida–Cortez, J. S., Silva, S. I., Oliveira, A. F. M. (2014). Seed oil content and fatty acid composition from different populations of *Calotropis procera* (Aiton) WT Aiton (Apocynaceae). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91, 1433–1441.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 151–162.
- Barker, S. A., Long, A. R., Short, C. R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr. A*, 475, 353–361.
- Bernal, H. Y. (1986). *Crotalaria* L. (Fabaceae). Flora de Colombia, Monografía No 4. Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 119 p.
- Bernal, H. Y. (1986). Flora de Colombia: 4. *Crotalaria*. Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá, p. 118.

- Bernays, E., Chapman, R., Hartmann, T. (2002). A highly sensitive taste receptor cell for pyrrolizidine alkaloids in the lateral galeal sensillum of a polyphagous caterpillar, *Estigmene acraea*. *J. Comp. Physiol. A*, 188, 715–723.
- Beuerle, T., Theuring, C., Klewer, N., Schulz, S., Hartmann, T. (2007). Absolute configuration of the creatonotines and callimorphines, two classes of arctiid-specific pyrrolizidine alkaloids. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, 80–89.
- Borges, E. D. O., Martins, C. B., da Silva, R. R., Zarbin, P. H. (2018). Terpenoids dominate the bouquet of volatile organic compounds produced by *Passiflora edulis* in response to herbivory by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Arthropod–Plant Inte.*, 12, 123–131.
- Bouwmeester, H., Schuurink, R. C., Bleeker, P. M., Schiestl, F. (2019). The role of volatiles in plant communication. *Plant J.*, 100, 892–907.
- Brkić, K., Radulović, M., Sladonja, B., Lukić, I., Šetić, E. (2006). Application of Soxtec apparatus for oil content determination in olive fruit. *Riv. Ital. Sostanze Gr.*, 83, 115–119.
- Buttery, R. G., Light, D. M., Nam, Y., Merrill, G. B., and Roitman, J. N. (2000). Volatile components of green walnut husks. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2858–2861.
- Carnevale Neto, F., Andréo, M. A., Raftery, D., Callegari, J. L., Pepporine, N., Castro–Gamboa, I., Lameiro, B. H., Vilaça, E., Vessecchi, R. (2019). Characterization of aporphine alkaloids by electrospray ionization tandem mass spectrometry and density functional theory calculations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Special Issue, doi: 10.1002/rcm.8533
- Carpinelli de Jesus, M., Hungerford, N., Carter, S., Anuj, S., Blanchfield, J., De Voss, J., Fletcher, M. (2019). Pyrrolizidine alkaloids of blue heliotrope (*Heliotropium*

- amplexicaule*) and their presence in Australian honey. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 7995–8006.
- Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy*, 9, 685–692.
- Castells, E., Mulder, P. P. J., Pérez-Trujillo, M. (2014). Diversity of pyrrolizidine alkaloids in native and invasive *Senecio pterophorus* (Asteraceae): implications for toxicity. *Phytochemistry*, 108, 137–146.
- Chambers, A. H., Evans, S. A., Folta, K. M. (2013). Methyl anthranilate and  $\gamma$ -decalactone inhibit strawberry pathogen growth and achene germination. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 12625–12633.
- Chen, S., Zhang, L., Cai, X., Li, X., Bian, L., Luo, Z., Li, Z., Chen, Z., Xin, Z. (2020). (*E*)-Nerolidol is a volatile signal that induces defenses against insects and pathogens in tea plants. *Hortic. Res.*, 7, 52.
- Chen, T., Mei, N., Fu, P. P. (2010). Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J. Appl. Toxicol.*, 30, 183–196.
- Chowdhury, A. R., Banerji, R. (1995). Studies on leguminous seeds. *Fat. Sci. Technol.*, 97, 457–458.
- Clarke, C. A., Cronin, A., Francke, W., Philipp, P., Pickett, J. A., Wadhams, L. J., Woodcock, C. M. (1996). Mating attempts between the ccarlet tiger moth, *Callimorpha dominula* L., and the cinnabar moth, *Tyria jacobaeae* L. (Lepidoptera: Arctiidae), involve a common sex pheromone composition. *Experientia*, 52, 636–638.

- Cogni, R., Trigo, J. R. (2016). Pyrrolizidine alkaloids negatively affect a generalist herbivore feeding on the chemically protected legume *Crotalaria pallida*. *Neotrop. Entomol.*, 45, 252–257.
- Cogni, R., Trigo, J. R., Futuyma, D. J. (2012). A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Mol. Ecol.*, 21, 6152–6162.
- Colegate, S. M., Edgar, J. A., Knill, A. M., Lee, S. T. (2005). Solid-phase extraction and HPLC–MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides: a case study of *Echium plantagineum*. *Phytochem. Anal.*, 16, 108–119.
- Cook, S. M., Khan, Z. R., Pickett, J. A. (2007). The use of push–pull strategies in integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 375–400.
- Crews, C., Berthiller, F., Krska, R. (2010). Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 327–338.
- Crews, C., Driffield, M., Berthiller, F., Krska, R. (2009). Loss of pyrrolizidine alkaloids on decomposition of ragwort (*Senecio jacobaea*) as measured by LC–TOF–MS. *J. Agric. Food. Chem.*, 57, 3669–3673.
- Crist, E., Mora, C., Engelman, R. (2017). The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science*, 356, 260–264.
- Culvenor, C. C, Smith, L. W. (1957). The alkaloids of *Crotalaria retusa* L. *Aust. J. Chem.*, 10, 464–473.
- Culvenor, C. C., Sawhney, R. S., Smith, L. W. (1968). The alkaloids of *Crotalaria maypurensis* H.B. & K. *Aust. J. Chem.*, 21, 2135–2136.

- Culvenor, C. C., Smith, L.W. (1957). The alkaloids of *Crotalaria spectabilis* Roth. *Aust. J. Chem.*, 10, 474–479.
- D'Auria, J. C., Pichersky, E., Schaub, A., Hansel, A., Gershenzon, J. (2007). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 49, 194–207.
- Das, A., Lee, S. H., Hyun, T. K., Kim, S. W., Kim, J. Y. (2013). Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnol. Rep.*, 7, 9–26.
- De Lange, E. S., Laplanche, D., Guo, H., Xu, W., Vlimant, M., Erb, M., Jurriaan, T., Turlings, T. C. (2020). *Spodoptera frugiperda* caterpillars suppress herbivore-induced volatile emissions in maize. *J. Chem. Ecol.*, 46, 344–360.
- De Moraes, C. M., Mescher, M. C., Tumlinson, J. H. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, 410, 577–580.
- Devi, M., Solomon, E. K., Nivas, D., Chandru, S. (2013). Enhancement of soil fertility through agro inputs on response to cover crop of *Crotalaria juncea* L. In: Velu RK (Ed) Microbiological research in agroecosystem management (pp. 175–186). India: Springer.
- Dewick, P. M. (2009). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley, UK, p. 325.
- Diaz, G. (2015). Toxicosis by plant alkaloids in humans and animals in Colombia. *Toxins*, 7, 5408–5416.
- Diaz, G. J., Almeida, L. X., Gardner, D. R. (2014). Effects of dietary *Crotalaria pallida* seeds on the health and performance of laying hens and evaluation of residues in eggs. *Res. Vet. Sci.*, 97, 297–303.

- Dicke, M., Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends Plant Sci.*, 15, 167–175.
- Dicke, M., Van Beek, T. A., Posthumus, M. V., Dom, N. B., Van Bokhoven, H., De Groot, A. E. (1990). Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. *J. Chem. Ecol.*, 16, 381–396.
- Edgar, J. A., Culvenor, C. C. J., Cockrum, P. A., Smith, L. W., Rothschild, M. (1980). Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth "metabolite". *Tetrahedron Lett.*, 21, 1383–1384.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2017). Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA J.*, 15, e04908.
- Ehmke, A., Witte, L., Biller, A., Hartmann, T. (1990). Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae* L. *Z. Naturforsch C J. Biosci.*, 45, 1185–1192.
- Eisner, T. (1982). For love of nature: exploration and discovery at biological field stations. *BioScience*, 32, 321–326.
- Eisner, T., Meinwald, J. (1995). The chemistry of sexual selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 50–55.
- El-Sayed, A. M., Knight, A. L., Byers, J. A., Judd, G. J., Suckling, D. M. (2016). Caterpillar-induced plant volatiles attract conspecific adults in nature. *Sci. Rep.*, 6, 37555.
- El-Shazly, A., Wink, M. (2014). Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the boraginaceae structures, distribution, and biological properties. *Diversity*, 6, 188–282.

- Erb, M., Veyrat, N., Robert, C. A., Xu, H., Frey, M., Ton, J., Turlings, T. C. (2015). Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nat. Commun.*, 6, 6273.
- Fang, L., Xiong, A., Yang, X., Cheng, W., Yang, L., Wang, Z. (2014). Mass-spectrometry-directed analysis and purification of pyrrolizidine alkaloid *cis/trans* isomers in *Gynura japonica*. *J. Sep. Sci.*, 37, 2032–2038.
- Fatouros, N. E., Lucas-Barbosa, D., Weldegergis, B. T., Pashalidou, F. G., van Loon, J. J., Dicke, M., Huigens, M. E. (2012). Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels. *PLoS one*, 7, e43607.
- Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J. (2001). Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4818–4824.
- Ferro, V. G., Guimarães Jr, P. R., Trigo, J. R. (2006). Why do larvae of *Utetheisa ornatrix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. *Entomol. Exp. Appl.*, 121, 23–29.
- Fletcher, M. T., McKenzie, R. A., Blaney, B. J., Reichmann, K. G. (2009). Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* taxa from northern Australia: risk to grazing livestock. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 311–319.
- Flores, A. S., Tozzi, A. M., Trigo, J. R. (2009). Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.*, 37, 459–469.

- Frölich, C., Ober, D., Hartmann, T. (2007). Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochemistry*, 68, 1026–1037.
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Dervinis, C., Davis, J. M., Carlson, J. E., De Moraes, C. M. (2008). Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. *New Phytol.*, 180, 722–734.
- García-Barriga, H. (1992). Flora medicinal de Colombia, Tomo I. Segunda Edición, Editorial Tercer Mundo Editores: Bogotá.
- Gershenzon, J., Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.*, 3, 408–414.
- González, A., Rossini, C., Eisner, M., Eisner, T. (1999). Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 96, 5570–5574.
- Górnaś, P., Czubinski, J., Rudzińska, M., Grygier, A., Ying, Q., Chakradhari, S., Sahu, P. K., Mišina, I., Urvaka, E., Patel, K. S. (2019). Selected uncommon legumes as a source of essential fatty acids, tocopherols, tocotrienols, sterols, carotenoids, and squalene. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 74, 91–98.
- Guimarãs, P., Raimundo, R., Bottcher, C., Silva, R., Trigo, J. R. (2006). Extrafloral nectaries as a deterrent mechanism against seed predators in the chemically protected weed *Crotalaria pallida* (Leguminosae). *Austral Ecol.*, 31, 776–782.
- Hartmann, T. (1999). Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, 207, 483–495.

- Hartmann, T., Biller, A., Witte, L., Ernst, L., Boppré, M. (1990). Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). *Biochem. Syst. Ecol.*, 18, 549–554.
- Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U, von Borstel, K., Theuring, C. (1989). Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 177, 98–107.
- Hartmann, T., Theuring, C., Bernays, E. A. (2003). Are insect-synthesized retronecine esters (creatonotines) the precursors of the male courtship pheromone in the arctiid moth *Estigmene acraea*?. *J. Chem. Ecol.*, 29, 2603–2608.
- Hartmann, T., Theuring, C., Beuerle, T., Bernays, E. A., Singer, M. S. (2005a). Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35, 1083–1099.
- Hartmann, T., Theuring, C., Beuerle, T., Klewer, N., Schulz, S., Singer, M. S., Bernays, E. A. (2005b). Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acraea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35, 391–411.
- Hartmann, T., Witte, L. (1995). Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: Pelletier, S W. (Ed.), *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, (pp. 155–233). Oxford, U.K.: Pergamon.
- Hartmann, T., Zimmer, M. (1986). Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *J. Plant Physiol.*, 122, 67–80.

- He X., Xia Q., Wu Q., Tolleson W. H., Lin G., Fu P. P. (2019). Primary and secondary pyrrolic metabolites of pyrrolizidine alkaloids form DNA adducts in human A549 cells. *Toxicol. in Vitro*, 54, 286–294.
- Heil, M. (2014). Herbivore–induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytol.*, 204, 297–306.
- Hoina, A., Martins, C. H. Z., Trigo, J. R., Cogni, R. (2013). Preference for high concentrations of plant pyrrolizidine alkaloids in the specialist arctiid moth *Utetheisa ornatrix* depends on previous experience. *Arthropod–Plant Inte.*, 7, 169–175.
- Hol, W. G., Macel, M., van Veen, J. A., van der Meijden, E. (2004). Root damage and aboveground herbivory change concentration and composition of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio jacobaea*. *Basic Appl. Ecol.*, 5, 253–260.
- Hosamani, K. M., Ramesh, H. S. (2001). Unusual fatty acids from *Crotalaria striata* Syn. *Crotalaria mucronata* seed oil. *Ind. Crop. Prod.*, 14, 223–227.
- Hsieh, C. H., Chen, H. W., Lee, C. C., He, B. J., Yang, Y. C. (2015). Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Emilia sonchifolia* from Taiwan. *J. Food Compos. Anal.*, 42, 1–7.
- Hu, L., Ye, M., Erb, M. (2019). Integration of two herbivore–induced plant volatiles results in synergistic effects on plant defence and resistance. *Plant Cell Environ.*, 42, 959–971.
- Huang, M., Sanchez–Moreiras, A. M., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gershenzon, J., Tholl, D. (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)– $\beta$ –caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol.*, 193, 997–1008.

- Huber, M., Epping, J., Gronover, C. S., Fricke, J., Aziz, Z., Brillatz, T., Triebwasser–Freese, D. (2016). A latex metabolite benefits plant fitness under root herbivore attack. *PLoS Biol.*, 14, e1002332.
- Iijima, Y. (2014). Recent advances in the application of metabolomics to studies of biogenic volatile organic compounds (BVOC) produced by plant. *Metabolites*, 4, 699–721.
- Irmisch, S., Clavijo McCormick, A., Günther, J., Schmidt, A., Boeckler, G. A., Gershenzon, J., Unsicker, S., Köllner, T. G. (2014). Herbivore–induced poplar cytochrome P450 enzymes of the CYP 71 family convert aldoximes to nitriles which repel a generalist caterpillar. *Plant J.*, 80, 1095–1107.
- Irmisch, S., McCormick, A. C., Boeckler, G. A., Schmidt, A., Reichelt, M., Schneider, B., Block, K., Schnitzler, J., Gershenzon, L., Unsicker, S., Köllner, T. (2013). Two herbivore–induced cytochrome P450 enzymes CYP79D6 and CYP79D7 catalyze the formation of volatile aldoximes involved in poplar defense. *Plant Cell*, 25, 4737–4754.
- Kamel, A. M., Fouda, H. G., Brown, P. R., Munson, B. (2002). Mass spectral characterization of tetracyclines by electrospray ionization, H/D exchange, and multiple stage mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 13, 543–557.
- Kathirvel, P., Kumudha, P. (2012). Comparative analysis and nutritional assessment of raw seeds of *Crotalaria* species. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences (IJPAES)*, 2, 87–97.
- Kebarle, P., Verkerk, U. H. (2009). Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.*, 28, 898–917.

- Kessler, A., Baldwin, I. T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291, 2141–2144.
- Khan, Z., Midega, C. A. O., Hooper, A., and Pickett, J. (2016). Push–Pull: chemical ecology–based integrated pest management technology. *J. Chem. Ecol.* 42, 689–697.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., Takabayashi, J. (2006). Analysis of defensive responses activated by volatile *allo*-ocimene treatment in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67, 1520–1529.
- Knothe, G., Razon, L. F., Madulid, D. A., Ago, E. M., de Castro, M. E. (2016). Fatty acid profiles of some Fabaceae seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 93, 1007–1011.
- Ko, H. H., Weng, J. R., Tsao, L. T., Yen, M. H., Wang, J. P., Lin, C. N. (2004). Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1011–1014.
- Kostyukevich, Y., Acter, T., Zhrebker, A., Ahmed, A., Kim, S., Nikolaev, E. (2018). Hydrogen/deuterium exchange in mass spectrometry. *Mass Spec. Rev.*, 37, 811–853.
- Krasnoff, S. B., Roelofs, W. L. (1989). Quantitative and qualitative effects of larval diet on male scent secretions of *Estigmene acrea*, *Phragmatobia foliginosa*, and *Pyrrharctia isabella* (Lepidoptera: Arctiidae). *J. Chem. Ecol.*, 15, 1077–1093.
- L'Empereur, K. M., Li, Y., Stermitz, F. R., Crabtree, L. (1989). Pyrrolizidine alkaloids from *Hackelia californica* and *Gnophaela latipennis*, an *H. californica*-hosted arctiid moth. *J. Nat. Prod.*, 52, 360–366.

- Lefèvre, T., Chiang, A., Kelavkar, M., Li, H., Li, J., Lopez, C., Oliver, L., Potini, Y., Hunter, M., de Roode, J. C. (2012). Behavioural resistance against a protozoan parasite in the monarch butterfly. *J. Anim. Ecol.*, 81, 70–79.
- Lin, Y., Hussain, M., Avery, P. B., Qasim, M., Fang, D., Wang, L. (2016). Volatiles from plants induced by multiple aphid attacks promote conidial performance of *Lecanicillium lecanii*. *PloS One*, 11, e0151844.
- Lin, Y., Qasim, M., Hussain, M., Akutse, K. S., Avery, P. B., Dash, C. K., Wang, L. (2017). The herbivore-induced plant volatiles methyl salicylate and menthol positively affect growth and pathogenicity of entomopathogenic fungi. *Sci. Rep.*, 7, 40494.
- Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H. M., Boppré, M., Hartmann, T. (1997). The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur. J. Biochem.*, 245, 626–636.
- Liu, F., Wan, S. Y., Jiang, Z., Li, S. F., Ong, E. S., Castaño-Osorio, J. C. (2009). Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 80, 916–923.
- Loos, M., Gerber, C., Corona, F., Hollender, J., Singer, H. (2015). Accelerated isotope fine structure calculation using pruned transition trees. *Anal. Chem.*, 87, 5738–5744.
- Loughrin, J. H., Manukian, A., Heath, R. R., Tumlinson, J. H. (1995). Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *J. Chem. Ecol.*, 21, 1217–1227.

- Ma, C., Liu, Y., Zhu, L., Ji, H., Song, X., Guo, H., Yi, T. (2018). Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: A critical review of recent research. *Food Chem. Toxicol.*, 119, 50–60.
- Ma, J., Xia, Q., Fu, P. P., Lin, G. (2018). Pyrrole–protein adducts–A biomarker of pyrrolizidine alkaloid–induced hepatotoxicity. *J. Food Drug Anal.*, 26, 965–972.
- Macel, M. (2011). Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant–insect interactions. *Phytochem. Rev.*, 10, 75–82.
- Maffei, M. E., Gertsch, J., Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1359–1380.
- Maffei, M. E., Mithöfer, A., Boland, W. (2007). Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68, 2946–2959.
- Magalhães, A. E., Martins, C. H. Z., Verçosa, D., Massuda, K. F., Trigo, J. R. (2017). Ants visiting extrafloral nectaries and pyrrolizidine alkaloids may shape how a specialist herbivore feeds on its host plants. *Arthropod–Plant Interactions*, 11, 629–639.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. In: Hakeem, K., Akhtar, M., Abdullah, S. (Eds), *Plant, Soil and Microbes*, (pp. 253–269). Cham, Switzerland: Springer.
- Martins, C. H. Z., Cunha, B. P., Solferini, V. N., Trigo, J. R. (2015). Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical–defense effectiveness of a specialist herbivore. *PloS One*, 10, e0141480.

- Materić, D., Bruhn, D., Turner, C., Morgan, G., Mason, N., Gauci, V. (2015). Methods in plant foliar volatile organic compounds research. *Appl. Plant Sci.*, 3, 1500044.
- Mattocks, A. R. (1968). Anacrotine, from *Crotalaria incana*. *J. Chem. Soc. (C)*, 3, 235–237.
- Mazlan, N. W., Said, I. M. (2011). Physico–chemical properties of the oils and fat from *Crotalaria cleomifolia* seeds. *Sains Malaysiana*, 40, 1037–1041.
- McCormick, A. C., Irmisch, S., Boeckler, G. A., Gershenzon, J., Köllner, T. G., Unsicker, S. B. (2019). Herbivore–induced volatile emission from old–growth black poplar trees under field conditions. *Sci. Rep.*, 9, 7714.
- McCormick, A., Gershenzon, J., Unsicker, S. B. (2014). Little peaks with big effects: establishing the role of minor plant volatiles in plant–insect interactions. *Plant Cell Envir.*, 37, 1836–1844.
- McCormick, A., Irmisch, S., Reinecke, A., Boeckler, G. A., Veit, D., Reichelt, M., Hansson, B., Gershenzon, J., Köllner, T., Unsicker, S. B. (2014). Herbivore–induced volatile emission in black poplar: regulation and role in attracting herbivore enemies. *Plant Cell Envir.*, 37, 1909–1923.
- Meents, A. K., Chen, S. P., Reichelt, M., Lu, H. H., Bartram, S., Yeh, K. W., Mithöfer, A. (2019). Volatile DMNT systemically induces jasmonate–independent direct anti–herbivore defense in leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants. *Sci. Rep.*, 9, 17431.
- Mithöfer, A., Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 63, 431–450.

Mithöfer, A., Boland, W., Maffei, M. E. (2009). Chemical Ecology of plant–insect interactions.

In: Parker, J. (Ed.), *Annual Plant Reviews, Molecular Aspects of Plant Disease Resistance*, (pp. 261–291). Oxford, United Kingdom: Wiley–Blackwell.

Modesto–Costa, L., Martinez, S., Pinto, A., Vessecchi, R., Borges Jr., I. (2018). Elucidating the mass spectrum of the retronecine alkaloid using DFT calculations. *J. Mass Spectrom.*, 53, 934–941.

Mroczek, T., Widelski, J., Gowniak, K. (2006). Optimization of extraction of pyrrolizidine alkaloids from plant material. *Chem. Anal.*, 51, 567–580.

Mulder, P. P., López, P., Castelari, M., Bodi, D., Ronczka, S., Preiss–Weigert, A., These, A. (2018). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal–and plant–derived food: results of a survey across Europe. *Food Addit. Contam. A*, 35, 118–133.

Mutyambai, D., Bass, E., Luttermoser, T., Poveda, K., Midega, C. A., Khan, Z. R., Kessler, A. (2019). More than ‘Push’ and ‘Pull’? Plant–soil feedbacks of maize companion cropping increase chemical plant defenses against herbivores. *Front. Ecol. Evol.*, 7, 217.

Nardin, T., Piasentier, E., Barnaba, C., Larcher, R. (2016). Targeted and untargeted profiling of alkaloids in herbal extracts using online solid–phase extraction and high–resolution mass spectrometry (Q–Orbitrap). *J. Mass Spectrom.*, 51, 729–741.

Neal, W. M., Rusoff, L. L., Ahmann, C. F. (1935). The isolation and some properties of an alkaloid from *Crotalaria spectabilis* Roth. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 2560–2561.

Neuner–Jehle, N., Nesvadba, H., Spitteller, G. (1965). Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt.: Pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. *Monatshefte für Chemie*, 96, 321–338.

- Niu, X., Luo, J., Xu, D., Zou, H., Kong, L. (2017). Hydrogen/deuterium exchange, a unique and effective method for MS fragmentation behavior elucidation of ginkgolides and its application to systematic research in *Ginkgo biloba*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 134, 181–186.
- Nobre, V. M., Dantas, A. F., Riet–Correa, F., Barbosa, J. M., Tabosa, I. M., Vasconcelos, J. S. (2005). Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*, 45, 347–352.
- Noor, W. M., Said, I. M. (2011). Physico–chemical properties of the oils and fat from *Crotalaria cleomifolia* seeds. *Sains Malaysiana*, 40, 1037–1041.
- O’Brien, D. P., Hourdel, V., Chenal, A., Brier, S. (2020). Hydrogen/Deuterium Exchange mass spectrometry for the structural analysis of detergent–solubilized membrane proteins. In: Perez, C., Maier, T. (Eds), *Expression, purification, and structural biology of membrane proteins* (pp. 339–358). New York: Humana.
- Ober, D., Kaltenecker, E. (2009). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 70, 1687–1695.
- Official and Recommended Methods of the American Oil Chemists’ Society (1994). American Oil Chemists’ Society. Champaign, IL.
- Ojha, A., Yaduvanshi, S. K., Pant, S. C., Lomash, V., Srivastava, N. (2013). Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environ. Toxicol.*, 28, 543–552.
- Pandey, V. B., Singh, J. P., Rao, Y. V., Acharya, S. B. (1982). Isolation and pharmacological action of heliotrine, the major alkaloid of *Heliotropium indicum* seeds. *Planta Med.*, 45, 229–233.

- Pedersen, E., Larsen, E. (1970). Mass spectrometry of some pyrrolizidine alkaloids. *Org. Mass Spectrom.*, 4, 249–256.
- Pilbeam, D. J., Lyon–Joyce, A. J., Bell, E. A. (1983). Occurrence of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline in *Crotalaria* seeds. *J. Nat. Prod.*, 46, 601–605.
- Rizk, A.F. (1990). Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 240.
- Roeder, E. (1995). Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, 50, 83–98.
- Roeder, E. (2000). Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, 55, 711–726.
- Roeder, E., Wiedenfeld H., Edgar J. A. (2015). Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants from North America. *Pharmazie*, 70, 357–367.
- Roulet, M., Laurini, R., Rivier, L., Calame, A. (1988). Hepatic veno–occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *J. Pediat.*, 112, 433–436.
- Ruan, J., Li, N., Xia, Q., Fu, P. P., Peng, S., Ye, Y., Lin, G. (2012). Characteristic ion clusters as determinants for the identification of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in pyrrolizidine alkaloid-containing natural products using HPLC–MS analysis. *J. Mass Spectrom.*, 47, 331–337.
- Ruther, J. (2000). Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 890, 313–319.

- Samba, R. T., Sylla, S. N., Neyra, M., Gueye, M., Dreyfus, B., Ndoye, I. (2002). Biological nitrogen fixation in *Crotalaria* species estimated using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution method. *Afr. J. Biotechnol.*, 1, 17–22.
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M. A., Schuurink, R. C. (2013). Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 17781–17811.
- Schulz, M., Meins, J., Diemert, S., Zagermann–Muncke, P., Goebel, R., Schrenk, D., Schubert–Zsilavec, M., Abdel–Tawab, M. (2015). Detection of pyrrolizidine alkaloids in German licensed herbal medicinal teas. *Phytomedicine*, 22, 648–656.
- Shelly, T. E., Nishimoto, J. I. (2015). Exposure to the plant compound  $\alpha$ –humulene reduces mating success in male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 108, 215–221.
- Signoretti, A. G. C., Nava, D. E., Bento, J. M. S., Parra, J. R. P. (2008). Biology and thermal requirements of *Utetheisa ornatrix* (L.)(Lepidoptera:Arctiidae) reared on artificial diet. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 51, 447–453.
- Sinan, K.I., Saftić, L., Peršurić, Ž., Pavelić, S. K., Etienne, O. K., Picot–Allain, M. C., Mahomoodally, M. F., Zengin, G. (2020). A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *Crotalaria retusa* L. stem barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols. *S. Afr. J. Bot.*, 128, 101–108.

- Sixto, A., Pérez-Parada, A., Niell, S., Heinzen, H. (2019). GC-MS and LC-MS/MS workflows for the identification and quantitation of pyrrolizidine alkaloids in plant extracts, a case study: *Echium plantagineum*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 29, 500-503.
- Smith, L. W., Edgar, J. A., Willing, R. I., Gable, R. W., Mackay, M. F., Suri, O. P., Atal, C. K., Culvenor, C. C. (1988). Crotaleschenine, an alkaloid of *Crotalaria leschenaultii*. *Aust. J. Chem.*, 41, 429-436.
- Smyrska-Wieleba, N., Wojtanowski, K. K., Mroczek, T. (2017). Comparative HILIC/ESI-QTOF-MS and HPTLC studies of pyrrolizidine alkaloids in flowers of *Tussilago farfara* and roots of *Arnebia euchroma*. *Phytochem. Lett.*, 20, 339-349.
- Sokame, B. M., Ntiri, E. S., Ahuya, P., Torto, B., Le Ru, B. P., Kilalo, D. C., Juma, G., Calatayud, P. A. (2019). Caterpillar-induced plant volatiles attract conspecific and heterospecific adults for oviposition within a community of lepidopteran stemborers on maize plant. *Chemoecology*, 29, 89-101.
- Stashenko, E. (2011). Productos sin químicos y algunas hazañas e historias de los químicos. *Innovación y Ciencia* (Colombia), 18, 42-58.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cárdenas-Vargas, S., Saavedra-Barrera, R., Durán, D. C. (2013). GC-MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *J. Sep. Sci.*, 36, 2901-2914.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R. (2004). Derivatization and solid-phase microextraction. *TrAC Trend. Anal. Chem.*, 23, 553-561.

- Suparmi, S., Mulder, P. P., Rietjens, I. M. (2020). Detection of pyrrolizidine alkaloids in jamu available on the Indonesian market and accompanying safety assessment for human consumption. *Food Chem. Toxicol.*, 138, 111230.
- These, A., Bodi, D., Ronczka, S., Lahrssen–Wiederholt, M., Preiss–Weigert, A. (2013). Structural screening by multiple reaction monitoring as a new approach for tandem mass spectrometry: presented for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 9375–9383.
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S., Schnitzler, J. P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant J.*, 45, 540–560.
- Tholl, D., Sohrabi, R., Huh, J. H., Lee, S. (2011). The biochemistry of homoterpenes—common constituents of floral and herbivore–induced plant volatile bouquets. *Phytochemistry*, 72, 1635–1646.
- Toppel, G., Witte, L., Hartmann, T. (1988). N–oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. *Phytochemistry*, 27, 3757–3760.
- Trigo, J. R. (2011). Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochem. Rev.*, 10, 83–98.
- Trigo, J. R., Witte, L., Brown, K. S., Hartmann, T., Barata, L. E. (1993). Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *J. Chem. Ecol.*, 19, 669–679.
- Tufariello, J., Tette, J. (1975). Synthesis in the pyrrolizidine class of alkaloids. dl–Supinidine. *J. Org. Chem.*, 40, 3866–3869.
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., Lewis, W. J. (1990). Exploitation of herbivore–induced plant odors by host–seeking parasitic wasps. *Science*, 250, 1251–1253.

- Ullah, S., Zorriehzakra, M. J. (2015). Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 3, 40–57.
- Vacillotto, G., Favretto, D., Seraglia, R., Pagiotti, R., Traldi, P., Mattoli, L. (2013). A rapid and highly specific method to evaluate the presence of pyrrolizidine alkaloids in *Borago officinalis* seed oil. *J. Mass Spectrom.*, 48, 1078–1082.
- van Dam, N. M., Vuister, L. W., Bergshoeff, C., de Vos, H., Van der Meijden, E. D. (1995). The “Raison d'être” of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: Deterrent effects against generalist herbivores. *J. Chem. Ecol.*, 21, 507–523.
- van Den Dool H., Kratz P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 11, 463–471.
- Wei, J., Kang, L. (2011). Roles of (*Z*)-3-hexenol in plant–insect interactions. *Plant Signal. Behav.*, 6, 369–371.
- Weller, S. J., Dacosta, M., Simmons, R., Dittmar, K., Whiting, M. (2009). Evolution and taxonomic confusion in Arctiidae. In: Conner, W. E., (Ed.) *Tiger Moths and Woolly Bears: Behavior, Ecology, and Evolution of the Arctiidae*, (pp. 11–30). New York: Oxford University Press.
- Wiedenfeld, H., Edgar, J. (2011). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem. Rev.*, 10, 137–151.
- Witte, L., Rubiolo, P., Bicchi, C., Hartmann, T. (1993). Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography–mass spectrometry. *Phytochemistry*, 32, 187–196.

- Wretensjö I., Karlberg B. (2003). Pyrrolizidine alkaloid content in crude and processed borage oil from different processing stages. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80, 963–970.
- Wuilloud, J. C., Gratz, S. R., Gamble, B. M., Wolnik, K. A. (2004). Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and *N*-oxides in comfrey root by LC–ion trap mass spectrometry. *Analyst*, 129, 150–156.
- Yoon, S. H., Kim, M. S., Kim, S. H., Park, H. M., Pyo, H., Lee, Y. M., Lee, K. T., Hong, J. (2015). Effective application of freezing lipid precipitation and SCX–SPE for determination of pyrrolizidine alkaloids in high lipid foodstuffs by LC–ESI–MS/MS. *J. Chromatogr. B*, 992, 56–66.
- Zhang, W., Huai, W., Zhang, Y., Shen, J., Tang, X., Xie, X., Wang, K., Fan, H. (2017). Ultra–Performance Liquid Chromatography hyphenated with quadrupole–Orbitrap mass spectrometry for simultaneous determination of necine–core–structure pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria sessiliflora* L. without all corresponding standards. *Phytochem. Anal.*, 28, 365–373.
- Zhu, L., Ruan, J. Q., Li, N., Fu, P. P., Ye, Y., Lin, G. (2016). A novel ultra–performance liquid chromatography hyphenated with quadrupole time of flight mass spectrometry method for rapid estimation of total toxic retronecine–type of pyrrolizidine alkaloids in herbs without requiring corresponding standards. *Food Chem.*, 194, 1320–1328.

## Apéndices

**Apéndice A.** Aval para realizar la cría, manipulación y utilización de los especímenes de *Utetheisa ornatrix* por parte del comité del comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS).



4110

Bucaramanga,

Estudiante  
**JESÚS ALBERTO ZAMBRANO**  
Investigador principal

Profesora  
**ELENA STASHENKO**  
Directora trabajo de investigación  
Pregrado de Química  
Escuela de Química  
Universidad Industrial de Santander  
Presente

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto. "Estudio de alcaloides pirrolizidínicos en oruga (*Utetheisa ornatrix*) alimentada con hojas o semillas de *Crotalaria* spp".

Cordial Saludo. El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) en reunión realizada el día 13 de abril de 2018, según consta en el Acta N° 06, evaluó los ajustes realizados al proyecto del asunto y al respecto conceptúa:

En consideración a que el proyecto del asunto cumple con todos los requerimientos, el Comité de Ética acordó, por consenso, **APROBAR** el documento digital en su última versión.

De igual manera, aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de Gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.jsp>, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

Así mismo, realizar los trámites y/o permisos necesarios para la recolección de los microorganismos o muestras requeridas para la investigación.

Finalmente, se solicita remitir al correo del Comité la información correspondiente cuando ocurra una de las circunstancias siguientes:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo.
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.



4110

- Informe de avance sobre los aspectos éticos según guía e instructivo anexo. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación y al finalizar la misma según el cronograma establecido en el Formato FIN 65.
- El informe debe ser enviado al correo: [ceinci.seguimientos@uis.edu.co](mailto:ceinci.seguimientos@uis.edu.co)

En el momento del seguimiento se verificará el cumplimiento de las consideraciones éticas.

En nombre del CEINCI-UIS le ofrecemos el apoyo que usted considere necesario, para la aplicación y salvaguarda de los asuntos éticos durante la investigación.

Atentamente,

LAURA A. RODRÍGUEZ VILLAMIZAR  
Presidenta  
CEINCI- UIS

FRANCISCO ESPINEL CORREAL  
Secretario Técnico Científico  
CEINCI- UIS

Copia: Profesor Jairo René Martínez y estudiante Fausto Prada Chaparro (Escuela de Química), co-directores del trabajo de investigación.

Dr. Arnold Rafael Romero Bohórquez, Director de la Escuela de Química

Archivo Comité de Ética en Investigación Científica.

**Apéndice B.** Constancia de depósito, de material biológico sobrante de los especímenes de *Utetheisa ornatrix*, en la Colección Entomológica del Museo de Historia Natural, Universidad Industrial de Santander.



Universidad  
Industrial de  
Santander

Colección Herpetológica  
Museo de Historia Natural  
Universidad Industrial de Santander

### CONSTANCIA DE DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

**Depositarios:**

**JESÚS ALBERTO ZAMBRANO RODRÍGUEZ**

**FAUSTO PRADA CHAPARRO**

**Permiso de Colecta:**

Permiso marco de recolección UIS. Resolución 1412 de 2012 del ANLA.

**Nombre del proyecto o trabajo de grado:**

“Estudio de alcaloides pirrolizidínicos en oruga, polilla y huevo *Utetheisa ornatrix*, alimentada con hojas o semillas de *Crotalaria* spp.” / “Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos y compuestos orgánicos volátiles en *Crotalaria* spp. (Fabaceae) inducidos por herbivoría con *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera).”

**Director del proyecto o trabajo de grado:**

Prof. Dr. **ELENA E. STASHENKO**

**Especímenes depositados:**

-Siete especímenes adulto de *Utetheisa ornatrix*, montados en seco.

-58 especímenes inmaduros *U. ornatrix*, en líquido.

-20 huevos de *U. ornatrix*, en líquido.

**Recibido por:**

**Daniel Rafael Miranda Esquivel**  
Curador Colección Entomológica  
Museo de Historia Natural. UIS

**Fecha: 2019 – 10 - 08**

**Apéndice C.** Sitios de colecta en el Departamento de Santander con latitud, longitud, altitud, números de *voucher* y el especialista que determinó las especies de *Crotalaria* colectadas en el presente trabajo.

<b>Especies</b>	<b>Sitio de colecta</b>	<b>Latitud, longitud</b>	<b>Altitud (m)</b>	<b>N° Voucher</b>	<b>Determinó</b>
<i>C. retusa</i> L.	Girón	6°59'33.8"N, 73°10'07.3"W	809	COL 582808	O. Rivera-Díaz
<i>C. spectabilis</i> Roth	Betulia	6°59'49.1"N 73°22'11.4"W	299	COL 582809	O. Rivera-Díaz
	Betulia	7°00'42.5"N 73°21'20.8"W	405	COL 586227	D. Giraldo-Cañas
<i>C. pallida</i> Aiton	Floridablanca	7°06'45.3"N 73°04'43.1"W	1572	COL 586228	D. Giraldo-Cañas
	Betulia	7°01'15.5"N 73°20'55.1"W	299	COL 585763	C. Parra-O
	Bucaramanga	7°08'13.6"N 73°07'04.0"W	1009	COL 579432	D. Giraldo-Cañas
	Bucaramanga	7°05'30.7"N 73°06'32.6"W	927	COL 585765	C. Parra-O
	Bucaramanga	7°06'05.7"N 73°06'16.4"W	961	COL 585762	C. Parra-O
	Bucaramanga	7°06'22.8"N 73°05'55.6"W	1021	COL 585764	C. Parra-O
	Floridablanca	7°02'19.8"N 73°05'23.0"W	1201	COL 579433	D. Giraldo-Cañas
	Floridablanca	7°05'11.1"N 73°05'41.8"W	908	COL 582807	O. Rivera-Díaz
	Floridablanca	7°07'06.9"N 73°04'14.1"W	1675	COL 585760	C. Parra-O
	Girón	7°00'59.6"N 73°09'34.3"W	734	COL 585761	C. Parra-O
	<i>C. incana</i> L.	Bucaramanga	7°05'30.7"N 73°06'32.6"W	927	COL 585775
Bucaramanga		7°08'26.8"N 73°07'01.1"W	993	COL 585772	C. Parra-O
Floridablanca		7°02'19.8"N 73°05'23.0"W	1201	COL 585774	C. Parra-O
Floridablanca		7°05'12.3"N 73°05'33.9"W	937	COL 585771	C. Parra-O
Girón		6°58'56.4"N, 73°10'18.7"W	828	COL 582806	O. Rivera-Díaz
Girón		7°00'20.9"N 73°10'10.9"W	758	COL 585773	C. Parra-O
<i>C. maypurensis</i> Kunth	Betulia	7°00'33.4"N 73°21'54.5"W	411	COL 582805	O. Rivera-Díaz
	Girón	6°54'33.2"N 73°09'49.0"W	850	COL 586229	D. Giraldo-Cañas
<i>C. nitens</i> Kunth	Bucaramanga	7°08'26.8"N 73°07'01.1"W	993	COL 582810	O. Rivera-Díaz
	Floridablanca	7°05'34.7"N 73°04'35.8"W	1174	COL 586226	D. Giraldo-Cañas
	Piedecuesta	6°56'41.5"N 73°02'05.8"W	1144	COL 579431	D. Giraldo-Cañas

**Apéndice D.** Informe de la determinación taxonómica de *Utetheisa oratrix* mediante secuenciación del gen *COI*, realizado en el Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN-UIS).



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
CENTRO DE INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Bucaramanga, 7 de noviembre de 2018

Prueba de determinación taxonómica de Lepidópteros mediante secuenciación del gen *COI* –  
Orden de Servicio 201803990

En las instalaciones del laboratorio CINBIN – Sede UIS PTG se recibió una muestra de tejido de un lepidóptero con clasificación taxonómica desconocida. Se recibieron 69.2 g de muestra macerada y fue registrada bajo el código 201803990.

1

Se procedió a realizar el siguiente protocolo para la determinación taxonómica de Lepidópteros mediante secuenciación del gen *COI*:

1. Extracción, purificación y cuantificación de DNA total
2. Amplificación por PCR del gen *COI*
3. Purificación de productos PCR
4. Secuenciación mediante electroforesis capilar
5. Análisis bioinformático
6. Determinación bioinformática de origen taxonómico según especie

Análisis de resultados

I. Extracción de DNA total

El ADN total fue extraído mediante columna de afinidad. La extracción presentó un rendimiento de 20  $\mu$ g de ADN total (Fig. 1).

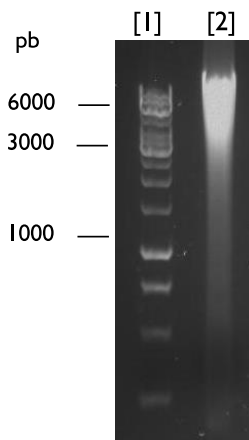


Figura 1. Electroforesis 1% agarosa de extractos de ADN total de muestra problema. Marcador de peso molecular 1 Kb Thermo Scientific® [1], Muestra 201803990 [2].



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
CENTRO DE INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## 2. Amplificación por PCR del gen mitocondrial *COI*

Del extracto de ADN total se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de 130 pb del gen *COI* con oligonucleótidos específicos (Fig. 2).

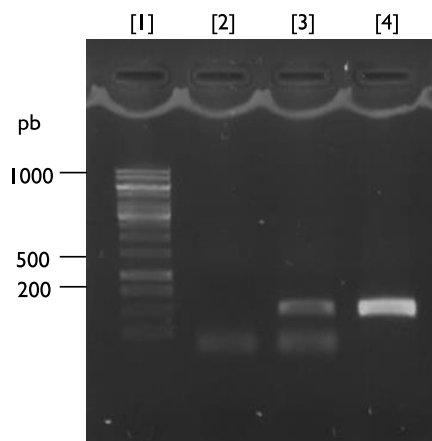


Figura 2. Electroforesis 1% agarosa de amplificados parciales (130 pb) del gen *COI*. Marcador de peso molecular 1 Kb Thermo Scientific® [1], Control negativo [2], Control positivo [3], Muestra 2018.

2

## 3. Purificación de productos PCR

Los productos PCR fueron purificados mediante membrana de afinidad y cuantificados con el programa Doct®LS V.7.1 RC5.54 (UVP, CA, USA).

## 4. Secuenciación mediante electroforesis capilar

A partir de 250 ng del producto purificado se realizó secuenciación mediante electroforesis capilar con equipo ABI® 3730 XL.

Se obtuvieron secuencias con una longitud de 130 posiciones nucleotídicas y valores de probabilidad por base nucleotídica superiores al 99% (Fig. 3).

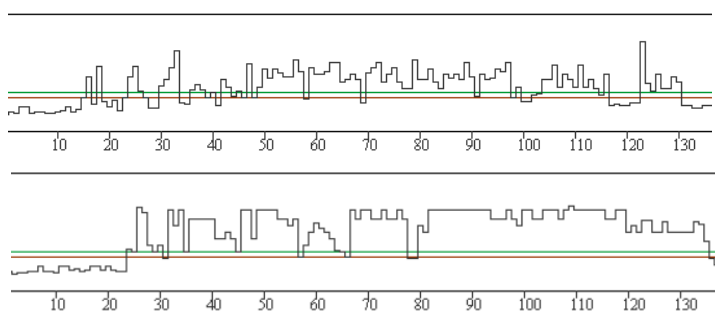


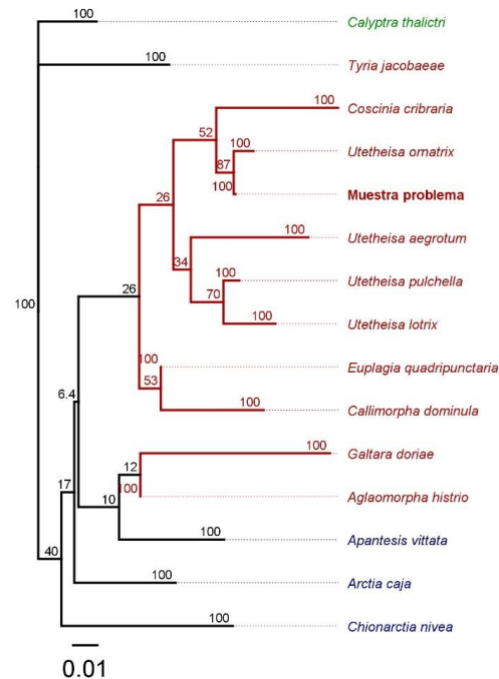
Figura 3. Análisis Phred de la calidad de la secuenciación por cada posición. La línea verde delimita valores  $QV > 20$  (99% de probabilidad), la línea marrón delimita valores  $QV > 16$  (96% de probabilidad).



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
CENTRO DE INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL  
Y BIOLÓGÍA MOLECULAR

#### 5. Determinación bioinformática de origen taxonómico según especie.

Se realizó determinación taxonómica comparativa mediante alineamientos con secuencias de referencia, matrices y árboles de distancia genética. Todos los análisis de secuencias fueron realizados con el programa Geneious® V.8.0.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand) (Fig. 4).

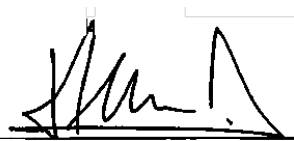


3

**Fig. 4.** Árbol de distancia inferido mediante el método de Neighbor-jining. El árbol consenso Bootstrap inferido de 1000 réplicas fue tomado para representar las relaciones entre los taxa analizados. El árbol es dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol de distancia. Las distancias genéticas fueron calculadas usando el método de Jukes-Cantor y están en unidades de número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 15 secuencias nucleotídicas. Todas las posiciones incluyendo gaps y datos perdidos fueron eliminadas y el set de datos final está representado en 99 posiciones. Análisis de identidad fueron construidos con la aplicación Geneious® V. 8.0.5.

De acuerdo al análisis de los datos obtenidos se determinó que la muestra analizada tiene un 99.9 % de identidad con **Utetheisa ornatrix**.

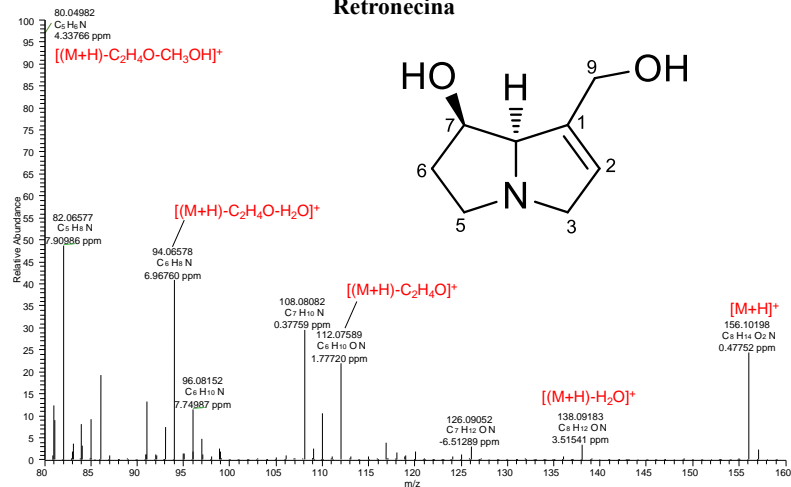
  
Oriana Danúta Serna Daza  
Bióloga - TP. 63528305

  
Vo.Bo. Jorge Hernández Torres, Ph.D.  
Director CINBIN

**Apéndice E.** Espectros de masas [ESI(+)-HRMS] de los 52 PA y *N*-óxidos detectados en las raíces, hojas, flores y semillas de las especies de *Crotalaria* y especímenes *U. ornatrix* estudiadas en el presente trabajo.

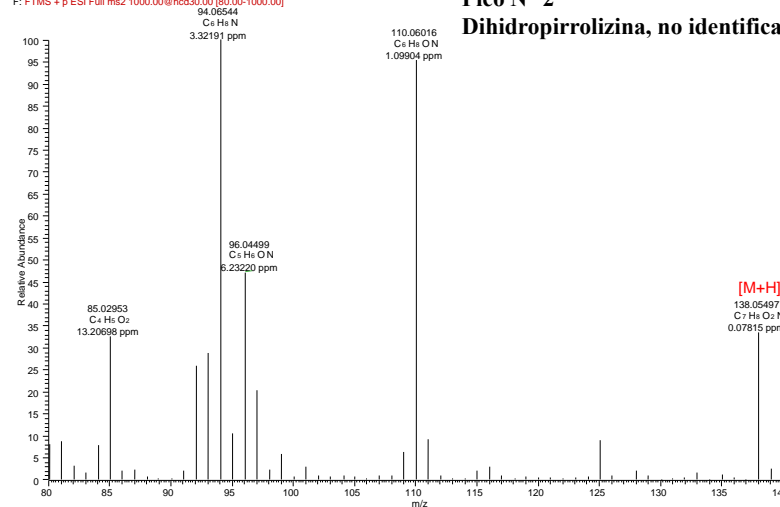
BG STD\_PA\_30e#41-42 RT:0.94-0.97 AV:2 NL:9.87E6  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 1**  
**Retronecina**



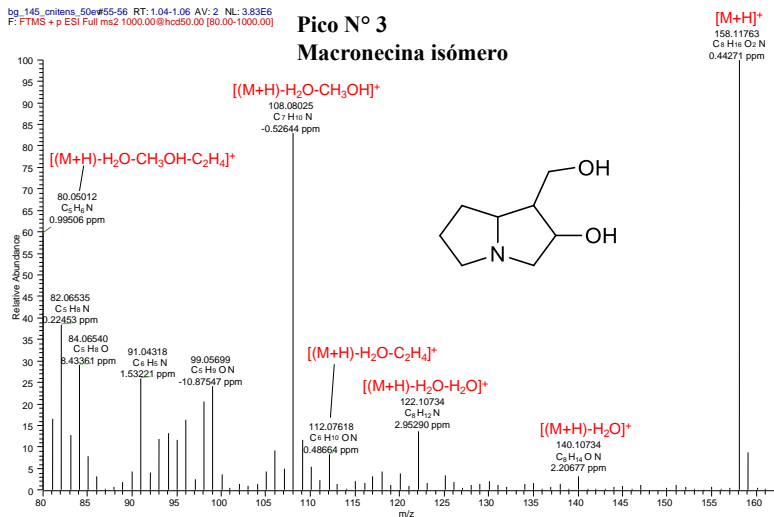
BG\_634\_Incana\_30e#42-43 RT:0.99-1.02 AV:2 NL:2.63E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 2**  
**Dihidropirrolizina, no identificada**



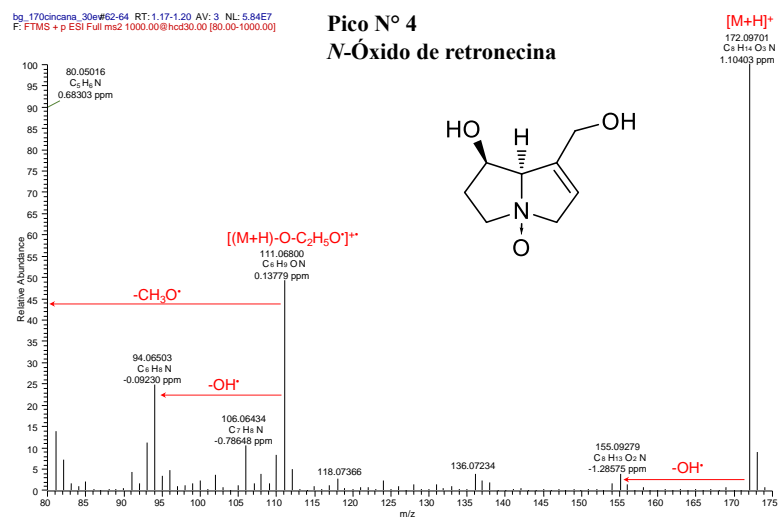
bg\_145\_cinifera\_50e#55-56 RT:1.04-1.06 AV:2 NL:3.83E6  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 3**  
**Macronecina isómero**



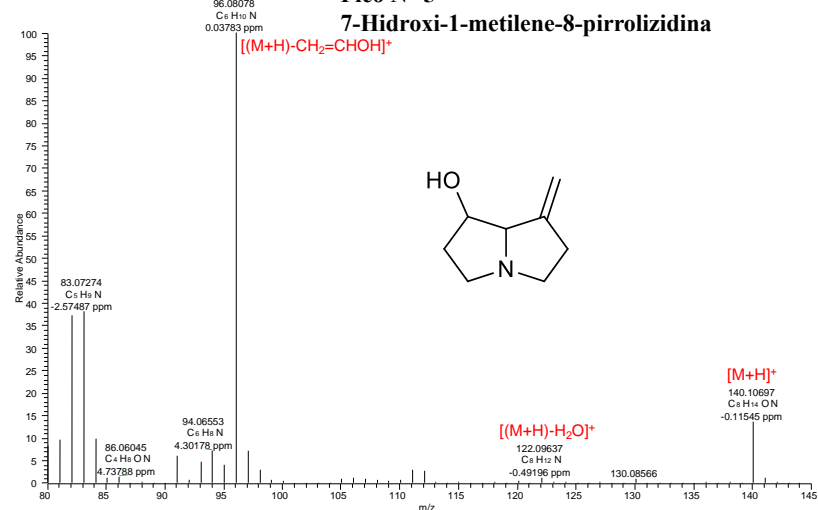
bg\_170cincana\_30e#62-64 RT:1.17-1.20 AV:3 NL:5.84E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 4**  
**N-Óxido de retronecina**



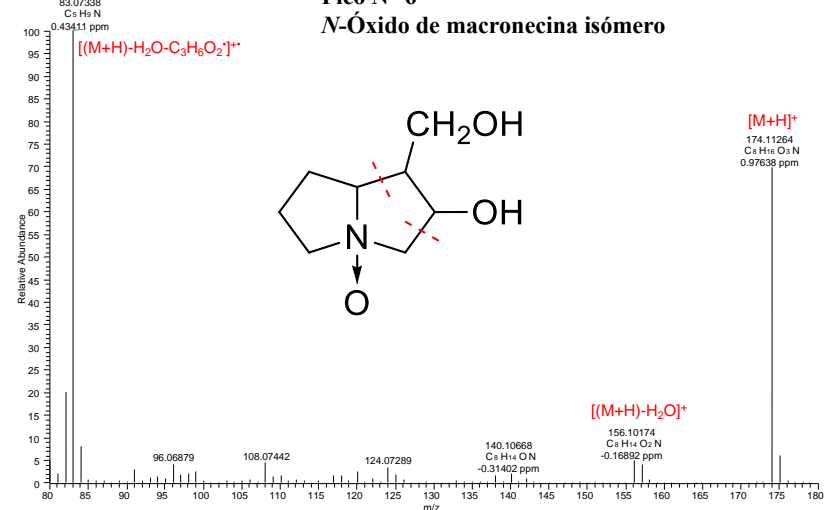
BG\_298\_mayp\_seeds\_30e#68-72 RT:1.25-1.32 AV:5 NL:1.82E8  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 5**  
**7-Hidroxi-1-metileno-8-pirrolizidina**



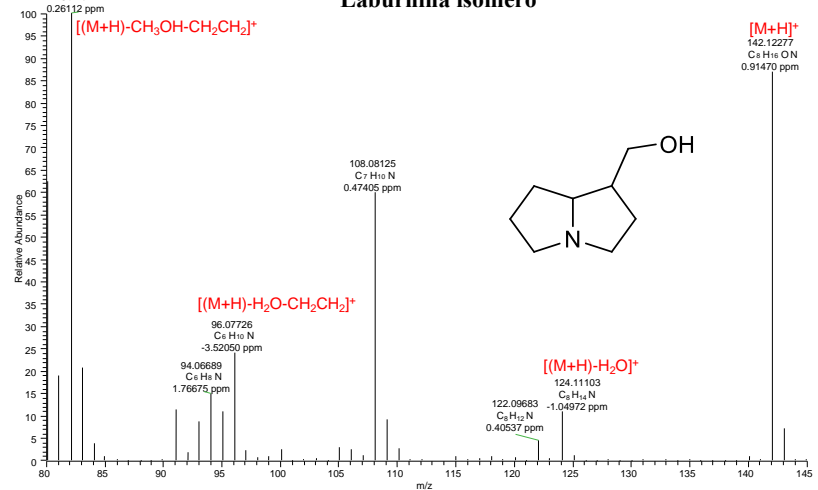
bg\_475\_critens\_40e#61-62 RT:1.36-1.38 AV:2 NL:5.05E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 6**  
**N-Óxido de macronecina isómero**



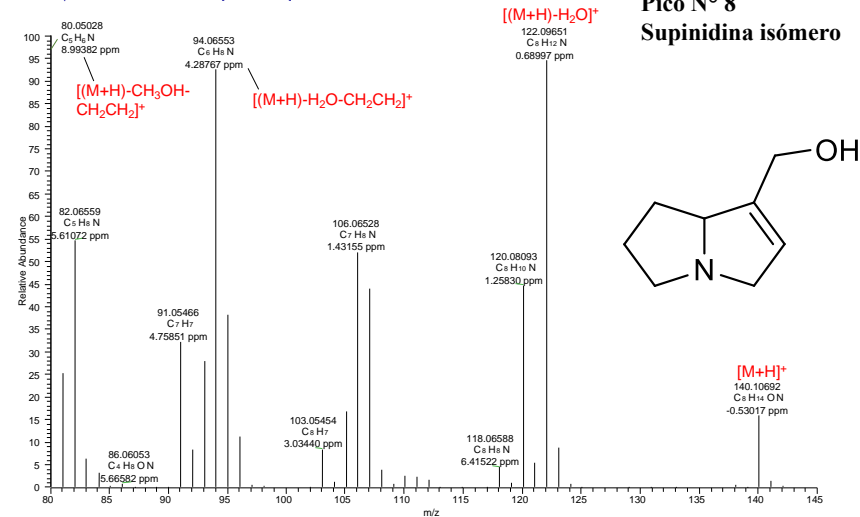
bg\_243r\_pallida\_50e#72-74 RT:1.34-1.37 AV:3 NL:1.96E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 7**  
**Laburnina isómero**



BG\_298\_mayp\_seeds\_30e#101-104 RT:1.83-1.88 AV:4 NL:4.98E8  
 T: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

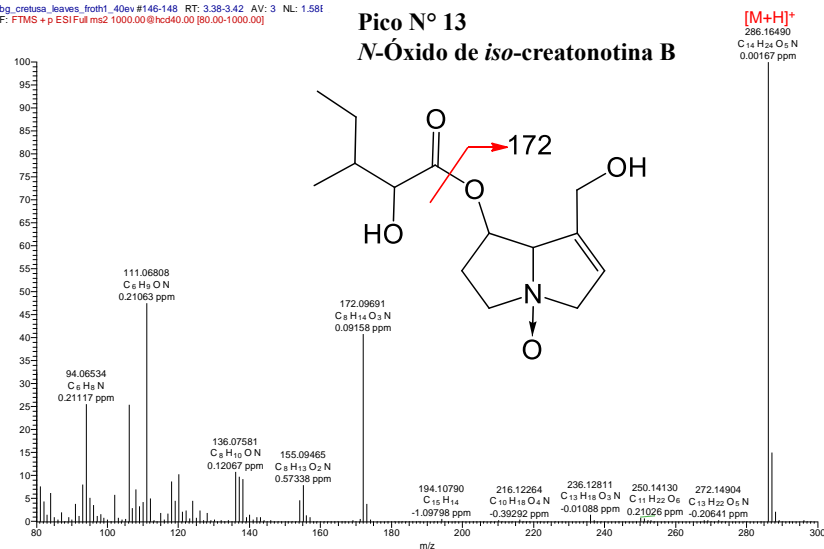
**Pico N° 8**  
**Supinidina isómero**





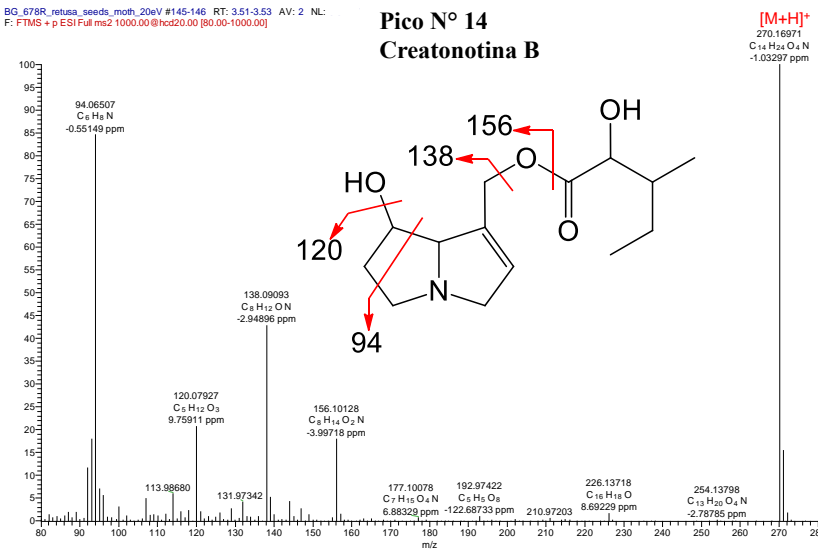
bg\_cretusa\_leaves\_froth1\_40ev #146-148 RT: 3.38-3.42 AV: 3 NL: 1.581  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 13**  
**N-Óxido de iso-creatonotina B**



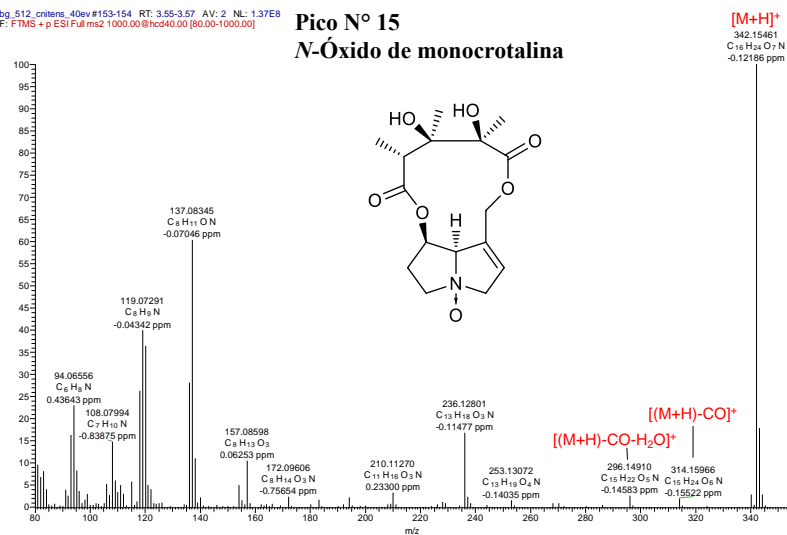
BG\_678R\_retusa\_seeds\_moth\_20ev #145-146 RT: 3.51-3.53 AV: 2 NL: 2  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd20.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 14**  
**Creatonotina B**



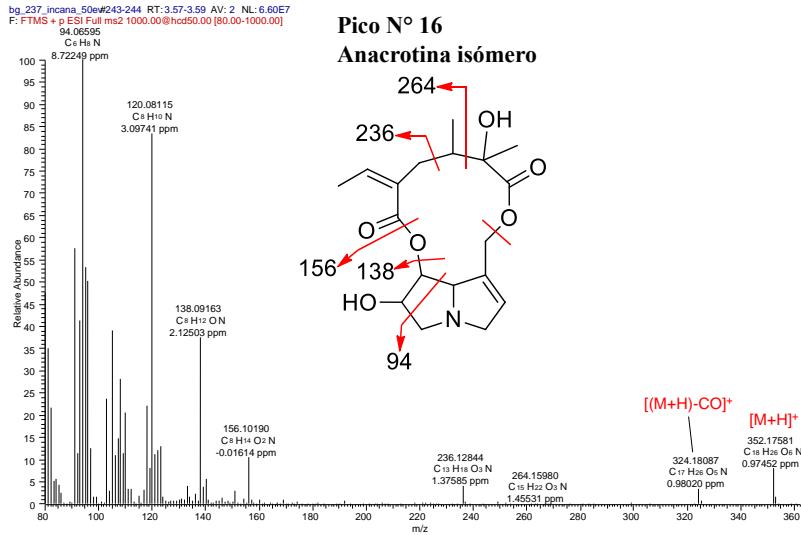
bg\_512\_criteris\_40ev #153-154 RT: 3.55-3.57 AV: 2 NL: 1.37E8  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 15**  
**N-Óxido de monocrotalina**



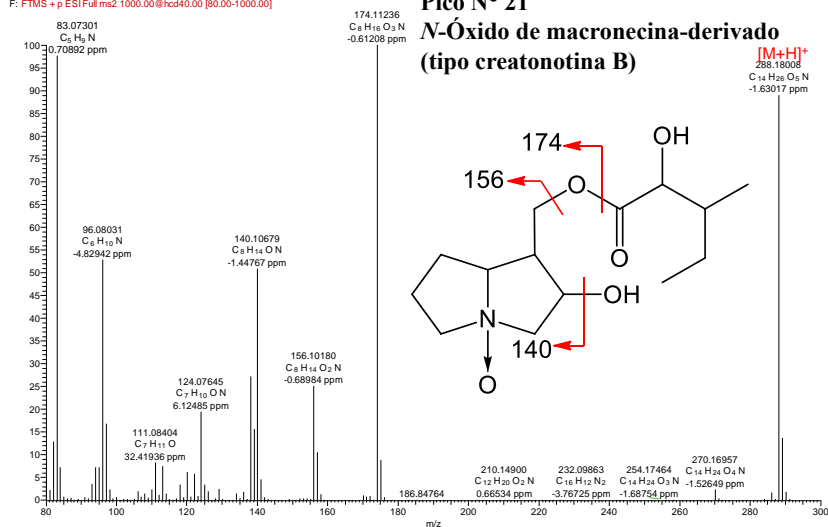
bg\_237\_incana\_50ev #243-244 RT: 3.57-3.59 AV: 2 NL: 6.60E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 16**  
**Anacrotina isómero**

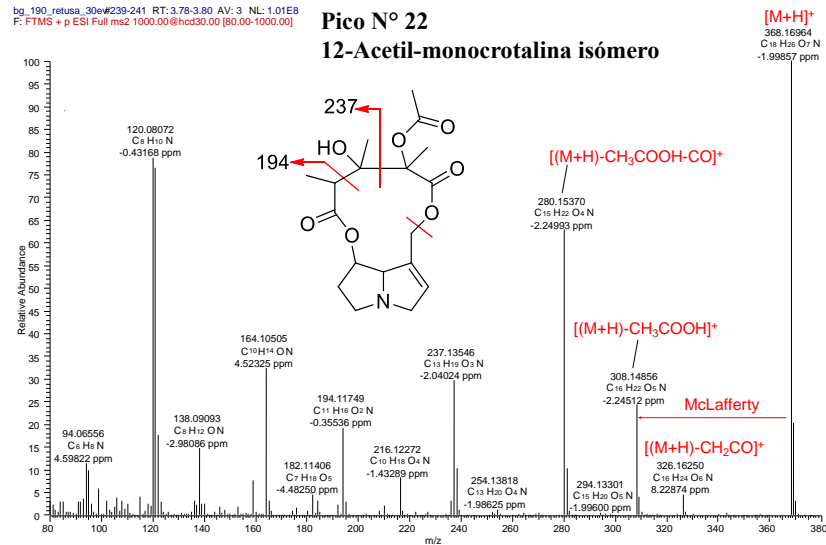




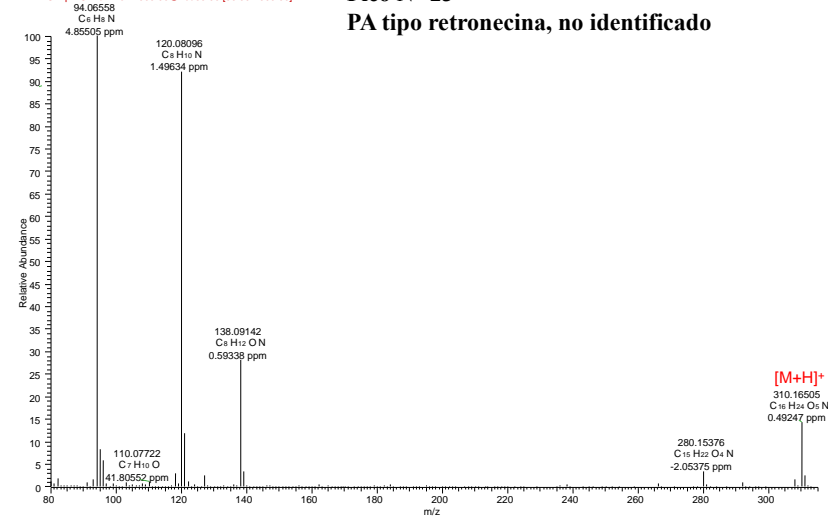
bg\_cincana\_leaves\_froth4\_40ev#160-162 RT: 3.76-3.80 AV: 3 NL: 1.11  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]



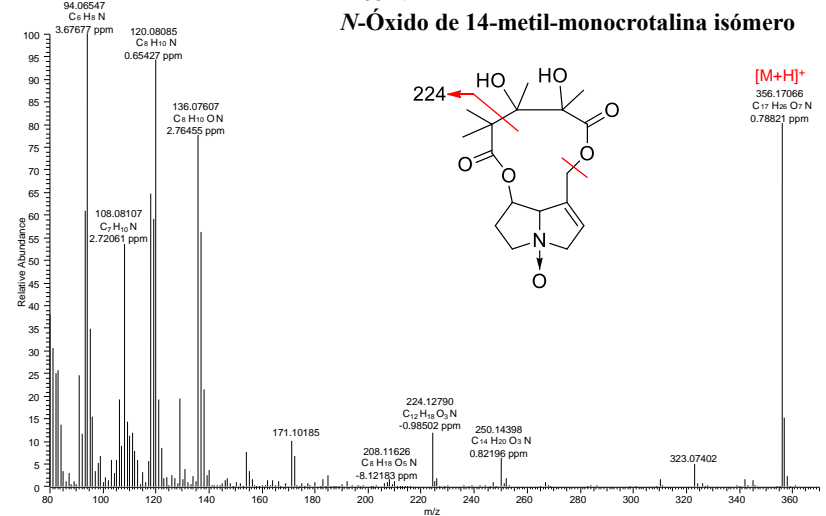
bg\_190\_retusa\_30ev#239-241 RT: 3.78-3.80 AV: 3 NL: 1.01E6  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

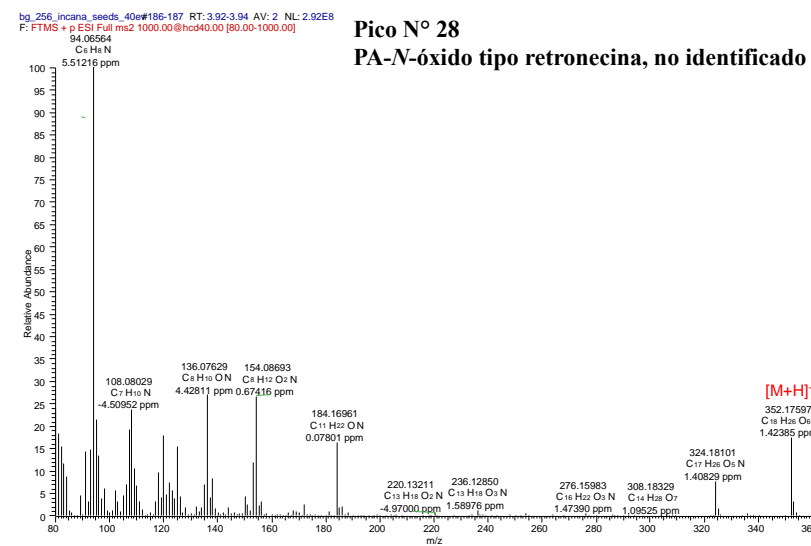
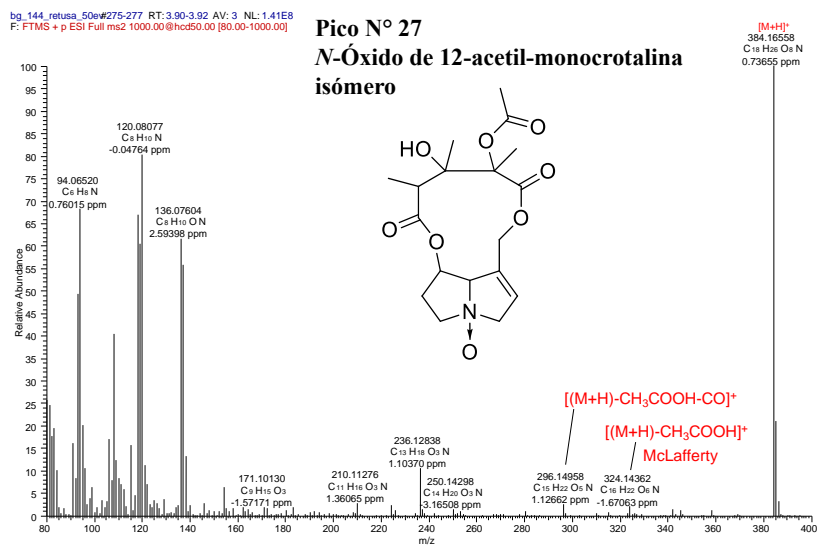
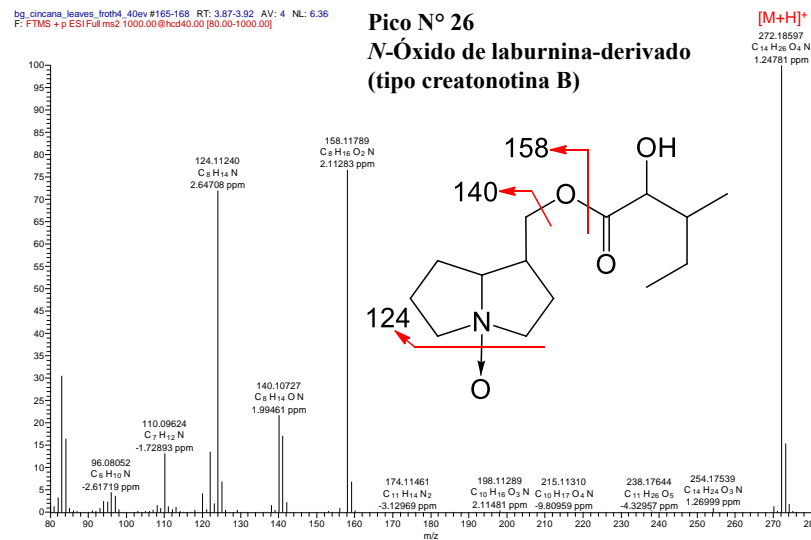
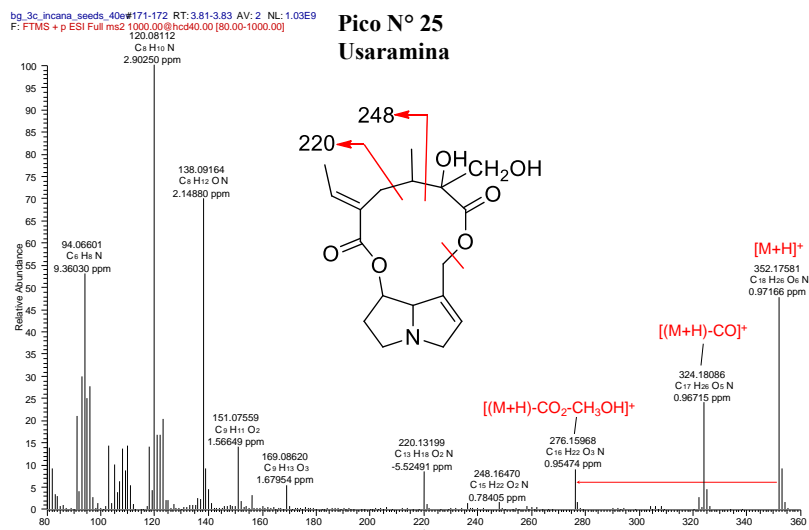


bg\_189\_cnitens\_30ev#198-199 RT: 3.80-3.82 AV: 2 NL: 8.92E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]



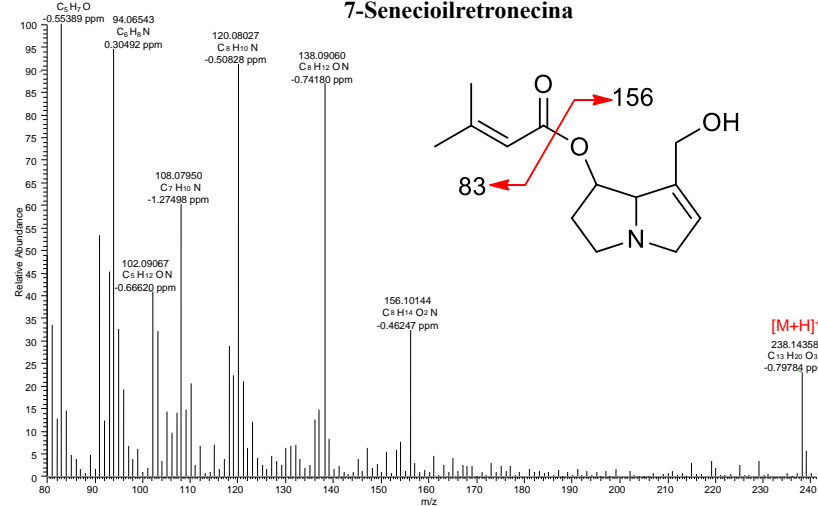
bg\_241\_spectabilis\_50ev#266-267 RT: 3.80-3.83 AV: 2 NL: 3.66E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]





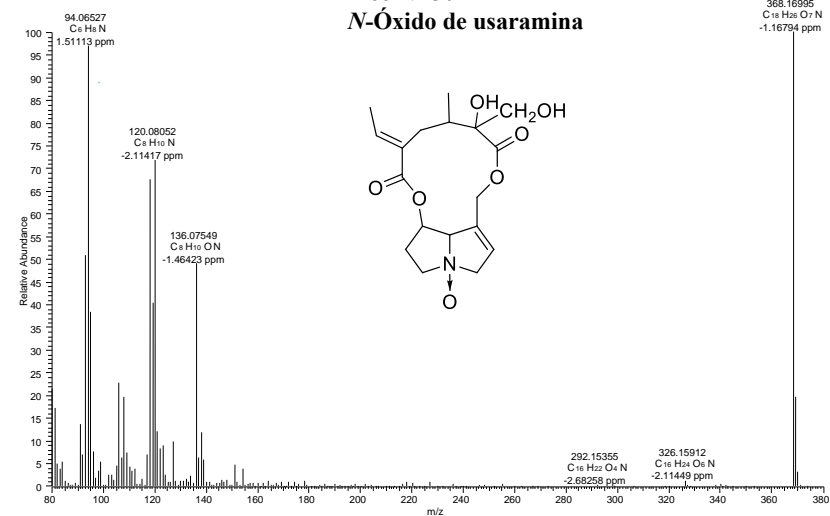
bg\_364\_citrens\_30e#211-212 RT: 3.92-3.93 AV: 2 NL: 1.10E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 29**  
**7-Senecioidretronecina**



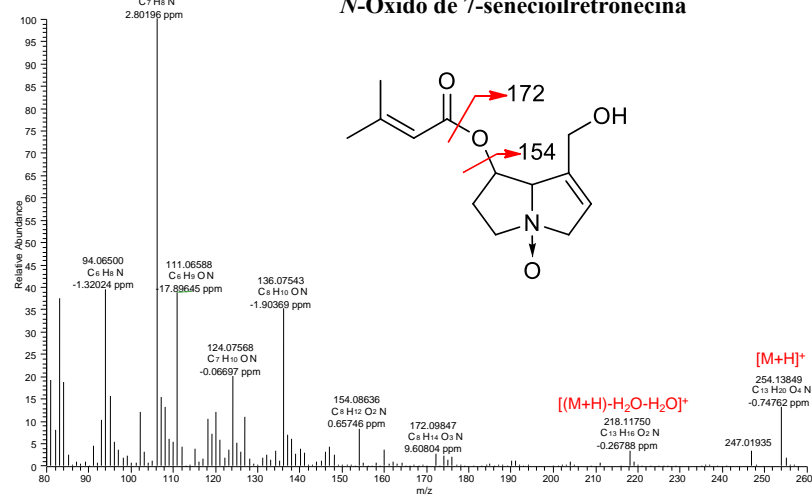
bg\_236\_incana\_50e#295-296 RT: 3.93-3.95 AV: 2 NL: 7.70E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 30**  
**N-Óxido de usaramina**



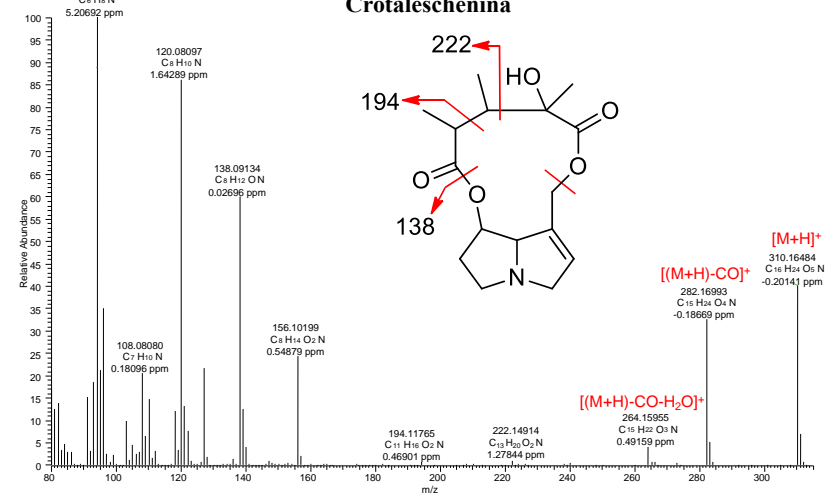
bg\_243\_pallida\_30e#263-264 RT: 3.92-4.95 AV: 2 NL: 5.88E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 31**  
**N-Óxido de 7-senecioidretronecina**



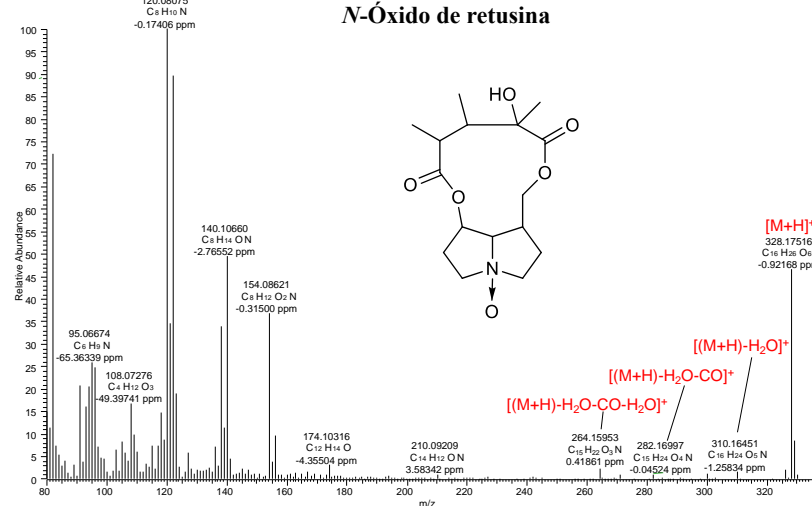
bg\_1\_nitens\_seeds\_40e#177-178 RT: 3.82-3.84 AV: 2 NL: 2.82E8  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 32**  
**Crotaleschenina**



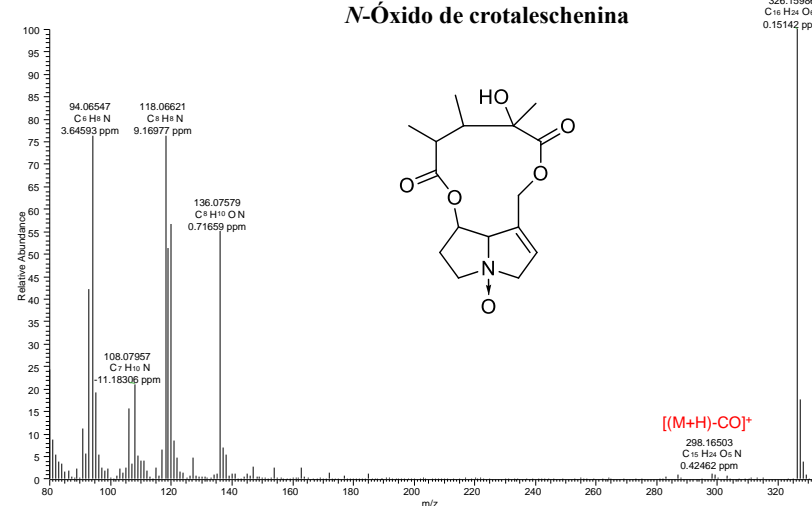
bg\_270\_retusa\_50e#211-212 RT: 3.97-3.99 AV: 2 NL: 8.31E6  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 33**  
**N-Óxido de retusina**



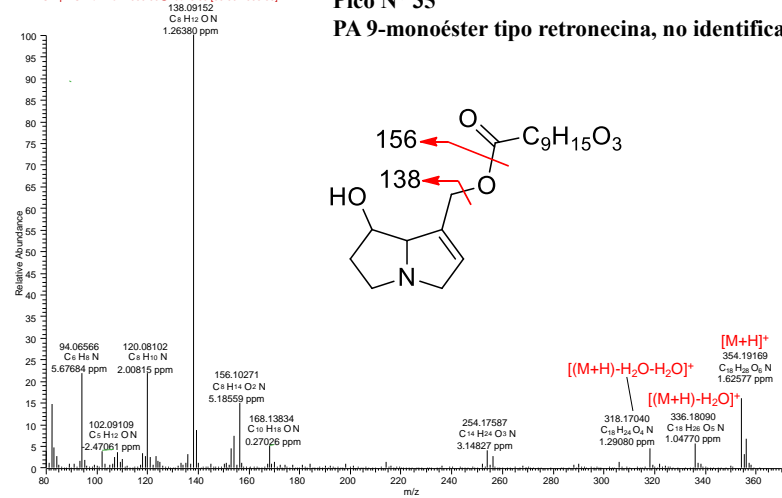
bg\_148\_critens\_50e#211-212 RT: 3.98-4.00 AV: 2 NL: 4.22E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 34**  
**N-Óxido de crotaleschenina**



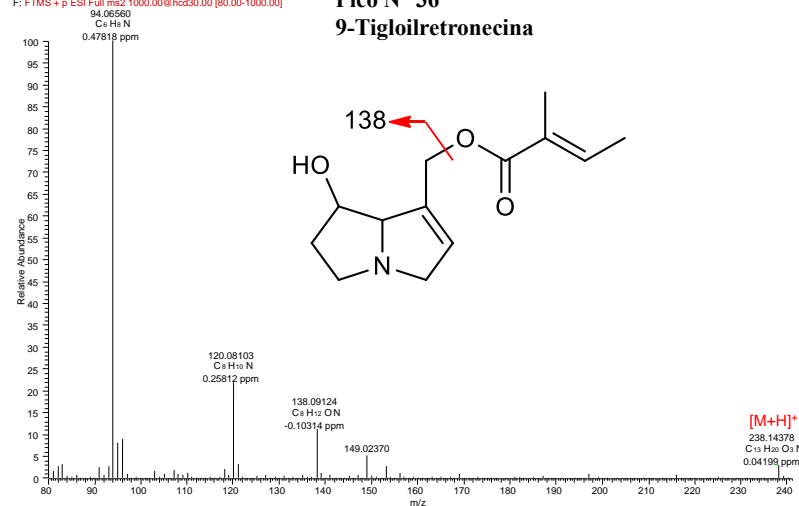
BQ\_256\_incans\_seed\_20e#191-192 RT: 4.00-4.02 AV: 2 NL: 1.75E8  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd20.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 35**  
**PA 9-monoéster tipo retronecina, no identificado**



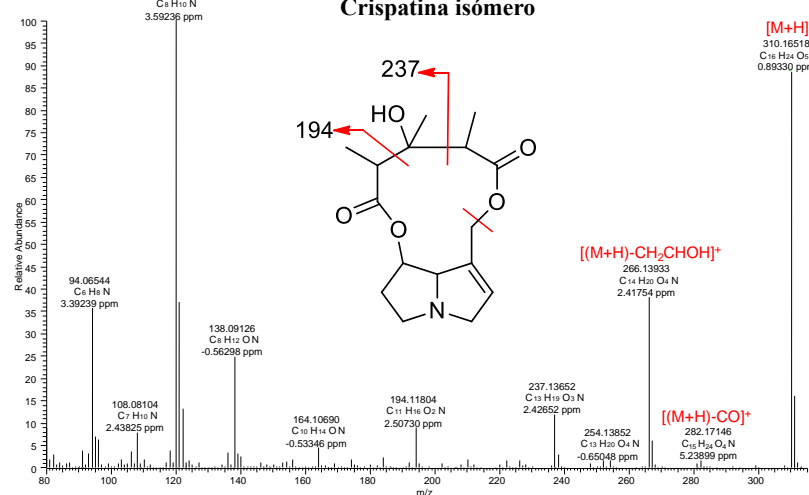
bg\_364\_critens\_30e#216-217 RT: 4.01-4.02 AV: 2 NL: 3.67E8  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 36**  
**9-Tigloilretronecina**



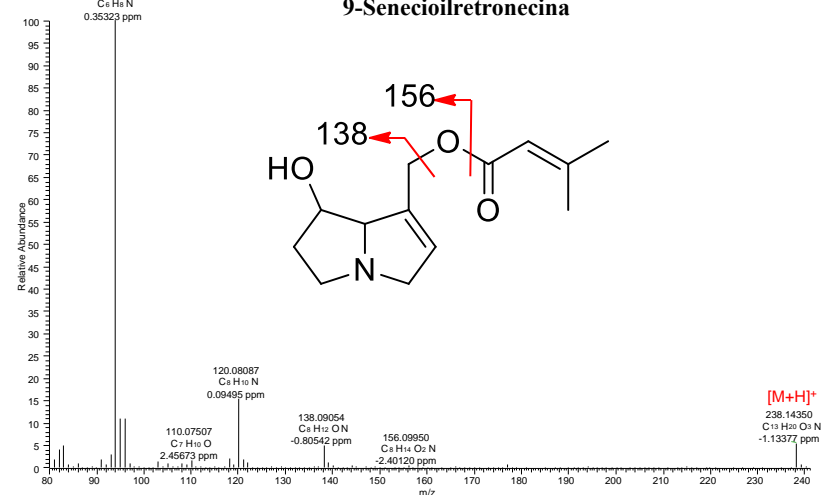
BG\_7C\_spectab\_seeds\_30e#181 RT: 4.07 AV: 1 NL: 1.21E8  
T: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 37**  
**Crispatina isómero**



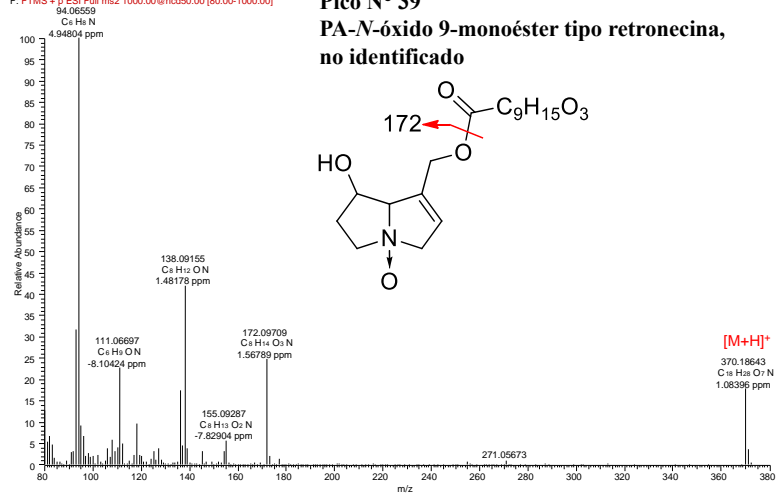
BG\_384\_critens\_30e#220-221 RT: 4.07-4.09 AV: 2 NL: 4.42E8  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 38**  
**9-Senecioldretronecina**



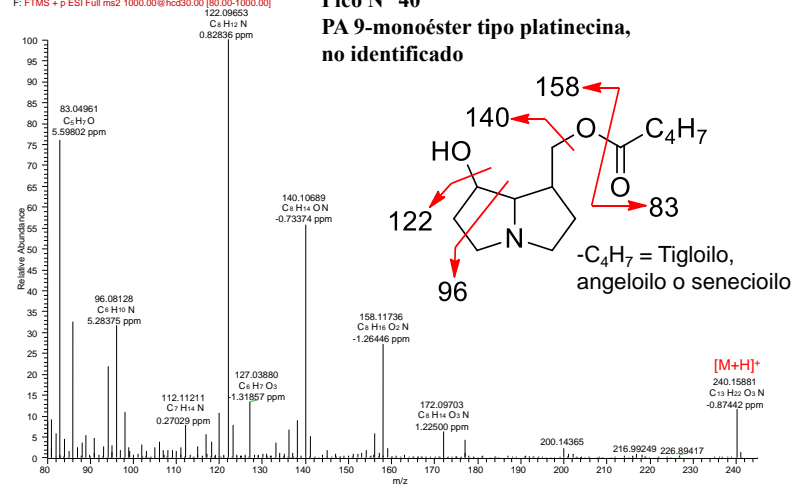
BG\_243r\_pallida\_50e#219-220 RT: 4.12-4.14 AV: 2 NL: 3.69E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 39**  
**PA-N-óxido 9-monoéster tipo retronecina, no identificado**

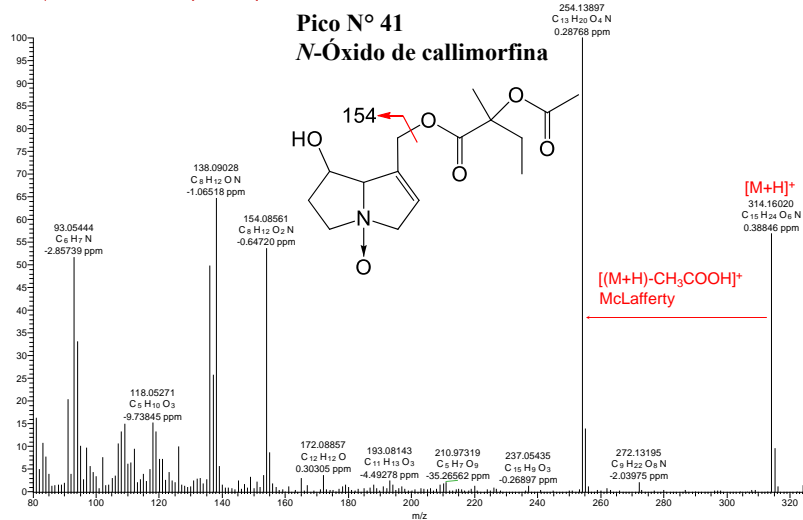


BG\_475\_Critens\_30e#188 RT: 4.16 AV: 1 NL: 2.31E6  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

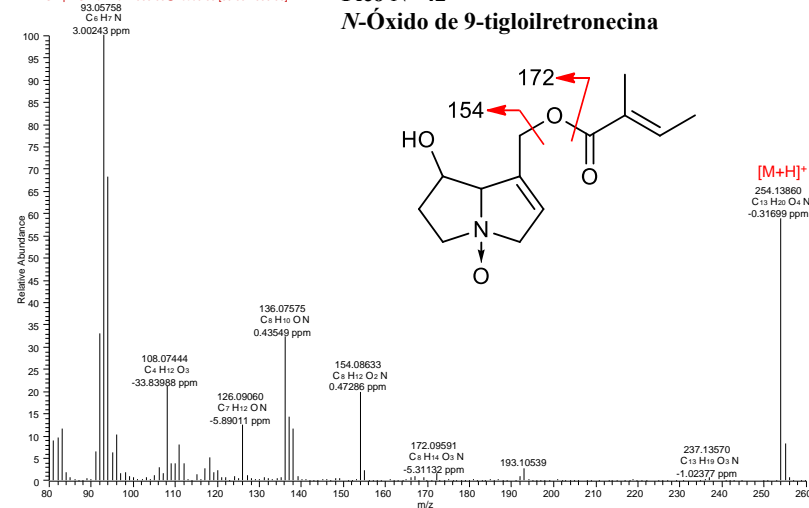
**Pico N° 40**  
**PA 9-monoéster tipo platinecina, no identificado**



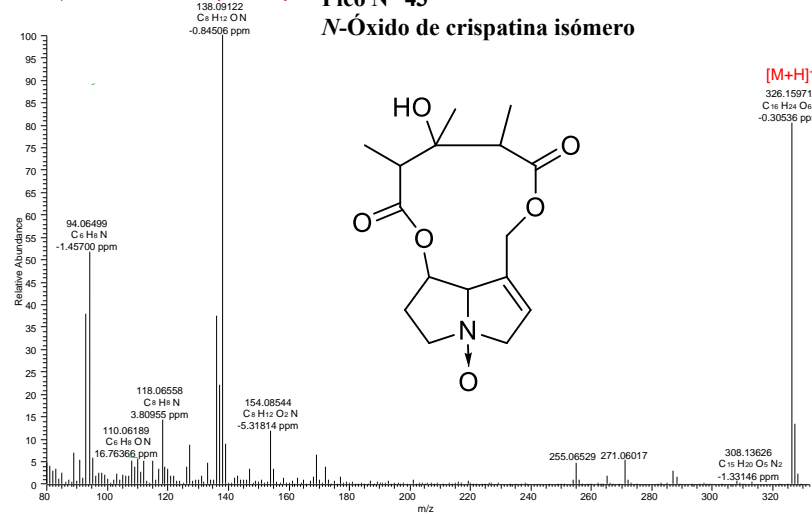
bg\_777\_nitens\_seeds\_eggs\_30ev#172-174 RT: 4.15-4.20 AV: 3 NL: 2;  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]



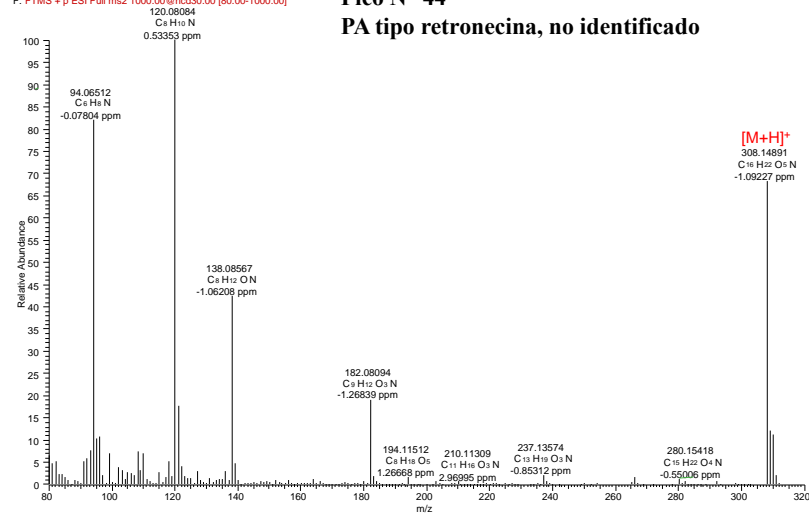
bg\_170\_cincana\_50ev#223-224 RT: 4.23-4.25 AV: 2 NL: 3.86E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]



bg\_145\_cnitens\_30ev#222-223 RT: 4.22-4.24 AV: 2 NL: 1.58E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

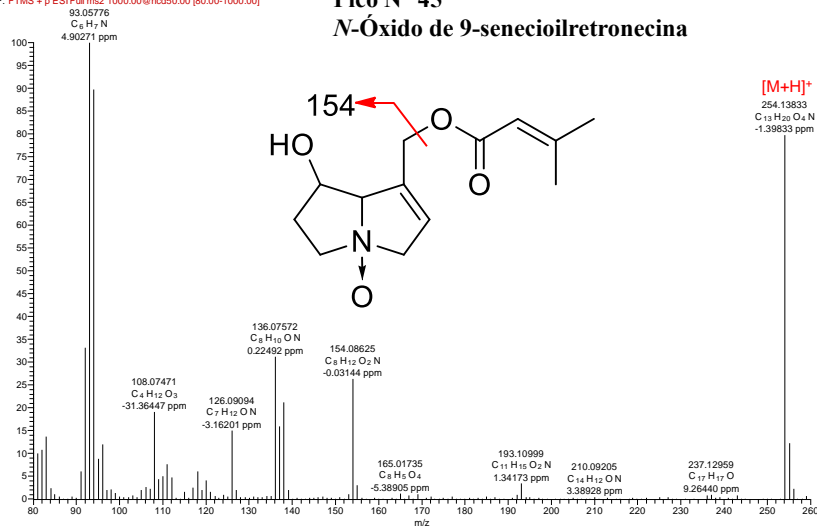


bg\_242\_spectal\_seeds\_30ev#267-269 RT: 4.25-4.28 AV: 3 NL: 2.48E7  
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]



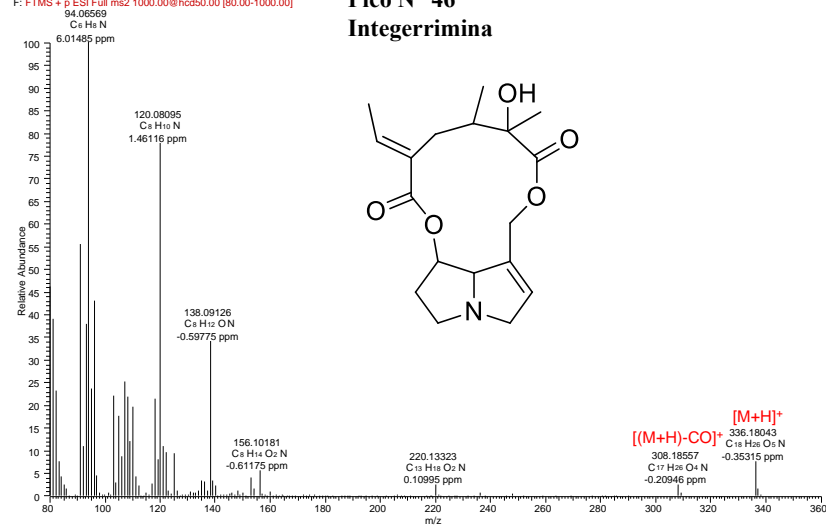
BG\_269\_critens\_50eV #227-228 RT: 4.27-4.29 AV: 2 NL: 4.81E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 45**  
**N-Óxido de 9-senecioldretreona**



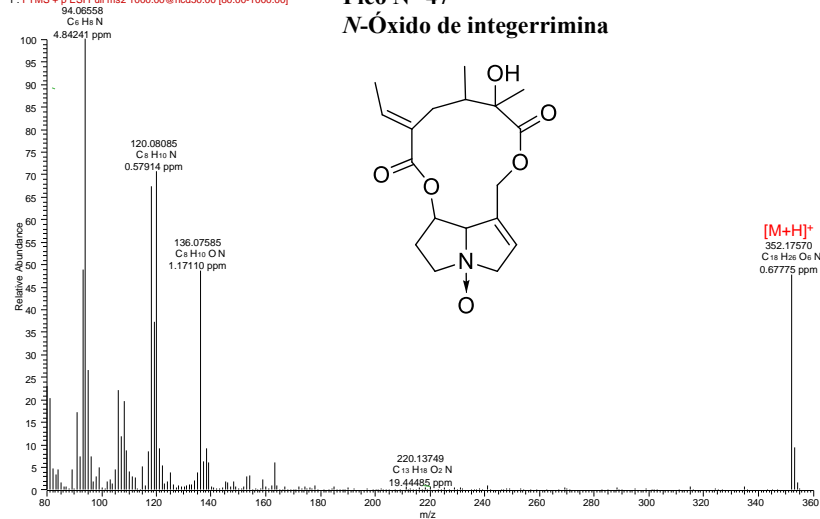
bg\_372\_cincana\_seedoil\_50eV#254-255 RT: 4.29-4.31 AV: 2 NL: 2.13E8  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 46**  
**Integerrimina**



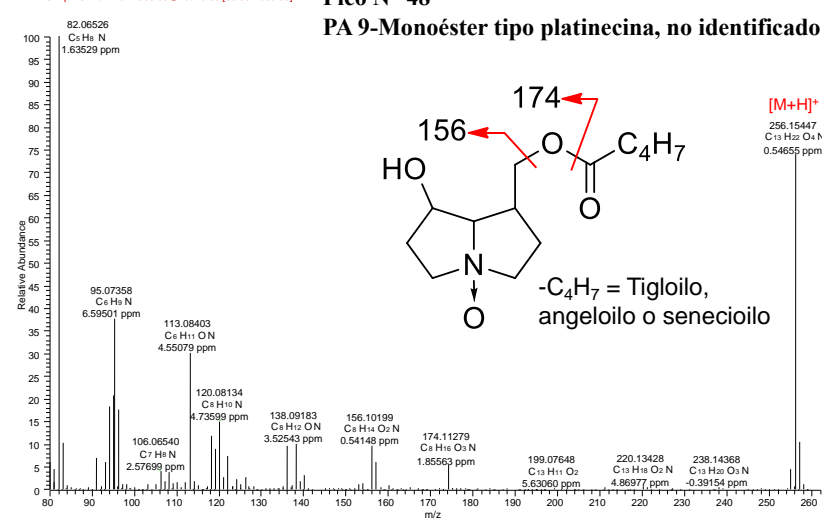
BG\_148\_nitens\_50eV#320-321 RT: 4.36-4.39 AV: 2 NL: 9.20E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 47**  
**N-Óxido de integerrimina**



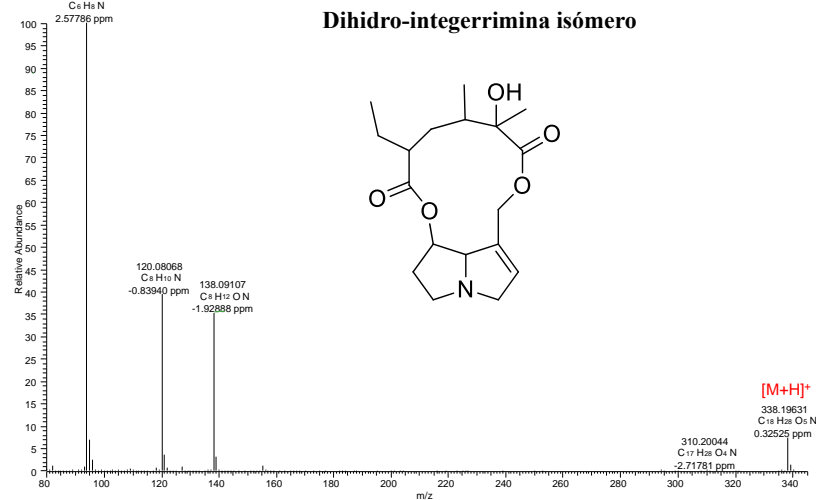
bg\_475\_critens\_40eV#197 RT: 4.41 AV: 1 NL: 1.37E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 48**  
**PA 9-Monoéster tipo platinecina, no identificado**



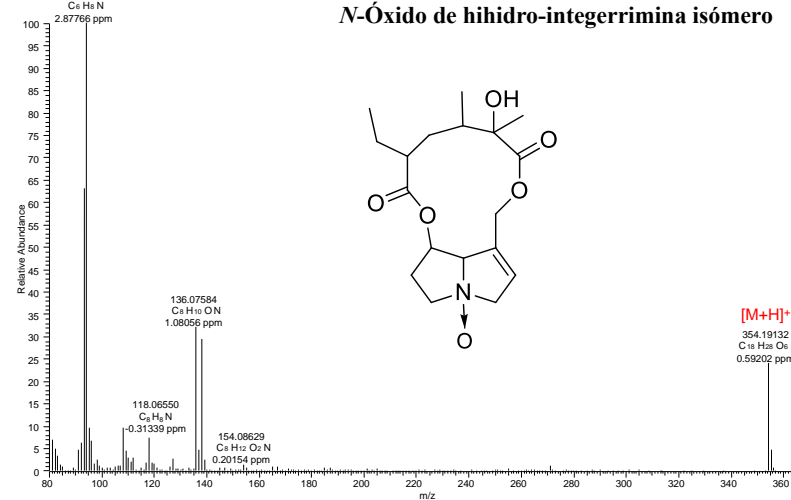
bg\_237\_incana\_30e#325-326 RT:4.55-4.58 AV: 2 NL: 8.60E8  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd30.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 49**  
**Dihidro-integerrimina isómero**



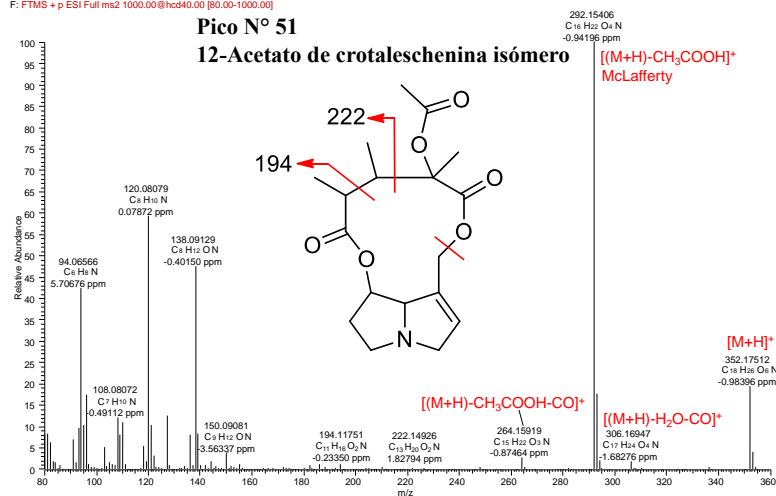
bg\_243r\_pallida\_50e#252-253 RT:4.73-4.74 AV: 2 NL: 3.65E7  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd50.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 50**  
**N-Óxido de bihidro-integerrimina isómero**



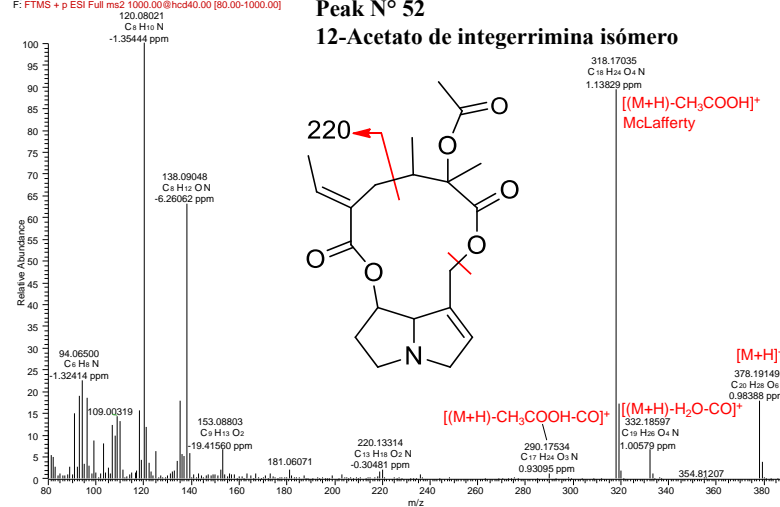
bg\_1c\_nitens\_seeds\_40e#232-234 RT:4.88-4.90 AV: 3 NL: 8.64E8  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

**Pico N° 51**  
**12-Acetato de crotaleschenina isómero**



bg\_254r\_nitens\_40e#241-243 RT:5.29-5.33 AV: 3 NL: 6.18E6  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

**Peak N° 52**  
**12-Acetato de integerrimina isómero**



**Apéndice F.** Reportes previos en literatura de la composición de ácidos grasos en semillas de diferentes especies de *Crotalaria*.

Especies	Ref.	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0	C24:0	Otros
<i>C. retusa</i>	[1]				3.5	7.2		11.0	15.5	57.5		4.8	0.4		
<i>C. pallida</i> <sup>a</sup>	[2]				15.1			2.3	7.8	66.0	5.5	0.8	1.9		
	[3]				18.8			6.7	12.4	48.0	4.1	1.1	2.8	1.2	1.5
	[4] <sup>b</sup>		3.6		32.1			4.1	8.0	15.0	15.0				
<i>C. juncea</i>	[2]				11.9			2.2	31.8	46.0	7.6	0.4			
	[5]		0.2		18.0			10.2	6.7	62.4	0.7	1.2	1.4		
	[6]	6.0	5.8	4.0	19.3	4.0	0.8	5.0	12.1	5.7	3.0	0.7	7.4	5.2	18.4
<i>C. albida</i>	[2]				13.3			2.8	13.7	63.0	5.0	0.8	0.7		
<i>C. laburnifolia</i>	[6]		0.4		24.5		0.2	4.5	11.5	51.0		1.8			
<i>C. medicaginea</i>	[6]		1.1	0.4	34.4			6.3	16.0	36.0		5.7			
	[7]				16.1			4.5	12.3	42.7	17.6	2.5	1.5		2.7
<i>C. alata</i>	[8]	0.1	0.3	0.1	12.8		0.3	7.6	21.4	48.2	8.4	0.8			
<i>C. cleomifolia</i>	[9]				5.1			0.4	28.6	57.6	5.5	0.3	1.6		0.5
<i>C. semperflorens</i>	[10]				17.6			5.2	19.2	11.3	45.4				
<i>C. clarkei</i>	[10]				19.2			4.0	17.4	10.6	46.4				
<i>C. paniculata</i>	[10]				27.7			1.0	14.3	43.4	12.2				
<i>C. fysonii</i>	[10]		3.6		13.6	9.1		7.4	17.9	20.6	19.2				
<i>C. walkeri</i>	[10]				14.5			4.4	19.6	17.5	35.1				

<sup>a</sup> *Crotalaria pallida* (Syn. *Crotalaria mucronata*). <sup>b</sup> También se encontraron los ácidos grasos ricinoleico (15.8%), malváico (2.1%) y estercúlico (4.3%).

**Referencias**

1. Aremu M. O., Bamidele T. O., Amokaha J. A., Compositional studies of rattlebox (*Crotalaria retusa* L.) seeds found in Nasarawa State, Nigeria. *Pak. J. Nutr.* 2012, *11*, 880-885.
2. Górnaś P., Czubinski J., Rudzińska M., Grygier A., Ying Q., Chakradhari S., Sahu P. K., Mišina I., Urvaka E., Patel K. S., Selected uncommon legumes as a source of essential fatty acids, tocopherols, tocotrienols, sterols, carotenoids, and squalene. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2019, *74*, 91-98.
3. Knothe G., Razon L. F., Madulid D. A., Agoos E. M., de Castro M. E., Fatty acid profiles of some Fabaceae seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2016, *93*, 1007-1011.
4. Hosamani K. M., Ramesh H. S., Unusual fatty acids from *Crotalaria striata* Syn. *Crotalaria mucronata* seed oil. *Ind. Crop. Prod.* 2001, *14*, 223-227.
5. Chouhan H. S., Sahu A. N., Singh S. K., Fatty acid composition, antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of seed oil from *Crotalaria juncea* Linn. *J. Med. Plants. Res.* 2011, *5*, 984-991.
6. Chowdhury A. R., Banerji R., Studies on leguminous seeds. *Fat. Sci. Technol.* 1995, *97*, 457-458.
7. Malik A., Taufeeque M., Parveen S., Sherwani M. R., Evaluation of fatty acid composition of the seed oil of some Leguminosae species from arid zone of Rajasthan. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)* 2015, *4*, 1344-1351.
8. Asilbekova D. T., Ul'chenko N. T., Rakhimova N. K., Nigmatullaev A. M., Glushenkova A. I., Seed lipids from *Crotalaria alata* and *Guizotia abyssinica*. *Chem. Nat. Compd.* 2005, *41*, 596-597.
9. Mazlan N. W., Said I. M., Physico-chemical properties of the oils and fat from *Crotalaria cleomifolia* seeds. *Sains Malaysiana* 2011, *40*, 1037-1041.
10. Kathirvel P., Kumudha P., Comparative analysis and nutritional assessment of raw seeds of *Crotalaria* species. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences (IJPAES)* 2012, *2*, 87-97.

**Apéndice G.** Contenido de alcaloides pirrolizidínicos en los aceites extraídos de las semillas de las especies de *Crotalaria* colectadas en el presente trabajo.

Alcaloide pirrolizidínico	Contenido <sup>a</sup> , µg/g de aceite					
	<i>C. retusa</i>	<i>C. spectabilis</i>	<i>C. pallida</i>	<i>C. incana</i>	<i>C. maypurensis</i>	<i>C. nitens</i>
Monocrotalina	4.8 ± 0.4	11.5 ± 0.7	N.D.	N.D.	1.4 ± 0.06	8.2 ± 0.5
<i>N</i> -Óxido de monocrotalina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.07 ± 0.02
Anacrotina isómero	N.D.	N.D.	N.D.	0.06 ± 0.01	N.D.	N.D.
12-Acetato de monocrotalina isómero	0.009 ± 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.15 ± 0.02
PA tipo retronecina, N.I.	N.D.	0.18 ± 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Usaramina	N.D.	N.D.	1.27 ± 0.09	0.34 ± 0.04	0.22 ± 0.01	N.D.
<i>N</i> -Óxido de usaramina	N.D.	N.D.	0.027 ± 0.003	N.D.	0.003 ± 0.001	N.D.
Crotaleschenina	0.14 ± 0.01	0.092 ± 0.03	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.01	6.2 ± 0.2
<i>N</i> -Óxido de crotaleschenina	0.049 ± 0.02	0.09 ± 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	0.11 ± 0.01
9-Tigloylretronecina	N.D.	N.D.	N.D.	0.30 ± 0.01	N.D.	N.D.
Integerrimina	N.D.	N.D.	0.22 ± 0.01	14.0 ± 0.6	0.51 ± 0.02	12.3 ± 0.7
<i>N</i> -Óxido de integerrimina	N.D.	N.D.	N.D.	0.21 ± 0.01	0.012 ± 0.001	0.17 ± 0.01
Dihidro-integerrimina isómero	N.D.	N.D.	N.D.	0.58 ± 0.04	N.D.	N.D.
12-Acetato de crotaleaschenina isómero	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.48 ± 0.03
<b>PA totales</b>	<b>5.0 ± 0.44</b>	<b>11.9 ± 0.72</b>	<b>1.5 ± 0.10</b>	<b>15.5 ± 0.62</b>	<b>2.1 ± 0.10</b>	<b>27.6 ± 0.94</b>

N.I., no identificado. N.D., No detectado.

<sup>a</sup> Resultados cuantitativos asumiendo el mismo factor de respuesta de la monocrotalina para todos los alcaloides detectados. Promedio ± desviación estándar ( $n = 3$ ).